

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia
Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LaBCM) - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Avaliação da resposta a longo prazo de células de carcinoma colorretal à 5-fluoruracila e oxaliplatina mimetizando o perfil de tratamento clínico

ANDRÉA BALDASSO ZANON

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia
Lab. de Biologia Celular e Molecular (LABCM) - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Avaliação da resposta a longo prazo de células de carcinoma colorretal à
5-fluoruracila e oxaliplatina mimetizando o perfil de tratamento clínico

Dissertação de mestrado
apresentada no Programa de Pós-
Graduação: Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
em Abril de 2017, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências em
Gastroenterologia e Hepatologia.

ANDRÉA BALDASSO ZANON

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Zanon, Andréa Baldasso

Avaliação da Resposta a longo prazo de células de carcinoma colorretal à 5-fluoruracila e oxaliplatina mimetizando o perfil de tratamento clínico / Andréa Baldasso Zanon. -- 2017.

126 f.

Orientador: Eduardo Cremonese Filippi Chiela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. carinoma colorretal. 2. 5-fluoruracila. 3. oxaliplatina. 4. longo prazo. 5. resistência. I. Chiela, Eduardo Cremonese Filippi, orient. II. Título.

Dedico esta dissertação às pessoas que estão
sempre ao meu lado, incentivando e apoiando
todas as minhas escolhas e decisões.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, além dos membros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LaBCM) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular que possibilitaram a utilização dos equipamentos para a realização dos experimentos do trabalho.

Ao professor Eduardo, um exemplo de pessoa, profissional e orientador, pelo apoio, paciência, ética e confiança. Agradeço por todos os ensinamentos, compreensão e, acima de tudo, pela amizade, por ter acreditado em mim e por estar sempre presente em todos os momentos.

À professora Patrícia, por toda a preocupação e incentivo durante todo o desenvolvimento do projeto.

Ao professor Guido, pelo empréstimo dos reagentes utilizados para a realização dos experimentos do trabalho.

À bolsista Nayara Franco, pela participação, disponibilidade e ajuda durante a execução dos experimentos.

À Unidade de Pesquisa Clínica em Oncologia do HCPA, em especial ao Dr. Sergio Azevedo, um exemplo de chefe, que sempre me ensinou, incentivou e apoiou todas minhas decisões. Esteve sempre presente e disposto a me ajudar. Muito obrigada!

Aos colegas, ex-colegas e amigos, pelos conselhos, incentivo e momentos de diversão.

E, principalmente, aos meus familiares, em especial, ao meu pai Júlio, à minha mãe Célia, aos meus irmãos, Emerson e Everton, e ao meu namorado Ivan. Agradeço pela compreensão, paciência, incentivo, força e apoio durante todas as minhas escolhas e decisões. Amo vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	9
APRESENTAÇÃO.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E TUMORAIS DO CCR.....	13
1.2. CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO GERAL DO CARCINOMA COLORRETAL.....	15
1.3. FATORES AMBIENTAIS NO CCR	20
1.4. PROGNÓSTICO E TERAPIA DO CCR.....	20
1.5. FOLFOX COMO TERAPIA PRIMÁRIA	23
1.6. MECANISMOS ANTITUMORAIS ENDÓGENOS E POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS EM CÂNCER.....	33
1.6.1 <i>Hallmarks</i> do Câncer	33
1.6.2. Ciclo Celular	36
1.6.2.1. Conceito.....	36
1.6.2.2. O papel do ciclo celular na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico.....	38
1.6.3. Apoptose	40
1.6.3.1. Conceito.....	40
1.6.3.2. O papel da apoptose na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico.....	43
1.6.4. Espécies Reativas (RS).....	44
1.6.4.1. Conceito.....	44
1.6.4.2. O papel das RS na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico.....	45

1.6.5. Senescência	46
1.6.5.1. Conceito.....	46
1.6.5.2. O papel da senescência na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico.....	48
1.6.6. Autofagia	51
1.6.6.1. Conceito.....	51
1.6.6.2. O papel da autofagia na carcinogênese	54
1.6.6.3. Autofagia como potencial alvo terapêutico	56
1.7. ESTUDOS CRÔNICOS X ESTUDOS AGUDOS <i>in vitro</i>	57
2. OBJETIVOS	58
2.1. OBJETIVO GERAL	58
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3. ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	59
4. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA.....	60
4.1. HIPÓTESE	60
4.2. JUSTIFICATIVA	60
5. CAPÍTULO I - The response of colorectal cancer cells to 5-fluoruracil and oxaliplatin mimicking the clinical schedule involves the induction of apoptosis, senescence and cytoprotective autophagy	61
6. DISCUSSÃO INTEGRADA	95
7. CONCLUSÃO GERAL.....	116
8. PERSPECTIVAS	117
REFERÊNCIAS.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3MA** – 3-metiladenina (*3-methyladenin*)
- 5FU** – 5-fluoruracila (*5-fluoruracil*)
- AO** – laranja de acridina (*acridine orange*)
- APC** – *Adenomatous Polyposis Coli*
- BECN1** – beclina-1 (*Beclin-1*)
- CCR** – carcinoma colorretal
- CDK** – cinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent Kinase*)
- CDKi** – inibidores de CDK
- Chk1/2** – cinase de ponto de checagem 1 e 2 (*Checkpoint proteins 1 and 2*)
- CIMP** – fenótipo metilador das ilhas GPC (*CpG Island Methylator Phenotype*)
- CIN** – instabilidade cromossômica (*Chromosomal Instability*)
- CQ** – cloroquina
- CRC** – *colorectal carcinoma*
- CSC** – células-tronco tumorais (*Cancer Stem Cells*)
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- EGFR** – receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- FOLFIRI** – 5-fluoruracila + leucovorina + irinotecano
- FOLFOX** – 5-fluoruracila + oxaliplatina + leucovorina
- FSC** – *forward-scatter*
- FdUMP** – monofosfato de fluorodesoxiuridina (*5-fluoro-2'-deoxyuridine monophosphate*)
- FdUTP** – trifosfato de fluorodesoxiuridina (*fluoro-deoxyuridine triphosphate*)
- FUTP** – fluorostatina trifosfato (*5-fluorouridine triphosphate*)
- HCQ** – hidroxicloroquina
- LC3 I/II** – formas I e II da cadeia leve 3 das proteínas associadas a microtúbulos 1A e 2A (*Light Chain 3 of microtubule-associated protein 1A and 2A*)
- LC3-GFP** – proteína LC3 fusionada à proteína verde fluorescente (GFP) (*LC3 protein fused to Green Fluorescence Protein*)
- LV** – leucovorina

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated Protein Kinase*)

MEC – matriz extracelular

MGMT – O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*)

MLD – meio livre de droga

MLH – *mutL homolog*

MMR – reparo de pareamento incorreto (*Mismatch Repair*)

MSH – *mutS homolog*

MSI – instabilidade de microssatélite (*Microsatellite Instability*)

MSS – ausência de Instabilidade de Microssatélite (*Microsatellite Stable*)

MUT – mutado (*Mutated*)

OXA – oxaliplatina (*oxaliplatin*)

PDC – population doubling cumulativo

PI3k (III) – fosfatidilinositol 3 – cinase (classes III) (*Phosphoinositide Kinase-3 class III*)

pRB – proteína do retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)

Proteínas Atg – membros da família de proteínas relacionadas à autofagia (*Autophagy-related protein*)

PTEN – proteína homóloga a fosfatase e tensina (*Phosphatase and Tensin Homolog*)

RB – retinoblastoma

ROS – espécie reativa de oxigênio

RS – espécies reativas

SA-B-gal – *Senescence-Associated Acid β -Galactosidase*

SASP – Fenótipo Secretor Associado à Senescência (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*)

SSC – *side scatter*

TEM – transição epitelial-mesenquimal

TNM – tumor primário, linfonodos, metástases

TP – timina sintetase

TS – timidilato sintetase (*Thymidylate Synthase*)

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

WT – *Wild type*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência de progressão do adenoma ao carcinoma colorretal.....	14
Figura 2. Regimes FOLFOX mais utilizados clinicamente.....	22
Figura 3. Via de ativação da capecitabina e estruturas químicas de seus metabólitos .	25
Figura 4. Capacidades comuns adquiridas.....	34
Figura 5. Fases do ciclo celular	37
Figura 6. Esquema das vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose	41
Figura 7. Alterações morfológicas das células apoptóticas	42
Figura 8. Fatores de Hayflick.....	46
Figura 9. Alterações morfológicas das células senescentes	48
Figura 10. Visão geral do processo de senescência	49
Figura 11. Mecanismo da autofagia	53
Figura 12. O papel da autofagia no câncer.....	55
Figura 13. Desenho experimental utilizado no projeto.....	59
Figura 14. Visão geral do mecanismo de ação do co-tratamento 5FU+OXA em CCR e hipóteses geradas	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mecanismos de ação do 5FU em células de CCR.....	28
Tabela 2. Mecanismos de ação da OXA em células de CCR	31

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta de uma **Introdução** com os principais tópicos abordados na parte experimental, que inclui o modelo tumoral utilizado (linhagens de carcinoma colorretal HCT116 e HT29), os compostos citotóxicos utilizados (5-fluoruracila e oxaliplatina), e os mecanismos de proliferação celular avaliados no trabalho - ciclo celular, apoptose, senescência e autofagia. Após serão descritos os **Objetivos** (gerais e específicos), um **Capítulo** escrito na forma de artigo científico contendo os **Materiais e Métodos** utilizados, os **Resultados** encontrados ao longo da elaboração do projeto, uma breve **Discussão**, **Conclusão** e **Referências** específicas.

Ao final é feita uma **Discussão Geral** contemplando os dados apresentados no Capítulo I e ressaltando a importância científica deste trabalho, seguido das **Hipóteses**, **Conclusões**, **Perspectivas** e **Referências** utilizadas para elaboração desta dissertação.

RESUMO

O carcinoma colorretal (CCR) está entre os três tipos mais frequentes e mortíferos de câncer do mundo. O tratamento de primeira escolha depende do estágio tumoral, sendo que o regime quimioterápico mais utilizado é o FOLFOX (5-fluoruracila + oxaliplatina + leucovorina). Apesar do amplo uso, o mecanismo de ação deste protocolo, especialmente considerando o período entre ciclos de tratamento, bem como os mecanismos envolvidos na frequente resistência de células de CCR ao tratamento são pouco conhecidos. Aqui nós avaliamos a resposta de células de CCR expostas ao tratamento com 5-fluoruracila (5FU) e oxaliplatina (OXA) em perfil semelhante ao tratamento clínico, nas linhagens de CCR humano HCT116 e HT29, em prol de entender os mecanismos de ação e de resistência ao tratamento. Para isso, as células foram tratadas com os quimioterápicos de maneira isolada ou combinados por 2 dias, seguido do replaqueamento em meio livre de droga por 15 dias, mimetizando o regime de tratamento clínico. Foram realizadas análises da proliferação celular e ciclo celular, além de análises dos mecanismos celulares que vêm sendo mostrados como envolvidos na sensibilidade e resistência de células tumorais a compostos citotóxicos, tais como apoptose, senescência e autofagia. Não houve efeito aditivo citotóxico para a combinação de 5FU e OXA a curto prazo (48h), porém, a longo prazo houve um efeito aditivo importante para o co-tratamento quando comparado aos tratamentos isolados. Este efeito aditivo foi mediado pela indução de apoptose (principalmente pela 5FU) e senescência (principalmente pela OXA). Apesar deste efeito, as células de todos os tratamentos retomaram o crescimento bem como mantiveram capacidade clonogênica a partir do dia 7 após o tratamento. Quando nós avaliamos a autofagia nas células sobreviventes ao tratamento, encontramos um aumento transitório, com pico entre os dias 3 e 7, sendo que um perfil semelhante foi observado para o aumento de ROS, com pico entre os dias 5 e 7. A inibição racional da autofagia no período de ativação máxima do mecanismo reduziu de maneira intensa o número de células e a clonogenicidade das células sobreviventes. Dessa forma, a inibição da autofagia em combinação com 5FU e OXA pode potencializar o efeito do tratamento e reduzir a resistência das células de CCR ao tratamento.

ABSTRACT

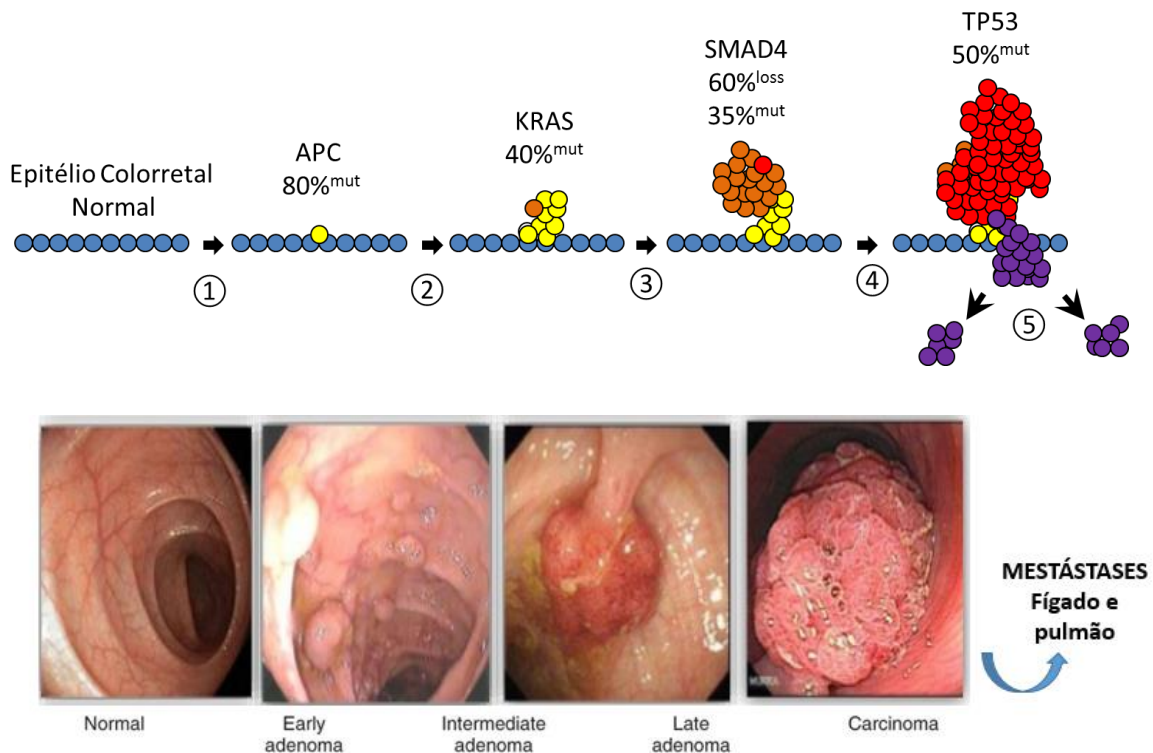
Colorectal carcinoma (CRC) is among the three most frequent and deadly types of cancer in the world. The first-choice treatment depends on the tumor stage, and the most commonly used chemotherapy regimen is FOLFOX (5-fluorouracil + oxaliplatin + leucovorin). Despite the wide use, the mechanism of action of this protocol, mainly considering the interval between two cycles of chemotherapy, as well as the mechanisms involved in the frequent resistance of CRC cells to treatment are poorly understood. In this project, we evaluated the response of HCT116 and HT29 human CRC cells exposed to 5-fluorouracil (5FU) and oxaliplatin (OXA) in a profile similar to clinical treatment. Cells were treated with the chemotherapeutics alone or in combination for 2 days, followed by the replating in drug-free medium for 15 days, mimicking the clinical treatment regimen. Analysis of cell proliferation and cell cycle were performed, as well as the analysis of the cellular mechanisms that have been shown as being involved in the sensitivity and resistance of tumor cells to cytotoxic compounds, such as apoptosis, senescence and autophagy. There was no cytotoxic additive effect for the combination of 5FU and OXA in the short-time (48h), but in the long term it was observed an important additive effect for co-treatment when compared to the isolated treatments. This additive effect was mediated by the induction of apoptosis (mainly by 5FU) and senescence (mainly by OXA). Despite this effect, cells from all treatments resumed growth as well as maintained the clonogenic capacity from day 7 after treatment. When we evaluated autophagy in treatment-surviving cells, we found a transient increase, with a peak between days 4 and 6; a similar transient increase was observed for reactive species, peaking between days 6 and 8. The rational inhibition of autophagy in the period of maximal activation of the mechanism greatly reduced the number of cells and the clonogenicity of the surviving cells. Thus, the rational inhibition of autophagy in combination with 5FU and OXA may potentiate the effect of the treatment and reduce the resistance of CRC cells to the treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E TUMORAIS DO CCR

Conforme será abordado posteriormente, o CCR se desenvolve a partir de um pólipó adenomatoso benigno, o qual se transforma em um adenoma avançado com displasia de alto grau e, em seguida, progride para um câncer invasivo (estágios I e II). Esse tipo de câncer é curável, porém, se não for tratado, pode se espalhar para os linfonodos regionais (estágio III) e, em seguida, metastizar para locais distantes (estágio IV) (Markowitz e col, 2009).

Na maioria dos casos a primeira alteração que ocorre é a mutação ou perda do gene supressor tumoral **APC** (*Adenomatous Polyposis Coli*) o qual controla os níveis de beta-catenina e interage com a E-caderina, ambas envolvidas na adesão celular. Desta forma, a perda desse gene resulta em alterações na proliferação celular e na adesão célula-célula e célula-tecido, representando a principal via de formação do adenoma. As alterações subsequentes usualmente encontradas são mutações no oncogene **KRAS**, que ocorre, principalmente, durante os estágios iniciais da progressão do adenoma e a perda de **SMAD2/4**, levando a um aumento da sinalização proliferativa e redução da sensibilidade a sinais de morte celular. A proteína **SMAD4** desempenha um papel inibitório na transdução de sinal da via de sinalização do TGF- β , de modo que a perda de tais sinais inibitórios permite um crescimento mais autônomo das células tumorais. Neste ponto, o epitélio já apresenta características de adenoma tardio. Finalmente, a mutação ou perda do supressor tumoral **p53** normalmente está associada à transformação do estágio de adenoma tardio para carcinoma, o qual, muito frequentemente, leva à formação de metástases, especialmente no fígado e pulmões (**Figura 1**) (Ilyas e col, 1997; Liu Y e col, 2006; Markowitz e col, 2009; Bracht e col, 2010; Arends, 2013). Além das mutações em oncogenes clássicos e supressores tumorais, inúmeras alterações epigenéticas já foram descritas para CCR, porém a distribuição destas alterações ao longo da cinética da carcinogênese do CCR são ainda pouco claras (Lao e col, 2011; Okugawa e col, 2015).



Epitélio intestinal

Figura 1. Sequência de progressão do adenoma ao carcinoma colorretal. As alterações genéticas mais frequentes são, a partir do epitélio normal: (1) mutações em *APC* ocorrem em cerca de 80% dos adenomas e carcinomas (evento muito precoce); (2) mutações *KRAS*, observadas em 40% dos adenomas e carcinomas; (3) perda de uma grande parte do cromossomo 18, contendo os genes *SMAD4* e *SMAD2*, ocorrendo em cerca de 60% dos carcinomas, embora as mutações de *SMAD4* possam ser encontradas em até 35% ; (4) mutação *TP53* é encontrada em aproximadamente 50% dos carcinomas, surgindo como um evento tardio durante a transição para carcinoma invasor (5) (Adaptado de Arends, 2013).

A perda da heterozigiosidade nos genes *APC*, *TP53*, *SMAD4*, caracteriza 80 a 85% de CCR esporádicos, dependendo do estágio. Por outro lado, um terço dos CCR apresentam mutações somáticas ativadoras no *PI3KCA*, que codificam a subunidade catalítica da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína envolvida na ativação da via de proliferação e sobrevivência celular da proteína Akt. Algumas outras alterações genéticas que podem ser citadas são, a perda de *PTEN*, que é um inibidor da sinalização PI3K, bem como a amplificação do substrato 2 de receptor de insulina (*IRS2* - ativador da sinalização PI3K) e co-amplificação de *AKT* e *PAK4*, que são mediadores da sinalização PI3K (Markowitz e col, 2009).

O gene supressor tumoral *TP53* codifica a proteína p53 a qual é considerada o "guardião do genoma", uma vez que responde ao estresse de danos no DNA, além de outros estresses celulares. A proteína p53 é um fator de transcrição de genes moduladores do ciclo celular, como p21, e de genes pro-apoptóticos, como BAX, que induzem a morte celular por apoptose (Arends, 2013). Mais de 50% dos tumores humanos contêm perda de funcionalidade de p53 o que contribui para a diminuição da sensibilidade aos agentes quimioterápicos comumente utilizados (Karabay e col, 2016).

Finalmente, as mutações oncogênicas de *RAS* e *BRAF* ativam, em 37% e 13% dos CCR, respectivamente, a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos (*MAPK*), sendo fundamentais para a progressão do CCR. As mutações de *RAS*, principalmente em *KRAS*, ativam a atividade GTPase que sinaliza diretamente para *RAF*. Além disso, as mutações de *BRAF* sinalizam a atividade da serina-treonina quinase que impulsiona ainda mais a cascata de sinalização das *MAPK* (Markowitz e col, 2009).

1.2. CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO GERAL DO CARCINOMA COLORRETAL

O carcinoma colorretal (CCR) é a terceira causa mais frequente de mortes por câncer em todo o mundo, sendo o terceiro tipo tumoral mais frequente em mulheres e o quarto tipo mais comum em homens, atingindo mais de 1 milhão de pessoas por ano (Mhaidat e col, 2014; Tamas e col, 2015). Aproximadamente um terço dos CCRs são retais (Tamas e col, 2015). No Brasil, a partir dos dados disponibilizados pelo Instituto Nacional do Câncer (Brasil, 2016), foram estimados 34.280 novos casos de CCR em 2016, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres. No que diz respeito à mortalidade, em 2013 foram registrados 15.415 casos de óbito por CCR, sendo 7.387 homens e 8.024 mulheres.

Atualmente a terapia padrão para o CCR consiste da combinação de 5-fluouracila, oxaliplatina e leucovorina (FOLFOX), que será discutida em maiores detalhes nas seções posteriores. Embora a mortalidade global da doença tenha

diminuído nas últimas décadas, em parte devido às melhorias nos programas de rastreio/triagem e endoscopias para remoção de pólipos pré-malignos, além de novas terapias (Cunningham e col, 2010), os casos que avançam para metástases à distância continuam sendo um problema clínico significativo (Yoo e col, 2006). Aproximadamente 20 a 25% dos pacientes apresentam metástases no momento do diagnóstico e entre 50 e 60% apresentam metástase ao longo do desenvolvimento tumoral (Yoo e col, 2006; Sanoff e col, 2013). Devido à drenagem venosa do intestino grosso ser realizada através do sistema porta, o primeiro local a ocorrer a metástase do CCR, geralmente, é o fígado, seguido pelos pulmões, ossos e o cérebro (Tamas e col, 2015).

O CCR é diagnosticado com base nos resultados da colonoscopia ou sigmoidoscopia com biópsia de tumor. A estratégia de tratamento é realizada através do estadiamento adequado (TNM = tumor primário, linfonodos, metástases), feito durante o diagnóstico (Cunningham e col, 2010). O “T” é utilizado para descrever, particularmente, o tamanho do tumor que pode variar de 0 a 4 e, ainda pode ser acompanhado por uma letra minúscula “a” ou “b” que é adicionada com base na ulceração e taxa mitótica. O número de 0 a 3 atribuído para o “N”, representa os linfonodos regionais e indica se a doença se disseminou para os gânglios linfáticos. Por fim, o “M” indica se o câncer se espalhou para outras partes do corpo (*American Cancer Society*, 2017).

O desenvolvimento de diagnósticos moleculares para a detecção precoce do CCR é uma importante ferramenta utilizada na prática clínica. Vários estudos têm caracterizado o CCR a nível molecular, gerando (i) instrumentos para a realização de testes genéticos a fim de diagnosticar formas familiares de alto risco da doença, (ii) marcadores preditivos para selecionar pacientes para certas classes de terapias farmacológicas; (iii) marcadores diagnósticos para a detecção precoce e não invasiva; e (iv) perfis para classificação molecular. Além disso, mecanismos biológicos tumorais que poderiam formar a base de novos agentes terapêuticos estão sendo identificados (Markowitz e col, 2009).

a. Classificação do CCR com Base no Tipo Molecular

Em 85% dos casos o CCR esporádico é precedido por lesões benignas do tipo pólipos. A biologia molecular por trás da progressão de adenoma (benigno) à carcinoma (maligno) a partir do epitélio intestinal normal envolve alterações cumulativas em oncogenes e genes supressores tumorais clássicos, sendo uma das carcinogêneses moleculares mais bem caracterizadas e definidas entre todos os tipos tumorais (Markowitz e col, 2009; Arends, 2013).

As principais vias de instabilidade genômica encontrados nos CCR são a via supressora ou instabilidade cromossômica (CIN), a via de instabilidade de microssatélites (MSI) e a via do fenótipo metilador das ilhas GPC (CIMP) (Arends, 2013). A CIN é frequentemente associada à mutação no supressor tumoral *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), enquanto o fenótipo MSI é definido e caracterizado por defeitos no reparo de DNA. Sendo assim, a partir da análise das anormalidades moleculares (CIN, MSI e CIMP) e com base nas suas características moleculares e patológicas, podemos classificar os CCRs em 5 grupos:

(1) 12% pertencem ao grupo **MSI-alto esporádico**, o qual é caracterizado por CIMP-alto, MSI- alto, metilação de MLH1, mutação BRAF, estabilidade cromossômica, muitas vezes com origem em pólipos sésseis-serrilhados (pólipos hiperplásicos, lesões sésseis-serrilhadas e adenomas serrilhados);

(2) 8% são originados de **pólipos serrilhados**, caracterizados por CIMP-alto metilação parcial de MLH1, mutação em BRAF, estabilidade cromossômica, MSS ou MSI-baixo;

(3) 20% são originados de **adenomas tubulares ou túbulo-vilosos convencionais ou pólipos serrilhados**, caracterizados por CIMP-baixo, mutação *KRAS*, metilação MGMT, CIN, MSS (ausência de Instabilidade de Microssatélite) ou MSI-baixo;

(4) 57% são originados de **adenomas convencionais**, caracterizados por CIN, MSS e CIMP-negativo;

(5) 3% se originam de **adenomas convencionais ou**, ocasionalmente, **adenomas serrilhados**, que são caracterizados por Síndrome de Lynch devido à

mutação hereditária do gene MMR, MSI-alto, CIMP-negativo, mutação BRAF negativa e cromossomicamente estável.

A MSI é uma medida da incapacidade do sistema de reparação do DNA em corrigir erros que normalmente podem ocorrer durante a replicação. Esse processo é controlado por vários genes (incluindo MLH1, MSH2 e MSH6) e caracterizado pelo acúmulo de mutações nucleotídicas únicas e alterações no comprimento de sequências de nucleotídeos microssatélites repetitivos que são comuns em todo o genoma. Estes tumores são caracterizados por localização proximal, histologia mucinosa, diferenciação pobre e infiltração linfocítica (Cunningham e col, 2010). Além disso, as mutações dos genes MLH1, MSH2 e MSH6 são características de diversos CCR primários, de progressão acelerada e com elevado risco de tumores endometriais, gástricos e uroteliais (Markowitz e col, 2009).

A instabilidade genética é necessária para que um tumor acumule as inúmeras alterações genéticas que acompanham seu desenvolvimento e, de acordo com a literatura, parecem existir duas vias da mesma no câncer colorretal. Uma delas envolve mutações pontuais, microdeleções e microinserções associadas à deficiência de um sistema de reparo de mal-pareamento (MMR) e é encontrada em aproximadamente 15% dos tumores. A outra envolve ganhos e perdas de cromossomos inteiros e é encontrada em células proficientes de MMR (Lengauer e col, 1997; Sinicrope e col, 2012). Sendo assim, um defeito no sistema de MMR permite a inserção ou a deleção de mutações em genes supressores tumorais e reguladores do crescimento, tornando as células mais susceptíveis à transformação neoplásica (Arnold e col, 2003).

O sistema MMR é um complexo de replicação que reconhece e repara pares de bases incompatíveis que ocorrem, por exemplo, durante a replicação do DNA. Dessa forma, os tumores podem ser caracterizados como sendo (a) deficientes de MMR, os quais apresentam MSI-alto ou perda de uma proteína de MMR (metilação proficiente – MMR2, MET1), ou como (b) proficientes de MMR que são microssatélites estáveis (MSS) e MSI-baixo (MSI-L) ou, ainda, são tumores com proteínas MMR intactas (metilação deficiente – MMR1, MET2) (Lengauer e col, 1997; Herman e col, 1998; Arnold e col, 2003; Sinicrope, 2010).

De acordo com Herman e colaboradores (1998), existe uma relação entre MMR e a metilação alterada do DNA em células humanas, sendo que essa última desempenha um papel no controle da expressão gênica e, poderia exercer um papel nos processos de segregação cromossômica no câncer (Lengauer e col, 1997; Herman e col, 1998).

A perda desse sistema ocorre no câncer colorretal esporádico (10-15%) e, geralmente, é causada por hipermetilação hMLH1. A deficiência de MMR tem mostrado conferir resistência a vários agentes citotóxicos que atuam através de danos no DNA, dentre eles o 5-fluorouracila (5FU), uma vez que torna as células tumorais tolerantes às drogas que geralmente seriam tóxicas (Herman e col, 1998; Arnold e col, 2003; Sinicrope, 2010; Iwaizumi e col, 2011; Sinicropet e col, 2011). Por outro lado, as proteínas MMR não reconhecem os adutos relacionados com a oxaliplatina, uma vez que ela contém uma porção volumosa que se incorpora ao DNA através de adutos citotóxicos intra e intercadeia, fazendo, dessa forma, com que a quimiossensibilidade à oxaliplatina seja independente ao sistema MMR (Sinicrope e col, 2012).

A análise do MMR parece ser bastante importante para a tomada de decisão sobre o uso da terapia adjuvante em pacientes com câncer de cólon em estágio II, principalmente aqueles deficientes de MMR, uma vez que os mesmos não devem receber quimioterapia adjuvante com 5FU, uma vez que apresentam um prognóstico favorável e esse tratamento é ineficaz nestes casos (Sinicrope, 2010).

b. Classificação com Base na Localização Tumoral

Vários marcadores biológicos e clínicos indicam que o câncer de reto é diferente do câncer de cólon, uma vez que eles apresentam uma origem embriológica, anatomia e função diferentes, fazendo com que o tratamento primário seja diferente, mas não o tratamento no cenário metastático. O tratamento local para o câncer retal é mais agressivo quando comparado ao câncer de cólon, devido a sua localização, a qual é cercada por inúmeras estruturas vitais, como grandes vasos, nervos, bexiga, órgãos genitais internos ou osso sacro (Tamas e col, 2015).

De acordo com as estatísticas de incidência do câncer de 2011 no Reino Unido, aproximadamente 31% dos CCR localizam-se no cólon proximal e 25% no cólon distal, enquanto que aproximadamente 34% dos tumores localizam-se na junção retal e retosigmóide. Além disso, o câncer de cólon proximal é mais comum em mulheres e o de reto, por sua vez, mais frequente em homens (Tamas e col, 2015).

1.3. FATORES AMBIENTAIS NO CCR

A maioria dos casos de CCR surge esporadicamente, porém alguns fatores de risco, tais como, idade, sexo masculino, pólipos anteriores no cólon ou carcinoma colorretal prévio, e fatores ambientais, como consumo de carnes vermelhas, dieta rica em gordura, ingestão inadequada de fibras, obesidade (índice de massa corporal elevada), estilo de vida sedentário (inatividade física), diabetes *mellitus* e tabagismo, aumentam o risco do desenvolvimento dessa doença. Além disso, as doenças inflamatórias intestinais, dentre elas, a colite ulcerativa e a doença de Crohn, representam cerca de dois terços da incidência do CCR, sendo que o risco aumenta com a duração da doença (2% durante 10 anos e 18% por 30 anos), com a gravidade e com a extensão da mesma. Por outro lado, em geral, um estilo de vida saudável parece contribuir para a prevenção do câncer retal (Cunningham e col, 2010; Tamas e col, 2015).

Ainda, de acordo com Cunningham e colaboradores (2010), mais de um quinto dos pacientes com CCR podem ter herdado um componente genético e, cerca de 3% desenvolverão a Síndrome de Lynch, que é a síndrome hereditária mais comum associada a esse tipo de câncer (condição letal autossômica dominante).

1.4. PROGNÓSTICO E TERAPIA DO CCR

Devido às diferenças na anatomia, tanto o câncer de cólon quanto o câncer retal requerem diferentes procedimentos de estadiamento, tratamentos neoadjuvantes e abordagens cirúrgicas. Conforme mencionado anteriormente, além das divergências anatômicas, esses dois tipos de câncer também diferem na sua origem

embriológica e nos padrões metastáticos. Além disso, apresentam diferentes mutações e conseqüentemente, necessitam de diferentes alvos terapêuticos. O gene BRAF, por exemplo, é preferencialmente mutado no câncer de cólon proximal, e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), por sua vez, é predominantemente amplificado ou superexpresso no câncer de cólon distal. Apesar das suas diferenças no padrão metastático, nos alvos terapêuticos e no tratamento primário, o câncer retal e de cólon metastáticos são comumente considerados como uma mesma doença e são tratados da mesma forma (Tamas e col, 2015).

Assim, a terapia primária de escolha para tratamento de CCR depende do estágio em que o mesmo se encontra, sendo que os tumores nos estágios I e II (tumor localizado, sem metástase linfonodal e sistêmica) são curáveis por excisão cirúrgica e até 73% dos casos da doença no estágio III (apenas metástase linfonodal mas não sistêmica) são curáveis pela cirurgia combinada com quimioterapia adjuvante (realizada após cirurgia). Apesar dos recentes avanços terapêuticos, a doença em estágio IV (metástase sistêmica) é, normalmente, considerada incurável (André e col, 2009; Markowitz e col, 2009; Cunningham e col, 2010; Roh e col, 2012).

Além disso, de acordo com a *American Cancer Society* (2016), outro fator que interfere na avaliação do prognóstico do paciente e, conseqüentemente, na escolha do tratamento, é o grau de diferenciação do câncer, que é avaliado com o auxílio do microscópio e descreve o quanto o tumor se parece com o tecido normal. Esta graduação pode variar do G1, no qual a doença é parecida com o tecido normal até o G4 onde a doença apresenta um tecido bastante diferenciado/anormal, ou seja, os tumores de baixo grau tendem a crescer e se espalhar mais lentamente do que os de alto grau, apresentando, na maioria das vezes, um prognóstico melhor.

O protocolo de tratamento quimioterápico mais utilizado consiste na combinação de 5-fluoruracila (5FU), oxaliplatina (OXA) e leucovorina (LV) (ácido folínico), o qual é conhecido como FOLFOX. Este protocolo pode ser executado de três maneiras principais (**Figura 2**), sendo que o modelo escolhido para nosso trabalho será semelhante ao FOLFOX 6 modificado devido a maior utilização na clínica (Tournigand e col, 2004; Van Cutsem e col, 2005; Yoo e col, 2006; Van Cutsem e col, 2008; Cunningham e col, 2010; Loree e col, 2014).

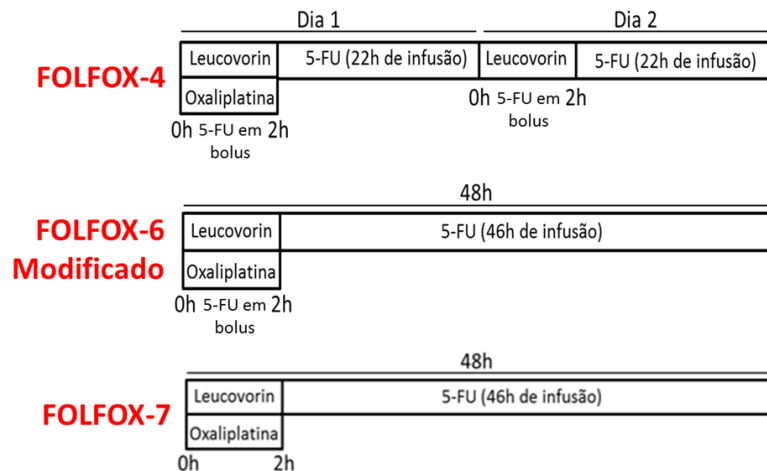


Figura 2. Regimes FOLFOX mais utilizados clinicamente. FOLFOX 4 - infusão de leucovorina + OXA+ 5FU em bolus durante 2h e posteriormente administração de 5FU por 22h. Ocorre um retratamento no segundo dia, repetindo o primeiro ciclo, sem o 5FU em bolus. FOLFOX 6 modificado - infusão de leucovorin + OXA + 5FU em bolus durante 2h e posteriormente realiza-se infusão contínua de 5FU por 46h. FOLFOX 7 - realiza-se a infusão de leucovorina + OXA durante 2h e posteriormente realiza-se a infusão contínua com 5FU.

Atualmente, num contexto metastático os pacientes podem ser tratados com dois regimes de quimioterapia de primeira e segunda linha padrão: (1) regime FOLFOX, composto por 5FU + LV + OXA e (2) regime FOLFIRI que consiste em 5FU + LV + irinotecano, os quais proporcionam uma melhor sobrevida quando comparado ao tratamento com apenas 5FU + LV. Ambos os regimes possuem atividade semelhante com diferentes perfis de toxicidade. Além disso, as fluoropirimidinas orais, como a capecitabina, são alternativas ao tratamento intravenoso com 5FU e podem ser substituídas com segurança quando combinadas com OXA, sem perder a eficácia (protocolo CAPOX) (Van Custem e col, 2008; Roh e col, 2012; Loree e col, 2014; Negrei e col, 2016).

Os regimes de 5FU e LV, administrados através de infusão, aumentam o tempo em que as células tumorais são expostas ao quimioterápico 5FU, permitem um aumento na dose total tolerada e são, geralmente, menos tóxicos do que os regimes administrados em bolus. Além disso, a infusão contínua quando comparada à injeção em bolus, apresenta uma maior incidência de síndrome mão-pé (reação cutânea tóxica), porém, por outro lado, apresenta menos casos de neutropenia (baixa da imunidade). Os estudos randomizados que compararam o 5FU em bolus com o 5FU contínuo mostraram uma taxa de resposta mais alta para a infusão contínua, que

normalmente é considerada sintomaticamente benéfica, mas nenhuma melhora no tempo de sobrevida foi observada (Gramont e col, 1997; Van Custem e col, 2008; Cunningham e col, 2010).

Outros tratamentos que podem ser utilizados nos pacientes com CCR metastático são os anticorpos monoclonais contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) como, por exemplo, o bevacizumabe, o regorafenibe e o aflibercept, e ainda, os anticorpos monoclonais contra o receptor do EGFR como, por exemplo, o cetuximabe e o panitumumabe que podem ser administrados isoladamente ou em combinação com a quimioterapia (Van Custem e col, 2008; Markowitz e col, 2009; Bracht e col, 2010; Cunningham e col, 2010; Roh e col, 2012; Loree e col, 2014). Nesse sentido, a identificação de subgrupos de pacientes que diferem na sua resposta ao tratamento pode ajudar a estabelecer, com base na atividade biológica, quais opções quimioterápicas disponíveis são as melhores (Roh e col, 2012).

1.5. FOLFOX COMO TERAPIA PRIMÁRIA

Os antimetabólitos são uma classe de fármacos eficazes, que interferem em processos bioquímicos essenciais, utilizados para o tratamento de câncer. Conforme já mencionado anteriormente, o 5FU e seu pró-fármaco, a capecitabina, são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, incluindo cânceres gastrointestinais, ginecológicos, de cabeça e pescoço e de mama (Focaccetti e col, 2014; Negrei e col, 2016).

O 5FU é o agente citostático de escolha para o tratamento do CCR. O 5FU é convertido intracelularmente, nos hepatócitos, em três metabólitos ativos: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) e o fluorostatina trifosfato (FUTP) os quais desencadeiam, em última análise, a apoptose dependente de caspase (Mhaidat e col, 2014; Negrei e col, 2016).

O mecanismo de ação do 5FU se dá através da inibição da enzima timidilato sintetase (TS), feita pelo seu metabólito FdUMP e, através da incorporação de seus outros metabólitos (fluronucleotídeos) nos ácidos nucleicos (FUTP no RNA e FdUTP no DNA). Sendo assim, o principal meio de ativação do 5FU é através da sua

conversão em monofosfato de fluorouridina (FUMP), o qual ocorre diretamente pela fosforribosil pirofosfato amidotransferase (PPAT) e pela uridina monofosfato sintase (UMPS) ou, ainda, via fluorouridina (FUR) por meio da ação seqüencial da uridina fosforilase (UPP) e uridina-quinase (UCK). Além disso, uma via de ativação alternativa envolve a conversão, catalisada por timidina fosforilase, de 5FU para fluorodesoxiuridina (FUDR), que é então fosforilada por timidina-quinase (TK) à FdUMP (Negrei e col, 2016).

Segundo Iwaizumi e colaboradores (2011), a morte celular causada por 5FU pode ser explicada (a) por ciclos fúteis de reparo de DNA e, conseqüentemente, pela não reparação efetiva dos danos, sendo este processo dependente da inibição da timidilato sintetase e da incorporação direta de 5FU no DNA; e (b) pelo reconhecimento direto do dano causado pelo 5FU ao DNA e uma resposta ao dano. O 5FU inibe a TS, a qual é responsável por catalisar a conversão de dUMP em dTMP, resultando na diminuição de pools de dTTP intracelulares.

Isso influencia o metabolismo da uracila e, conforme já mencionado, gera profundos efeitos sobre o metabolismo celular e viabilidade celulares. Após a administração, mais de 80% do 5FU é inativado pela biotransformação, principalmente no fígado, e cerca de 15-20% é eliminado na urina, sendo que apenas uma pequena fração permanece disponível para exercer o seu efeito antitumoral (Focaccetti e col, 2014).

Existe correlação entre a incorporação incorreta de 5FU no RNA e a perda de potencial clonogênico em linhagens celulares de carcinoma colorretal humano e de câncer de mama. Além disso, 5FU é usado clinicamente, sozinho ou em bolus, desde 1957, produzindo uma taxa de resposta de 10% a 15% e uma melhora no tempo médio de sobrevida de 6 a 9 meses no tratamento de cânceres metastáticos (Gramont e col, 1997; Sanoff e col, 2013; Mhaidat e col, 2014; Negrei e col, 2016). No entanto, juntamente com o seu uso, a resistência ao 5FU tornou-se comum e tem sido reconhecida como uma razão para a falência da terapia de muitos tipos de tumores (Sanoff e col, 2013; Mhaidat e col, 2014). Além disso, entre os efeitos colaterais do 5FU, é dada atenção especial às toxicidades cardiovasculares induzidas em diferentes níveis e intensidades (Focaccetti e col, 2014; Negrei e col, 2016).

O LV, conhecido como ácido folínico (5'-formiltetrahydrofolato), é uma vitamina administrada concomitantemente à OXA e que potencializa o efeito do 5FU. Além disso, ele é metabolizado em 5-10 metileno tetrahydrofolato (CH₂THF), o qual forma um complexo ternário covalente estável com o metabólito do 5FU, FdUMP e com a timidina fosforilase (TP), estabilizando a ligação de 5FU à timidilato sintase e inibindo a enzima que é essencial para a síntese da timina (Gramont e col, 1997; Roh e col, 2012; Focaccetti e col, 2014; Negrei e col, 2016).

Dessa forma, conforme nos mostra a **Figura 3A**, a TP é uma enzima chave envolvida na conversão da capecitabina em 5FU e do 5FU em seus metabólitos ativos (Focaccetti e col, 2014).

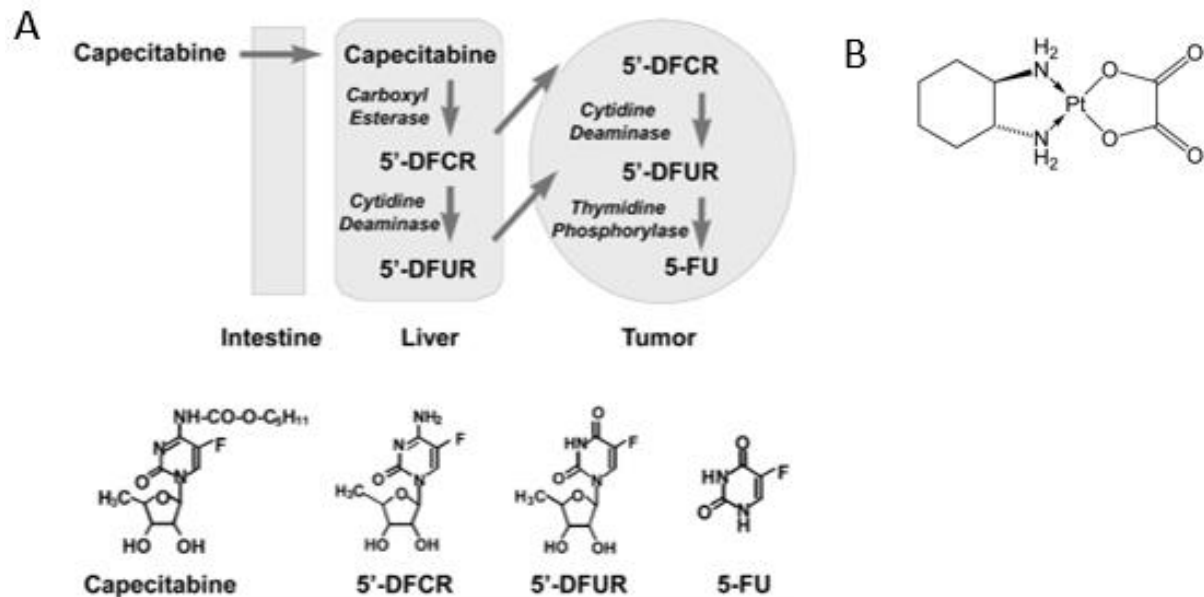


Figura 3. Via de ativação da capecitabina e estruturas químicas de seus metabólitos, e estrutura da oxaliplatina. **(A)** A capecitabina é ativada em 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR) no fígado e em 5'-desoxi-5-fluorouridina (5'-DFUR) no fígado e no tumor sendo, finalmente, convertida em 5-fluorouracila (5FU) pela enzima timidina fosforilase no tumor (<http://www.vidyya.com>). **(B)** oxaliplatina.

Finalmente, a OXA (**Figura 3B**) é um agente citotóxico da família dos diaminociclohexanos (terceira geração das platinas), sendo que a diferença com a cisplatina é a substituição dos grupos amino da cisplatina por diaminociclohexano (DACH). Dessa forma, seu nome químico completo "oxalato (trans-1,2-diaminociclohexano) platina", se refere ao átomo de platina que é complexado com DACH e à presença de um "grupo de saída" de oxalato (Alcindor e col, 2011; Mehmood, 2014).

A OXA atua sobre o DNA através da formação de ligações alquil que resultam no surgimento de pontes inter e intrafilamentos. Esta última ocorre entre as posições N7 de duas guaninas adjacentes (GG), adenina-guaninas (AG) adjacentes e guaninas separadas por um nucleotídeo interveniente (GNG). Acredita-se que as ligações intercadeias contribuam para a citotoxicidade da cisplatina, porém parecem ser importantes no mecanismo de ação da OXA. Trata-se, portanto, de um clássico indutor de dano ao DNA, levando à inibição da síntese de DNA e quebra das cadeias de DNA. A OXA exibe atividade antitumoral em diversos tipos de tumores, incluindo aqueles intrinsecamente resistentes aos compostos de platina de primeira e segunda geração (Woynarowki e col, 1998; Chaney e col, 2004; Alcindor e col, 2011). A maior citotoxicidade da OXA, quando comparada à cisplatina, é devido ao ligante DACH, o qual é mais volumoso e mais solúvel em água, resultando em um maior dano ao DNA, além de evitar que o complexo MMR se ligue à OXA, fazendo com que ocorra a morte celular (Mehmood, 2014).

Dependendo do modo da identificação dos danos no DNA, o reparo de excisão de nucleotídeo (NER = *nucleotide excision repair*) pode ser genômico global (GG-NER) ou de transcrição acoplada (TC-NER), sendo que, os danos induzidos pela cisplatina e pela OXA, normalmente, são reparados via TC-NER (Mehmood, 2014).

Dessa forma, tanto o 5FU, quanto a OXA induzem dano ao DNA, do tipo mal-pareamento sendo que o 5FU bloqueia a formação do ácido timidílico e, portanto, a biossíntese de DNA e, a OXA, por sua vez, bloqueia a formação de *crosslinks* intracadeia no DNA, levando ao disparo de reparo do mesmo, supressão da replicação do material genético e, conseqüentemente, da proliferação celular (Van Cutsem e col, 2005; Van Cutsem e col, 2008; Roh e col, 2012; Loree e col, 2014).

Para facilitar o entendimento dos mecanismos de ação disparados após o tratamento com 5FU e OXA em células de CCR, os principais estudos foram agrupados na **Tabela 1 e 2**, respectivamente. Através destas tabelas é possível observar que, de maneira geral, encontramos um relativo padrão sobre os mecanismos de ação dessas drogas em CCR, uma vez que tanto 5FU quanto OXA induzem apoptose, com aumento da geração de espécies reativas (em maiores níveis pelo 5FU) e autofagia citoprotetora. Observa-se, ainda, que para ambos os compostos, a resistência às terapias parece

estar associada ao enriquecimento de células tronco tumorais, conforme ser discutido posteriormente. Finalmente, é importante mencionar que nenhum estudo utilizou as drogas de maneira combinada, em um protocolo semelhante ao utilizado na clínica (longo prazo) e, por vezes, as doses utilizadas não apresentavam relevância clínica. Além disso, nenhum trabalho da literatura avaliou os mecanismos de ação e resistência da combinação de 5FU e OXA em células de CCR, objetivo central do presente trabalho.

Tabela 1. Mecanismos de ação do 5FU em células de CCR

Cell Line	Treatment	Toxicity	Mechanism of action	Key Observation	Ref
HT29 Colon26	2.5 to 500 μ M 24h, 36h, 48h	HT29: IC50 – 9.3 μ M (36h) Colon26: IC50 – 23,26 μ M (36h) Viability in relation to control (MTT) HT29 - 5FU 10 μ M, 36h: 42% +3MA added: 20% Colon26 - 5FU 10 μ M, 36h: 56% +3MA added: 30%	\uparrow Apoptosis (DNA fragmentation, nuclear condensation, cytochrome c release, PARP cleavage and casp. 3 cleavage) \uparrow Autophagy (LC3, p62, monodansylcadaverin)	5FU-induced apoptosis was enhanced by pharmacologic (3MA) inhibition of autophagy, from 14% to 32% (HT29) and from 18% to 42% (Colon26)	Li et al., 2009
HCT116 DLD-1 DLD-1/5FU (a 5FU-resistant sub-line of DLD-1)	HCT116: 7 μ M 48h DLD-1: 50 μ M 48h	Viability in relation to control (MTT) HCT116: 48%; +3MA added: 20% DLD-1: 50% +3MA added: 27% DLD-1/5FU: 85% +3MA added: 42%	\uparrow Apoptosis (casp.3 cleavage, DNA fragmentation) \uparrow Autophagy (LC3, p62, GFP-LC3)	5FU-induced apoptosis was enhanced by genetic (Atg7 shRNA) and pharmacologic (3MA) inhibition of autophagy 5FU+3MA also suppressed autophagy, increased apoptosis and reduced tumor volume in vivo	Li et al., 2010
SW480 HT29	50 μ M 48h	Viability not assessed Apoptosis rate (Annex+ cells) SW480: 12% HT29: 12%	\uparrow ROS (CellROX Reagent) and \uparrow Apoptosis (Annex, casp. 3 and 7 cleavage, PARP cleavage)	Antioxidants (NAC and catalase - pre-treatment of 2h) decrease the proapoptotic effects of 5FU in colon cancer cells. 5FU-induced Src activation is mediated by ROS and mediated 5FU-induced apoptosis through the direct interaction with caspase 7	Fu et al., 2014
MC38 (murine)	522 μ M 48h	Viability not assessed Apoptosis rate (Annexin+ cells) 25%	\uparrow Apoptosis (Annex/PI); \uparrow Autophagy (LC3 I/II)	3MA and wortmannin increased 5FU-induced apoptosis (from 25% to 32% and 58%, respectively); Rapa reduced 5FU-induced apoptosis (from 25% to 20%) 5FU induces the release of HMGB1 and the recruitment of leukocytes to the peritoneal cavity. Autophagy inhibition reduced 5FU-induced secretion of HMGB1	Cottone et al., 2015

Cell Line	Treatment	Toxicity	Mechanism of action	Key Observation	Ref
SW480 SW620 HCT116 HT29	50 μ M 72 h	Cell viability in relation to control (MTT) and apoptosis (Annex) HCT116 15%; 35% of apoptosis SW620 40%; 20% of apoptosis HT29 38%; 28% of apoptosis SW480 50%; 6% of apoptosis	\uparrow Apoptosis	5FU induces apoptosis by the activation of PKC δ and caspase-9.	Mhaydat et al., 2014
HCT116 HT29 RKO	10 μ M to 60 μ M 24h	Viability in relation to control (MTT) HCT116 – 80% to 50% HT29 – 92%, 87%, 83%, 80%, 78%, 77% RKO – 77%, 65%, 52%, 50%, 41%, 40%	\uparrow Autophagy (LC3 I/II, p62, TEM) in HCT116 and RKO (20 μ M, 24h) but not in HT29 (30 μ M, 24h) Apoptosis (Annex/PI)	3MA, siAtg5 and siBecn1 increases 5FU-induced apoptosis (Annex) in HCT116 (13% to 27%) and HT29 cells (9% to 15%) 5FU induces JNK activation and Bcl-2 phosphorylation, triggering autophagy; the inhibition of JNK reduces autophagy and increases the apoptosis in response to 5FU Loss of p53 decreases the sensitivity of HCT116 to 5FU	Sui et al., 2014
Lovo92 Colo320 WiDR	0.5 μ M to 50 μ M 72h	SRB (for IC50) and Apoptosis Lovo92 - 1.1 μ M; 10% (Ann+); 5% (Ann+/PI+) Colo320 - 2.3 μ M; 2% (Ann+); 6% (Ann+/PI+) WiDR - 2.5 μ M; 8% (Ann+); 6% (Ann+/PI+)	Apoptosis (Annex/PI) Autophagy (LC3 I/II and GFP-LC3)	3MA reduced the clonogenic survival Lovo92 – from 48% to 37% Colo320 – from 58% to 30% WiDR – from 35% to 10%	Bijnsdorp et al., 2010
HCT116	15 μ M 72h R	Viability CCK-8 assay (in relation to control) 5FU – 37%	Not assessed	HCT116 cell line resistant to 5FU enriched CSC (from 2% in control to 33%) Resistant cells overexpress Notch/Hes1 pathway	Huang et al., 2015

Cell Line	Treatment	Toxicity	Mechanism of action	Key Observation	Ref
HCT116 WT and two 5FU resistant sub lines (continD and continB)	770 μ M 24h followed by 40 days of growth in Drug-Free Medium R	Number of viable cells HCT116 wt: \downarrow from 50.000 cells to around 600 cells 20 days after treatment, then regrowth	Cell cycle arrest (S phase and G2/M phase) and apoptosis (annex)	In WT cells, it was observed two peaks of apoptosis (day 10, 90% of cells; day 15, 80% of cells).	De Angelis et al., 2008
		Contin D: \downarrow from 50.000 cells to 6000 cells after 6d, then regrowth ContinB: \downarrow from 50.000 cells to 700 cells after 10days, then regrowth		In continB it was observed only the first peak of apoptosis (day 10, 90% of cells). ContinD cells were resistant to apoptosis Levels of 5FU incorporation were similar between the cell lines.	
HT29	20 μ M 72h R	Not assessed	Not assessed	5FU resistant cells \uparrow CSC features (8-10 fold of spherogenic capacity and CSC markers), high mitochondrial mass, and increased oxidative phosphorylation in response to a re-exposure to 5FU Suppression of oxidative phosphorylation reduced the spherogenic potential and the expression of CSC markers	Denise et al., 2015

Abbreviations: CSC, cancer stem cells; **R**, resistance; Annex, annexin V FITC; 3MA, 3-methyladenin; BafA1, Bafilomycin A1.

Tabela 2. Mecanismos de ação da OXA em células de CCR

Cell Line	Treatment	Toxicity	Mechanism of action	Key Observation	Ref
SW620, SW480	25µM 24h	<u>Viability (CCK8 assay: % in relation to control)</u> SW620 = 60% SW480 = 75%	↑ Autophagy (p62 and LC3; GFP-LC3); ↑ Apoptosis (12% annex+ cells; 25% Casp3+ cells)	OXA treatment enriched CSCs from 23.9% to 35.3% (CD44+, espherogenic); autophagy contribute to the survival and enrichment of CSCs.	Yang et al., 2015
Caco-2, SW1116 and HCT116	10µM 24 hrs	<u>Viability (MTT: % in relation to control)</u> Caco-2: 45% SW1116: 52% HCT116: 75% <u>PI+ cells</u> Caco-2: 50% SW1116: 40% HCT116: 22%	<i>Only in Caco-2 cells</i> ↑ autophagy (LC3 I/II; 18% of GFP-LC3+ cells; 70% of AO+ cells; 75% of MDC+ cells) ↑ ROS (DCFH-DA);	Autophagy inhibitors (3MA and Baf A1) increased OXA-induced cell death (from 50% of PI+ cells to 62% and 64%, respectively); siRNA for ATG5 and BECN1 increased cell death and decreased cell viability; Rapa decreased cell death (from 50% to 35%) ROS contributes to autophagy induction; autophagy inhibition (3MA) increased ROS while autophagy induction (Rapa) decreased ROS	Shi et al., 2012
HCT116	20µM 72h	Viability CCK-8 assay (in relation to control) OXA – 21%	Not assessed	HCT116 cell line resistant to OXA enriched CSCs from 2% in control to 47% Resistant cells overexpress Notch/Hes1 pathway	Huang et al., 2015

Cell Line	Treatment	Toxicity	Mechanism of action	Key Observation	Ref
HCT116	10 μ M, 15 μ M, 35 μ M 24h	Viability (MTT – in relation to control)		3MA decreased the viability and increased OXA-induced apoptosis (annex; not quantified)	Liu et al., 2015
HT29		HT29 60%, 42%, <10%	\uparrow autophagy (LC3 I/II)		
HCT116		HCT116 50%, 40%, <10%	No basal autophagy found	OXA increased HMGB1 levels; shRNA for HMGB1 decreased autophagy (LC3I/II and p62) and increased OXA-induced cell death (PARP cleavage)	

Abbreviations: CSC, cancer stem cells; Annex, annexin V FITC; 3MA, 3-methyladenin; BafA1, Bafilomycin A1.

1.6. MECANISMOS ANTITUMORAIS ENDÓGENOS E POTENCIAIS ALVOS TERAPÊUTICOS EM CÂNCER

Nesta seção nós apresentaremos os mecanismos celulares antitumorais mais relevantes para a presente discussão, que são: ciclo celular, apoptose, senescência e autofagia.

1.6.1 *Hallmarks* do Câncer

O câncer é uma doença causada pela sucessiva aquisição de mutações genéticas e mudanças epigenéticas que levam à perda de mecanismos de controle de proliferação e morte celular e, conseqüentemente, à transformação progressiva de células normais em células cancerosas, invasoras e metastáticas (Hanahan e col, 2000; Rosenfeldt e col, 2011). Enquanto células normais controlam a produção, a liberação e a resposta a fatores de crescimento e mitógenos, respondendo a sinais antiproliferativos que visam manter a homeostase celular e do tecido normal, células tumorais geram muitos dos seus próprios sinais estimuladores, reduzindo a dependência do seu microambiente normal, levando à uma insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento (Hanahan e col, 2000; Hanahan e col, 2011) (**Figura 4**). As *hallmarks* mais relevantes para o presente trabalho serão apresentadas brevemente nessa seção inicial.

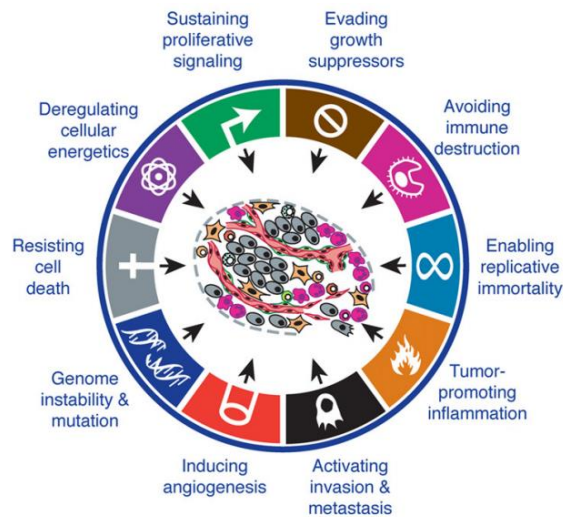


Figura 4. Capacidades comuns adquiridas por todos os cânceres (Hanahan e col, 2011)

Os **mecanismos de supressão tumoral endógenos** são mecanismos que visam a manutenção da homeostase celular normal e a diminuição da incidência do câncer, tais como a reparação do DNA, a morte celular, a parada no ciclo celular e a senescência (Lenz, 2012). Entre os genes envolvidos no controle destes mecanismos estão supressores tumorais clássicos, tais como a proteína do retinoblastoma (*Rb*), proteína *PTEN*, proteínas inibidoras de CDK e a proteína *TP53*, as quais auxiliam nas decisões das células em ativar senescência e apoptose ou reparar o dano genômico e sobreviver como uma célula normal (Hanahan e col, 2011).

De fato, o **reparo do DNA** é necessário para reparar mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, uma vez que, na carcinogênese, a instabilidade genômica é uma característica central e apenas uma mutação em um protooncogene é capaz de transformá-lo em um oncogene. A checagem dos **pontos de controle do ciclo celular** também é fundamental, e a desregulação dos mesmos é um dos primeiros processos a surgir durante o desenvolvimento do câncer (Branzei e col, 2008; Mjelle e col, 2015). A **morte celular**, finalmente, é um mecanismo atenuado nos tumores que conseguem progredir para estados de alto grau de malignidade, sendo que, esta resistência pode ser adquirida através da inativação de outros componentes-chave dos mecanismos de morte celular, tais como a proteína *TP53* (Hanahan e col, 2000; Hanahan e col, 2011). Algumas células tumorais resistentes à morte celular podem, por outro lado, interromper a proliferação celular de maneira irreversível, em

resposta a um estresse celular, entrando, assim, em **senescência celular**. A senescência celular, portanto, tem papel central em controlar a proliferação de células que possuem mutações no genoma e, as células cancerígenas, rompem essa barreira da mortalidade, adquirindo um potencial replicativo ilimitado (Hanahan e col, 2000; Hanahan e col, 2011).

Além da proliferação descontrolada, o **metabolismo energético** também é essencial para manter as células tumorais, uma vez que ele é o responsável por manter o crescimento e a divisão das células. As células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, podem reprogramar seu metabolismo energético à “glicólise aeróbia”, no chamado Efeito *Wardburg*, sendo que o combustível glicolítico parece estar associado à ativação de oncogenes (por exemplo, Ras e Myc) e à inativação de supressores tumorais (por exemplo, *TP53*) (Hanahan e col, 2011; Pavlova e col, 2016). Neste contexto, a autofagia tem recebido atenção crescente, uma vez que é um mecanismo capaz de interferir tanto no metabolismo celular quanto em desfechos como a morte celular, senescência e ciclo celular (Galluzzi e col, 2015).

Finalmente, tem recebido atenção cada vez maior o conceito de **microambiente tumoral**, que corresponde à MEC e todos os tipos celulares que compõem um câncer, incluindo as próprias células tumorais diferenciadas, células tronco tumorais (CSCs, *cancer stem cells*), fibroblastos associados ao tumor e células endoteliais. Além destas, células do sistema imunológico (Quail e col, 2013) tem papel fundamental no reconhecimento de células tumorais e mesmo das pré-tumorais, atuando contra a formação e progressão tumoral. Os cânceres, por sua vez, desenvolvem ao longo da carcinogênese uma série de estratégias para suprimir a atividade do sistema imune anti-tumoral, além de modularem células inflamatórias no sentido de favorecerem o crescimento e progressão tumorais (Grivennikov e col, 2010; Hanahan e col, 2011).

As próximas seções apresentarão mais detalhes sobre estes mecanismos.

1.6.2. Ciclo Celular

1.6.2.1. Conceito

O ciclo celular é um processo organizado e regulado por proteínas de 2 famílias: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs). Juntas, estas proteínas permitem a progressão unidirecional do ciclo ao longo das fases G1 (*growth* 1), S (síntese de DNA), G2 (*growth* 2) e M (mitose). Além destas, participam também os inibidores de CDKs (CDKi), os quais contribuem para a manutenção da integridade genética e controle do estado ambiental em que a célula está inserida. Esse processo permite a adequada duplicação do material genético, assim como a divisão celular (Otto e col, 2017).

Existem diferentes ciclinas, as quais são expressas e degradadas de maneira cíclica e distinta em cada fase do ciclo celular, levando à ativação dos complexos ciclina-CDK e conduzindo à transição unidirecional entre as fases. A expressão dessas proteínas é ativada por sinais mitogênicos e inibida através da ativação dos pontos de checagem do ciclo celular, em resposta aos danos no DNA e às alterações ambientais (Elledge, 1996; Otto e col, 2017). O complexo de proteínas ciclinas e CDKs promovem a progressão celular através da fosforilação de vários alvos celulares como, por exemplo, a proteína *pRB* em fase G1, a qual é uma supressora tumoral. A fosforilação de *pRB* desliga essa proteína do fator E2F1, permitindo a ativação do mesmo e levando à transcrição de genes de fase S assim como da expressão de ciclinas de fase S. Eventos semelhantes, envolvendo outras proteínas, acontecem ao longo da transição entre as fases S para G2, e G2 para M. Danos a componentes celulares ou um ambiente pouco propício à divisão celular (por ex., ambiente com ausência de fatores de crescimento) sinalizam à célula, através de proteínas CDKis, tais como a p21, p27, p16, entre outras, para a parada no ciclo celular (Otto e col, 2017).

Conforme representado na **Figura 5**, o ciclo celular é composto por 4 fases: a Fase G1 (*growth* 1) que antecede a replicação do DNA, a fase S onde ocorre a síntese do DNA, a fase G2 (*growth* 2) na qual ocorre o aumento da massa celular e a Fase M (Mitose) que é quando ocorre a divisão celular (Hartwell e col, 1989; Otto e col, 2017).

Além disso, essa mesma figura mostra 3 pontos principais de checagem, G1, G2 e M que são estágios onde a célula e o ambiente são avaliados e onde as células recebem o comando para progredir ou não no ciclo celular. Ainda, são estes pontos de checagem que permitem o reparo do DNA danificado ou de outros componentes celulares, bem como permitem que as alterações ambientais sinalizem para a célula entrar em processo de ciclagem e divisão (Elledge, 1996; Otto e col, 2017).

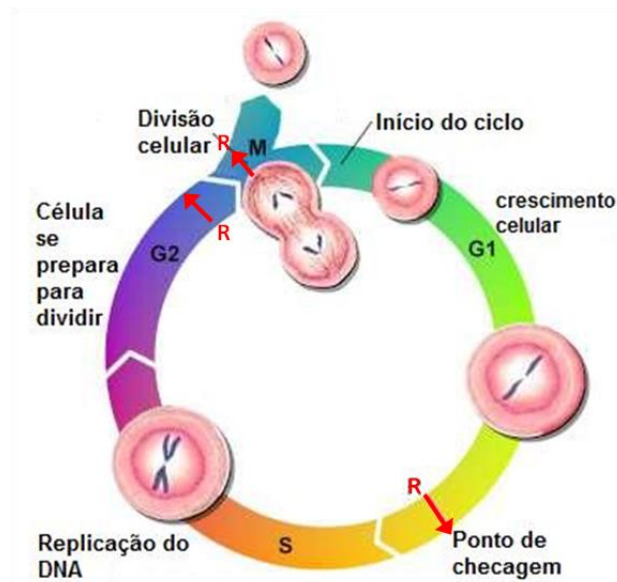


Figura 5. Fases do ciclo celular. Fase G1 - início do ciclo; duplicação dos componentes celulares e aumento do tamanho celular. Fase S - duplicação do DNA. Fase G2 - aumento da massa celular. Mitose - divisão celular. R – Principais pontos de checagem do ciclo celular (<http://www.qieducacao.com>).

O ponto de checagem G1 está localizado no final da fase G1 e, é nesse ponto, que a célula verifica se as condições internas e externas são adequadas para a divisão celular, ou seja, ocorre a análise do tamanho celular, a fim de verificar se a célula possui um tamanho suficiente para a fase de síntese de DNA (o que indica a quantidade de organelas e citoplasma), verifica se a célula tem energia e nutrientes suficientes para realizar o processo e se existe algum dano no DNA. Sendo assim, a célula poderá (i) sofrer parada no ciclo e, conseqüentemente, entrar em apoptose, (ii) progredir para um estado de quiescência (G0), onde ela não irá se dividir (estado de repouso), podendo permanecer nessa fase permanentemente ou, (iii) posteriormente, poderá retomar a divisão celular, entrando novamente na fase G1, assim que as

adversidades celulares ou ambientais forem resolvidas (Visconti e col, 2016; Otto e col, 2017).

Na sequência, a fim de verificar se as células possuem algum dano no DNA e se o DNA foi completamente copiado durante a fase S, existe o ponto de checagem G2 que se localiza no final da fase G2 e antes da fase M. Caso sejam detectados erros ou danos, a célula irá parar nesse ponto para realizar o reparo e, se o dano for irreparável, ela poderá sofrer apoptose, assegurando, dessa forma, que o DNA danificado não seja passado para as demais células. Esse mecanismo de reparo é muito importante para a prevenção do câncer (Visconti e col, 2016) e, devido a essas funções, esse ponto pode ser considerado um alvo terapêutico para o tratamento do câncer (Pires e col, 2010).

Outro ponto de verificação ocorre dentro da fase M, que é responsável por examinar se todas as cromátides-irmãs estão corretamente ligadas aos microtúbulos do fuso. Caso este processo não seja completado, a célula interrompe o processo da mitose, permitindo a realização de um novo reparo (Visconti e col, 2016).

1.6.2.2. O papel do ciclo celular na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico

Ao contrário do tecido normal no qual as células monitoram seu ambiente externo e, com base nos sinais detectados, decidem se proliferam, ficam quiescentes (fase G0) ou entram em estado pós-mitótico, nas células tumorais, ocorre uma insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento, fazendo com que elas continuem a proliferar e crescer de maneira autosuficiente (Hanahan e col, 2000; Hanahan e col, 2011).

Conforme já mencionado anteriormente, uma das capacidades atribuídas ao câncer é o potencial replicativo ilimitado, ou seja, o desenvolvimento do câncer ocorre devido a uma alteração no processo da divisão celular, onde as células progredem através do ciclo sem parar nos pontos de checagem, crescendo e se dividindo incontrolavelmente (Chow, 2010; Hanahan e col, 2000; Hanahan e col, 2011). Esse descontrole é causado, principalmente, devido à uma perda de função ou diminuição da atividade dos genes supressores tumorais, ou, devido a superexpressão de oncogenes.

De fato, diversos genes supressores tumorais e oncogenes modulam de maneira direta ou indireta os complexos ciclina-CDK e, conseqüentemente, a progressão do ciclo celular. Os produtos dos oncogenes, por sua vez, estimulam o crescimento e a divisão, enquanto os genes supressores tumorais, tais como, inibidores da progressão do ciclo celular, proteínas necessárias para indução da apoptose, dentre outros, estão envolvidos com o processo de controle do crescimento e da divisão celular, promovendo, às vezes, a apoptose (Chow, 2010).

O gene *TP53* é um supressor tumoral envolvido na parada na fase G1 ou G2 induzida por diversos estressores, especialmente dano ao DNA, podendo induzir a apoptose, dependendo da severidade do dano. O gene que codifica a proteína *TP53* é mutado em aproximadamente 50% de todos os tipos de câncer, sendo que a inativação do mesmo faz com que a célula continue se dividindo mesmo após a detecção de um dano no DNA (Liu Y e col, 2006).

Clinicamente, os resultados são promissores com o desenvolvimento de inibidores seletivos de CDKs, especialmente CDK4/6. Em 2014, o FDA aprovou o primeiro fármaco inibidor de CDK4/6, o Palbociclib, para câncer de mama. O mecanismo por trás da ação deste fármaco envolve inibição da atividade dos complexos de ciclina de fase G1 com CDK4/6, prevenindo assim a fosforilação da proteína *RB*, causando a parada na fase G1 do ciclo celular. O Ribociclib, por sua vez, também atua impedindo a fosforilação da proteína *RB*, causando assim a parada no ciclo celular. Por fim, o Abemaciclib inibe várias quinases além da CDK4 e CDK6 e, assim como os outros, impede a fosforilação da *RB*, levando à uma parada na fase G1 do ciclo. Este medicamento mostrou atividade antitumoral no CCR *in vitro* e, devido ao fato de atravessar a barreira hematoencefálica mais efetivamente, foi capaz de bloquear a progressão tumoral num modelo de glioblastoma *in vivo* (Otto e col, 2017).

1.6.3. Apoptose

1.6.3.1. Conceito

A morte celular programada ou apoptose é o programa de morte intrínseca das células que está envolvido na manutenção da homeostase dos tecidos através da eliminação de células nocivas ou desnecessárias (Grivicich e col, 2007; Fulda, 2009; Fulda, 2010; Roh e col, 2012; Fulda, 2015). Devido a isso, qualquer problema nos mecanismos fisiológicos desse processo pode contribuir para o surgimento de diferentes doenças, dentre elas, o câncer (Grivicich e col, 2007; Goldar e col, 2015). De fato, a homeostase dos tecidos é caracterizada, por um lado, pelo equilíbrio entre a proliferação e o crescimento celular e, por outro, pela morte celular, ou seja, a ativação das vias que favorecem a sobrevivência celular ao invés da morte celular, em condições estressantes, pode contribuir para o desenvolvimento de um câncer (Fulda, 2010).

Conforme ilustrado na **Figura 6**, a apoptose pode ocorrer a partir de duas vias de sinalização principais, a via de receptores celulares (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca). A **via extrínseca** é caracterizada pelo contato de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana (receptor de TNF α , FasL, entre outros) que, por sua vez, ativa a proteína caspase-8 (caspase inicial), a qual ativa as caspases efetoras (caspase 3 e 7), levando à morte celular. Por outro lado, a **via intrínseca** é ativada por dano em componentes intracelulares, tais como o DNA, microtúbulos e mitocôndrias, levando à liberação do citocromo c das mitocôndrias para o citosol, a qual desencadeia a ativação da caspase-3, através da formação de um grande complexo citosólico chamado de apoptossomo que consiste em citocromo c, APAF-1 e caspase-9. Conforme citado acima, a ativação de qualquer uma das vias leva à ativação de caspases (iniciais e efetoras), as quais são um grupo de proteases que, quando ativadas, clivam diversos alvos citoplasmáticos e nucleares, levando ao encolhimento e fragmentação celular (Grivicich e col, 2007; Fulda, 2009; Fulda, 2010; Fulda, 2015; Goldar e col, 2015). Ainda, uma vez ativada, a caspase-8 pode clivar diretamente a caspase-3 ou pode, indiretamente, iniciar a ativação da via intrínseca (mitocondrial) através da clivagem proteolítica de Bid em tBid, conforme também mostrado na Figura

9 (Fulda, 2015). Conforme já mencionado anteriormente, uma característica do câncer humano é a capacidade de evadir a apoptose, uma vez que a sinalização para a morte celular pode ser bloqueada através da ativação de programas que aumentam as moléculas anti-apoptóticas e/ou por uma diminuição ou função defeituosa de proteínas pró-apoptóticas (Hanahan e col, 2000; Fulda, 2009; Fulda, 2010; Hanahan e col, 2011). De fato, a diminuição na função ou baixos níveis de caspases, por exemplo, pode resultar numa redução da apoptose, favorecendo a carcinogênese, sendo quem a regulação negativa da caspase-9, por exemplo, pode contribuir para a carcinogênese do CCR (Goldar e col, 2015).

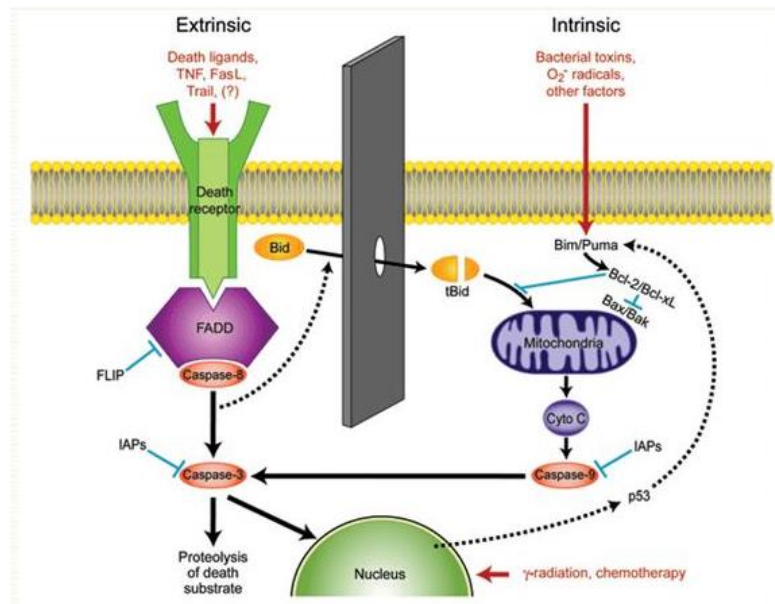


Figura 6. Esquema das vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose. Na **via extrínseca**, após o contato do ligante específico no receptor de morte celular, ocorre a interação com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1 as quais têm a capacidade de recrutar a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose. Na **via intrínseca**, os sinais de estresse intracelular ou extracelular convergem, principalmente para a mitocôndria, induzindo sua permeabilização e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes, como o citocromo c. Uma vez no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e com a caspase-9, chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9 e sua ativação. Esta, por sua vez, ativa a caspase-3 que será a responsável por iniciar o processo da apoptose. A caspase-8 pode, ainda, clivar a proteína Bid que por sua vez irá ativar a via mitocondrial (intrínseca) (Coto e col, 2007).

Conforme mostrado na **Figura 7**, as células apoptóticas apresentam alterações morfológicas particulares que incluem condensação nuclear, fragmentação nuclear, encolhimento celular, perda de adesão a matrizes extracelulares ou a vizinhos (desprendimento celular), externalização da fosfatidilserina e formação de “blebbings”

na membrana. Além disso, outra característica consiste na clivagem, por endonuclease, do DNA cromossômico em fragmentos internucleossômicos de tamanhos variáveis (Grivicich e col, 2007; Filippi-Chiela e col, 2012; Goldar e col, 2015).

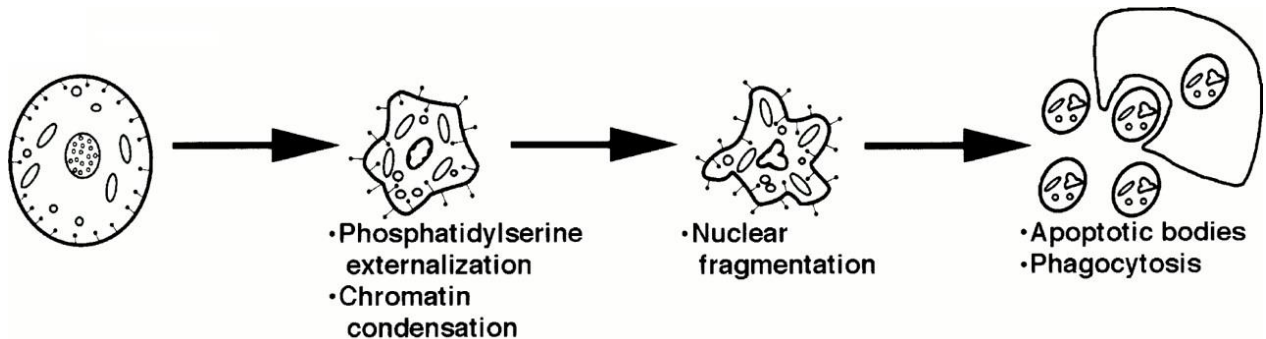


Figura 7. Alterações morfológicas das células apoptóticas. Ocorre uma retração da **célula normal**, a qual causa perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas. Em seguida, a cromatina sofre **condensação** e se concentra junto à membrana nuclear que, por sua vez, se mantém intacta. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e se rompem (**fragmentação**), dando origem a estruturas contendo o conteúdo nuclear, que são denominadas **corpos apoptóticos** (porções celulares envoltas pela membrana celular), os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos (Jones e col, 1997).

A apoptose disparada pela via intrínseca é controlada por proteínas da família Bcl-2, a qual é composta por proteínas que podem tanto induzir (pró-apoptóticas) quanto inibir (anti-apoptóticas) o processo. As proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid e Bak), favorecem ou promovem a apoptose através da abertura de um póro na membrana mitocondrial, permitindo o vazamento de citocromo c para o citoplasma e formação do apoptossomo. As proteínas anti-apoptóticas, por outro lado (ex.: Bcl-2, Bcl-XL, MCL1, entre outras), previnem a liberação de citocromo c por se ligarem aos membros pró-apoptóticos, inibindo assim a formação do póro e a apoptose. Outras proteínas importantes nesse contexto são os anti-apoptóticos inibidores de caspases, entre os quais destacam-se as proteínas survivina e XIAP (Adams e col, 2007; Grivicich e col, 2007; Goldar e col, 2015). Inúmeras proteínas, especialmente supressores tumorais, atuam *upstream* a estes genes de controle de apoptose. Dessa forma, pode-se destacar o fator de transcrição *TP53*, que ativa a apoptose em resposta aos danos no DNA, além de outras anormalidades cromossômicas, através da transcrição e aumento dos níveis de diversas proteínas pró-apoptóticas (Adams e col, 2007; Goldar e col, 2015).

1.6.3.2. O papel da apoptose na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico

Classicamente, a evasão da apoptose é descrito como um dos mecanismos que mais contribui para a carcinogênese, para a progressão tumoral e também para a resistência ao tratamento. A maioria das terapias anticâncer atuais, inclusive a quimioterapia, a radioterapia e a imunoterapia, atuam principalmente ativando vias de morte celular, incluindo a apoptose em células tumorais (Fulda, 2009; Fulda, 2010; Lenz, 2012; Fulda, 2015; Goldar e col, 2015).

A proporção das proteínas pró e anti-apoptóticas da família Bcl-2 (via intrínseca) desempenha um papel importante na regulação da morte celular. A interrupção no equilíbrio dessas proteínas com aumento de membros anti-apoptóticos com relação aos membros pró-apoptóticos pode contribuir para a carcinogênese através da redução da apoptose em células malignas. De fato, a superexpressão de membros da família das proteínas Bcl-2 está associada com um tipo de câncer mais agressivo e/ou à resistência ao tratamento, fazendo com que elas possam ser utilizadas como alvos terapêuticos muito promissores para o desenvolvimento de drogas que manipulem, farmacologicamente, a morte celular através da redução dos membros dessa família. Além disso, a evasão da apoptose pela via extrínseca também têm sido descrita em vários tipos de tumores, através de alterações na expressão dos receptores e ligantes de morte celular (Goldar e col, 2015).

A descoberta de mecanismos de escape da apoptose tem um grande potencial para a medicina translacional, uma vez que, de fato, inúmeros quimioterápicos clássicos, incluindo 5FU e OXA, atuam através da indução de apoptose (Tabelas 1 e 2). Além disso, defeitos em moléculas de apoptose podem servir como alvos para o desenho de novas estratégias terapêuticas, bem como marcadores moleculares para prever a resposta ao tratamento e prognóstico (Fulda, 2009). Um exemplo de molécula com este perfil é a proteína viral apoptoína. Em células tumorais, a apoptoína é importada para o núcleo onde forma multímeros que se ligam ao DNA, causando dano ao mesmo e a ativação de apoptose caspase-dependente. Por outro lado, esta proteína é apenas fracamente importada para o núcleo em células normais, o que torna sua

toxicidade relativamente específica. Outras classes de fármacos pró-apoptóticos diminuem o limiar de ativação da caspase, induzindo a auto-ativação da procaspase-3 e, finalmente, podendo sensibilizar as células tumorais frente a agentes quimioterápicos. Entre estes compostos estão, por exemplo, os inibidores de XIAP e survivina (Goldar e col, 2015).

Sendo assim, ao longo das últimas décadas, a indução da apoptose tem sido destaque no desenvolvimento de drogas antitumorais, porém poucas terapias foram geradas para ativar seletivamente a maquinaria de apoptose, sendo que a reativação de programas de morte celular em células tumorais pode abrir novas perspectivas para terapias mais eficazes, mais seletivas e menos tóxicas. Ainda, recentemente novos mecanismos através dos quais as células tumorais escapam da apoptose tem sido descritos. Neste sentido a autofagia, que será descrita posteriormente, tem sido amplamente estudada no tratamento contra o câncer, uma vez que contribui para a adaptação da célula tumoral ao estresse (ex. quimioterapia) e impede que a célula entre em apoptose (Lenz, 2012; Roh e col, 2012; Pan e col, 2013; Fulda, 2015).

1.6.4. Espécies Reativas (RS)

1.6.4.1. Conceito

As espécies reativas (RS) são radicais, íons ou moléculas que possuem um elétron não pareado que torna essas espécies muito reativas (Liou e col, 2010). Quando produzidas em quantidades moderadas, essas espécies participam de vários programas celulares durante condições fisiológicas, atuando como sinalizadores para regulação do crescimento celular, diferenciação, sobrevivência, inflamação e resposta imune. Por outro lado, quando essas espécies atingem níveis muito altos nas células, elas participam de processos patológicos, causando danos oxidativos no DNA, nos lipídeos e nas proteínas que, por sua vez, irão alterar a funcionalidade e a integridade celular (Agostinelli e col, 2006; Li e col, 2011; Pan e col, 2013).

A mitocôndria é a principal fonte de RS endógeno (neste caso, RS de oxigênio – ROS) e pode atuar como reguladora da sinalização redox, levando à sobrevivência ou

à morte celular. Pelo fato dela integrar a demanda de energia, ROS e sinalizar a apoptose, a disfunção mitocondrial e a acumulação de dano oxidativo contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo, doenças neurodegenerativas, pulmonares e cardiovasculares, além de esteatose hepática e câncer (Agostinelli e col, 2006; Li e col, 2011; Zhang, 2013).

1.6.4.2. O papel das RS na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico

Níveis elevados de ROS já foram detectados em quase todos os tipos de tumores, sendo que, muitas vezes esta condição é a responsável pelo desenvolvimento e progressão do tumor (na carcinogênese associada à inflamação crônica, por ex.), além de estar envolvida no metabolismo energético, na sobrevivência celular, na apoptose, dentre outras funções. Sendo assim, o aumento da quantidade de ROS nas células tumorais pode resultar, por exemplo, em um aumento da atividade metabólica, da disfunção mitocondrial, do aumento da sinalização dos receptores celulares, da atividade de oncogenes e do aumento da atividade das oxidases (Agostinelli e col, 2006; Liou e col, 2010). Além disso, os altos níveis de ROS parecem estar envolvidos com as metástases (Li e col, 2011) e a inibição da autofagia também pode estimular a formação do ROS (Pan e col, 2013).

De fato, as células desenvolveram mecanismos de controle dos níveis de RS, as chamadas defesas antioxidantes que, ou neutralizam as RS, ou as convertem a espécies não mais reativas. Um desequilíbrio neste balanço pode levar, entre outros desfechos, à parada do ciclo celular, à senescência ou até mesmo à apoptose a fim de evitar a propagação de células 'estressadas' e potencialmente tumorigênicas (Liou e col, 2010). Neste sentido, terapias pró-oxidantes poderiam elevar os níveis de ROS em células tumorais atingindo o limiar de toxicidade e levando-as à morte celular. De fato, alguns quimioterápicos, entre eles o 5FU e a OXA, induzem aumento de ROS, e este aumento parece ser importante para a indução de apoptose pelos mesmos (ver Tabelas 1 e 2).

1.6.5. Senescência

1.6.5.1. Conceito

O processo de senescência celular foi inicialmente descrito por Hayflick e Moorhead, em 1961, no qual eles observaram que fibroblastos humanos normais eram capazes de entrar num estado de parada irreversível de crescimento após cultivo em série *in vitro*, ou seja, essas células apresentavam uma capacidade proliferativa finita (Hayflick e col, 1961). Assim, senescência é caracterizada como sendo um estado irreversível de interrupção da divisão celular em células metabolicamente viáveis, ocorrendo fisiologicamente em função do encurtamento dos telômeros, ou podendo ser induzido por oncogenes, drogas que causam dano ao DNA ou estresse oxidativo; por outro lado, o processo pode ser 'desviado' pela perda de genes supressores tumorais, principalmente *TP53*, *pRB* e *CDKi* (Yang e col, 2011). De acordo com os fatores de Hayflick (**Figura 8**), a senescência celular pode ser desencadeada por diversos mecanismos, tais como o encurtamento dos telômeros, a regulação positiva do locus *CDKN2A* que codifica os supressores tumorais da família *INK4a/ARF* (CDKis, tais como *p15*, *p16* e *p21*) e o acúmulo de danos no DNA.

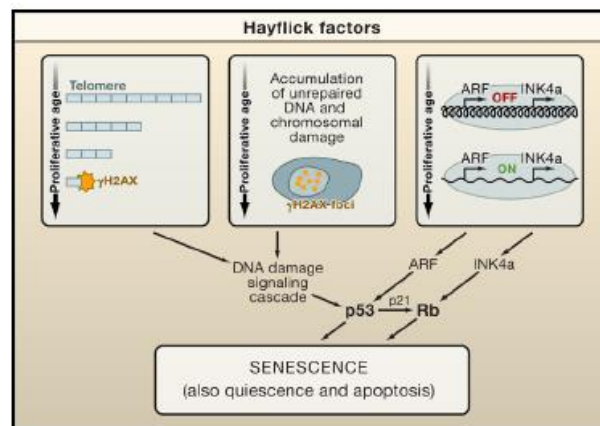


Figura 8. Fatores de Hayflick. Os três fatores que podem desencadear o mecanismo da senescência são: encurtamento dos telômeros, regulação positiva do locus *CDKN2A* que codifica *INK4a/ARF* e o acúmulo de danos no DNA (Collado e col., 2007).

De acordo com Collado e colaboradores (2007; 2010), o principal papel da senescência em organismos jovens/adultos é proporcionar proteção contra o câncer, uma vez que o 'dano' que as células senescentes causam aos tecidos é eficientemente reparado pelos processos normais de renovação. Em camundongos mutantes com danos constitutivos severos no DNA ou com problema na sinalização de danos no DNA, como por exemplo, a ativação permanente da proteína *p53*, a taxa de geração de células senescentes pode ser maior do que a capacidade de renovação das células-tronco (que também estão sujeitas a sinalização constitutiva de danos ao DNA), e os tecidos podem envelhecer prematuramente.

A senescência causada pelo encurtamento dos telômeros é dita senescência replicativa e ela atua como um mecanismo de supressão tumoral, contribuindo para evitar a carcinogênese mesmo quando a apoptose está sendo inibida pela superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl2. Neste sentido, o aumento ou a manutenção dos níveis de telomerase, enzima que atua na manutenção das sequências teloméricas, é um fator tumorigênico que permite a progressão tumoral pelo fato de manter, pelo menos parcialmente, a integridade dos telômeros (Collado e col, 2007). Conforme ilustrado na **Figura 9**, células senescentes apresentam diversas alterações fenotípicas, tais como um aumento drástico no tamanho celular e nuclear, achatamento celular e desenvolvimento de prolongamentos citoplasmáticos. Dessa forma, a medida do tamanho nuclear associada à redução das células mitóticas pode ser considerada um bom indicador do estado senescente em uma determinada população na cultura celular. Além disso, o marcador mais utilizado para demonstrar a indução desse processo em vários tipos de câncer é a medida da atividade da enzima beta-galactosidase ácida associada à senescência (SA- β -gal), uma enzima lisossomal com atividade aumentada em células senescentes (Collado e col, 2010; Filippi-Chiela e col, 2012).

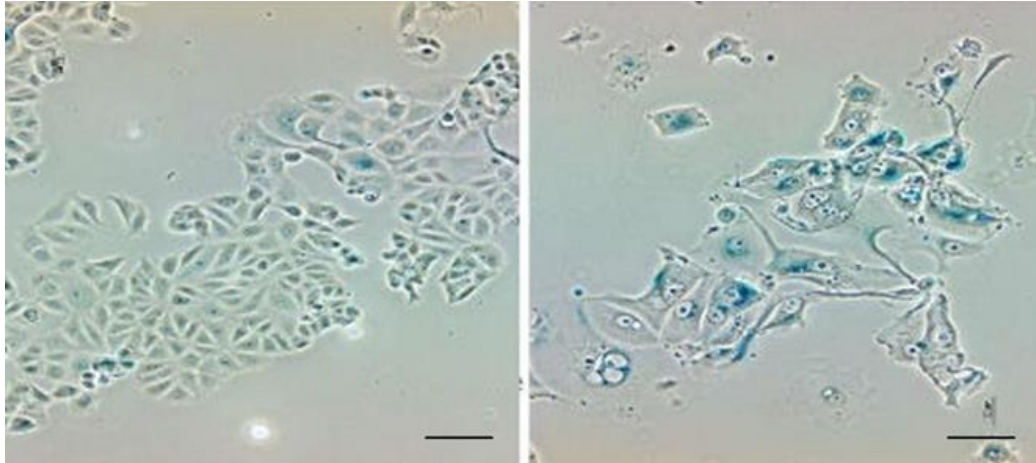


Figura 9. Alterações morfológicas das células senescentes. (A) Células normais. (B) Células senescentes, vistas no mesmo aumento. Estas células são caracterizadas por apresentarem um aumento no tamanho celular e nuclear, desenvolvimento de prolongamentos citoplasmáticos e aumento da atividade da enzima beta-galactosidase ácida. Pelo fato delas não proliferarem mais, porém serem metabolicamente ativas, elas podem contribuir para a manutenção do crescimento tumoral de maneira indireta, através da secreção de moléculas pró-tumorais (SASP).

1.6.5.2. O papel da senescência na carcinogênese e como potencial alvo terapêutico

Danos no genoma são gerados, principalmente, por agentes genotóxicos ambientais, pelo metabolismo oxidativo celular e por falhas intrínsecas da maquinaria de replicação do DNA. Dependendo do tipo e da intensidade do dano, as células podem repará-lo ou, quando este for irreversível, morrer ou entrar em senescência (dependendo da intensidade do dano). Neste sentido, a senescência é um dos mecanismos celulares desenvolvidos para suprimir a proliferação de células mutadas e potencialmente tumorais (Campisi, 2001; Collado e col, 2007; Collado e col, 2010).

Consistente com o seu papel na inibição do câncer, o processo da senescência é controlado por vários genes supressores tumorais, especialmente *TP53* e *pRB*, cujas proteínas estão presentes nas duas vias principais de supressão tumoral, a ARF/p53 e a INK4a/pRB (Campisi, 2001; Collado e col, 2007). O locus INK4a/ARF, por sua vez, codifica dois supressores tumorais críticos: (i) p16^{INK4a} e p15^{INK4b}, inibidores de CDK4 e CDK6 que atuam ativando a parada no ciclo celular em G1; e (ii) o p19^{ARF} que regula a estabilidade de *p53* (Collado e col, 2007). Apesar de terem um ponto final em comum, as vias são independentes e interagem em vários pontos fazendo com que o atraso ou

o bloqueio da senescência não ocorre somente com a inativação da *p53* ou da *pRB*, mas também quando os componentes chave de qualquer uma das vias como, por exemplo, as proteínas *p21* ou *INK4a*, são inativadas (Campisi, 2001) (**Figura 10**).

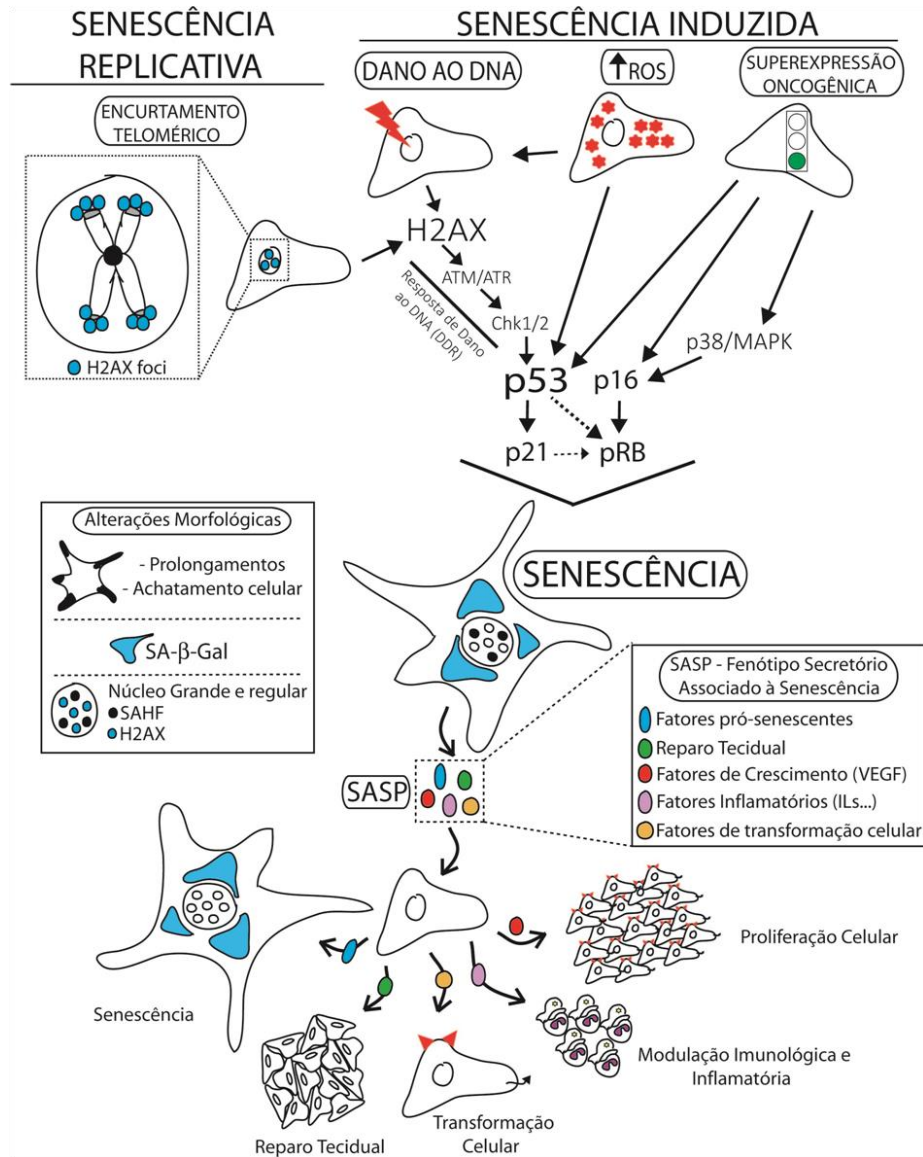


Figura 10. Visão geral do processo de senescência. Esse processo é ativado após o recebimento de sinais, como por exemplo, dano ao DNA ou encurtamento dos telômeros que por sua vez, geram uma cascata de sinalização culminando num ponto comum que envolve as proteínas *p53* ou *pRB* no final. Como as células senescentes não proliferam mais, elas podem contribuir para a manutenção e crescimento tumoral de maneira indireta, através da secreção de moléculas pró-tumorais presentes no chamado Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP), ocasionado reparo tecidual, transformação celular, modulação imunológica e inflamatória, proliferação celular ou até mesmo permanecendo senescente (Filippi-Chiela, Tese de Doutorado, 2014).

No caso das células tumorais, ocorre a perda da função das proteínas *p53* e/ou *pRB* a fim de superar a barreira proliferativa imposta pela senescência celular (Campisi, 2001). Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que níveis mais elevados do oncogene *Ras* ativam o processo da senescência, resultando em tumores malignos quando as vias de indução da senescência são interrompidas (Collado e col, 2007; Collado e col, 2010). De fato, a senescência restringe a progressão do tumor, podendo ser utilizado como um marcador útil para o estadiamento do mesmo. Neste sentido, existe uma associação entre a presença de células senescentes e estágios pré-malignos de desenvolvimento tumoral, sendo que, os tumores malignos que de alguma forma evoluíram evadindo a senescência, podem ser forçados ao processo caso as vias oncogênicas críticas forem desativadas ou, caso os supressores tumorais forem restaurados (Collado e col, 2007; Collado e col, 2010).

A quimioterapia clássica muitas vezes induz a senescência em doses moderadas e apoptose em níveis mais altos, porém, de acordo com resultados demonstrados nos modelos *in vivo*, esse mecanismo desempenha um papel importante no tratamento. Além disso, os fármacos indutores de senescência têm se mostrado eficazes quando utilizados sozinhos ou em combinação com outros quimioterápicos clássicos, podendo oferecer uma oportunidade para reduzir a toxicidade deste tipo de tratamento (Collado e col, 2010).

Por outro lado, apesar de células senescentes não proliferarem mais e, em função disso, não contribuirão diretamente para o crescimento do tumor, elas podem acabar contribuindo para a manutenção e crescimento do tumor de maneira indireta, através da secreção de moléculas pró-tumorais presentes no chamado Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP). Entre essas moléculas estão fatores de crescimento (VEGF, por ex), citocinas anti-inflamatórias pró-tumorais, moléculas anti-tumorais, entre outras. (Collado e col, 2007; Collado e col, 2010).

Dessa forma, a senescência celular é um estado estável e, na maioria das vezes, irreversível, de parada no ciclo celular que é prevalente em tumores pré-malignos, mas em grande parte ausente em tumores malignos. Sendo assim, existem boas evidências de que vários fármacos indutores de dano do DNA funcionam, pelo menos em parte, através da indução desse processo e, o desenvolvimento de fármacos

seletivos para a indução desse mecanismo, ao invés da indução na parada do ciclo celular ou da apoptose, pode ser uma boa opção terapêutica (Collado e col, 2007; Collado e col, 2010; Lenz, 2012).

1.6.6. Autofagia

1.6.6.1. Conceito

O termo autofagia é derivado das palavras gregas "auto" (si mesmo) e "fagia" (comer), ou seja, significa autodigestão celular (Levine e col, 2004; Mizushima e col, 2008; Rosenfeldt e col, 2011). A autofagia é caracterizada como sendo um processo adaptativo intracelular, geneticamente programado, coordenado por uma família de genes *ATG* e que resulta na degradação de componentes próprios celulares, tais como organelas envelhecidas ou danificadas e proteínas malformadas, dentro dos lisossomas. Esse processo tem como objetivo (i) permitir a renovação dos componentes celulares e (ii) prover aminoácidos, ATP, açúcar, nucleotídeos e precursores energéticos à célula em condições adversas (Mizushima, 2007; Mizushima e col, 2008; Galluzzi e col, 2015). Dessa forma, em condições extremas, tais como hipóxia, escassez de nutrientes, perturbações genéticas, toxinas ambientais ou dano no DNA (repare que são todas condições presentes em tumores sólidos), a autofagia é um importante processo que fornece substratos energéticos para a homeostase celular (Cuervo, 2004; Kondo e col, 2005; Vessoni e col, 2013; Zhang, 2013). Neste sentido, a autofagia exerce um papel fisiológico importante na manutenção da homeostase celular, além de participar de processos como a diferenciação celular, a remodelação de tecidos, o controle do crescimento, a defesa celular, além da adaptação a ambientes adversos (Cuervo, 2004; Mizushima, 2007).

Por outro lado, a autofagia pode ser citotóxica para as células quando em excesso (indução massiva ou prolongada), uma vez que ocorre a degradação massiva do complexo de Golgi, dos polirribossomas, do retículo endoplasmático e das mitocôndrias e o *turnover* de formação de novas organelas pode não ser rápido o suficiente, podendo levar à morte celular (Kondo e col, 2005; Yang e col, 2011). Dessa

forma, o motivo pelo qual o processo é ativado, a intensidade com que isso acontece e os alvos que serão degradados, são muito importantes para determinar se a autofagia será citoprotetora ou se ela será citotóxica/citostática (Pan e col, 2013; Vessoni e col, 2013).

Existem três tipos de autofagia, as quais são classificadas de acordo com a maneira como os substratos atingem o lúmen lisossômico.

a) Na **microautofagia** a própria membrana do lisossomo acaba se deformando e gerando uma invaginação, a fim de poder englobar os substratos citosólicos e, então realizar a degradação do conteúdo celular (Cuervo, 2004; Levine e col, 2004; Zhang, 2013).

b) Na **autofagia mediada por chaperonas** ocorre a ligação das proteínas citosólicas solúveis a um receptor na membrana do lisossomo que, por sua vez, irá mediar a translocação para o lúmen lisossomal, no qual existe uma segunda chaperona que será necessária para a translocação do substrato (Cuervo, 2004). Esse tipo de autofagia degrada, de forma seletiva, somente proteínas solúveis (Mizushima e col, 2008).

c) A **macroautofagia**, o mais comum e estudado dos tipos de autofagia, consiste de 5 etapas (**Figura 17A**): 1. **Nucleação**: os elementos citosólicos (organelas e citoplasma) começam a ser encapsulados por uma membrana intracelular chamada fagóforo ou membrana de isolamento; 2. **Alongamento**: o fagóforo alonga através da formação e interação de complexos protéicos (cujos principais membros são proteínas ATGs) com a membrana do mesmo; 3. **Fechamento** do fagóforo, formando o autofagossomo, uma organela com membrana dupla; 4. **Fusão** do autofagossomo com o lisossomo, formando o autolisossomo/autofagolisossomo; 5. **Degradação** dos componentes celulares. Após a degradação dos componentes, os produtos gerados são devolvidos ao citoplasma celular através das permeases presentes na membrana do lisossomo (Cuervo, 2004; Levine e col, 2004; Kondo e col, 2005; Grivicich e col, 2007; Mizushima, 2007).

Neste processo, formam-se diversos complexos protéicos envolvendo as proteínas ATGs, especialmente os complexos ULK e PI3K, envolvidos na etapa de nucleação, e o complexo ATG12-ATG5-ATG16L1, envolvido no alongamento da

membrana. Nas etapas seguintes, as proteínas mais importantes e estudadas são a Cadeia Leve da Proteína 1 Associada aos Microtúbulos 3a (*MAP1LC3* ou apenas *LC3*) e a *SQSTM1/p62*. Logo após a tradução, a proteína *LC3* é clivada pela proteína *ATG4*, permanecendo no citosol sob a forma de *LC3I*. A partir do estímulo autofágico, um fosfolipídeo (fosfatidiletanolamina – PE) é adicionado à *LC3I* pelas proteínas *ATG7* e *ATG3*, e a proteína *LC3II* acopla-se à membrana do fagóforo, levando ao seu fechamento e formação do autofagossomo. Por outro lado, a proteína *p62* interage tanto com componentes celulares que devem ser destinados à degradação autofagossomal, através do reconhecimento de ‘sinais de degradação’ (ubiquitinas), quanto com a proteína *LC3II* da membrana do fagóforo, formando uma ponte e levando os componentes para dentro do autofagossomo (**Figura 11B**).

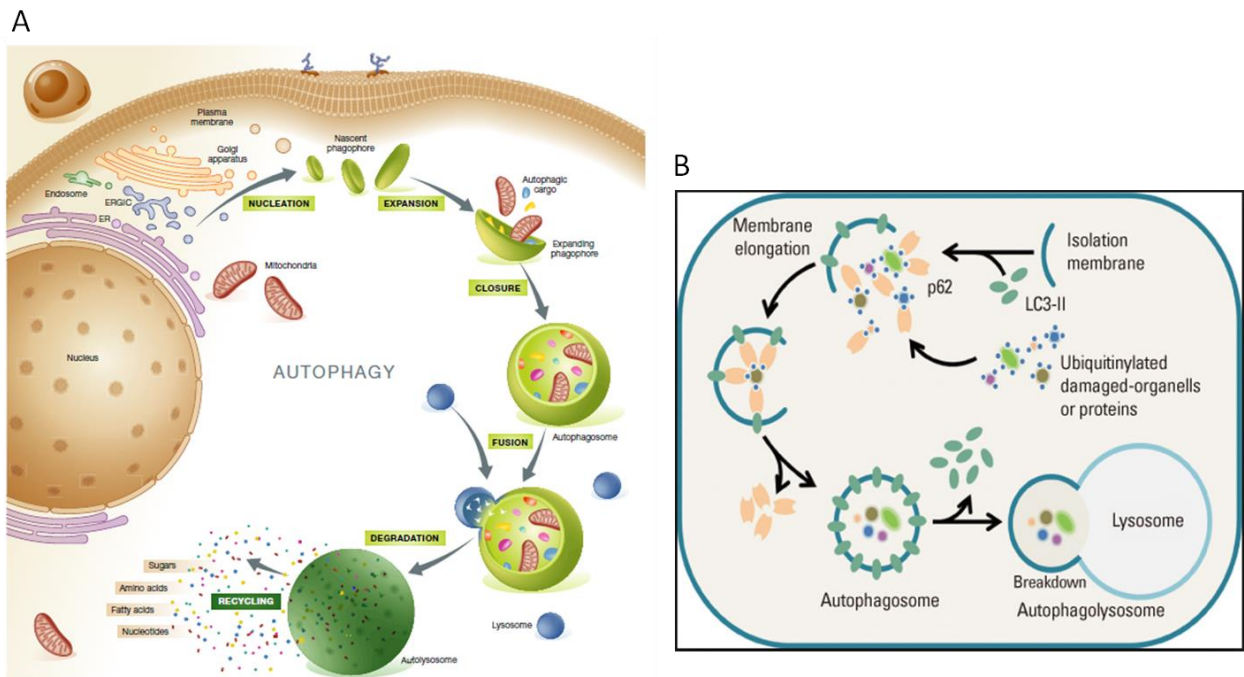


Figura 11. Mecanismo da autofagia. (A) O processo inicia com a formação de uma vesícula englobando os componentes a serem degradados (autofagossomo), a qual se funde com o lisossomo, dando origem ao autolisossomo, onde ocorre a degradação. Este é um processo benéfico pois elimina o lixo intracelular e permite a renovação de componentes celulares, além de prover aminoácidos e precursores energéticos às células (Galluzzi e col, 2015). **(B)** A proteína *LC3I* citosólica é convertida em *LC3II* após um estímulo pró-autofágico e se incorpora na membrana do autofagossomo. A proteína *p62*, por sua vez, é a marcadora dos componentes a serem degradados, e se liga nas organelas ou componentes celulares danificados, sendo reconhecida pela proteína *LC3II* da membrana do autofagossomo (Choi e col, 2013).

1.6.6.2. O papel da autofagia na carcinogênese

O papel da autofagia na manutenção da homeostase celular e integridade do genoma, impedindo a acumulação de proteínas e organelas danificadas, permite classificar o mecanismo como um processo quimiopreventivo e supressor da carcinogênese que funciona como uma barreira para evitar que transformações malignas iniciais ocorram em células normais. Um exemplo clássico deste processo envolve o processo de degradação de mitocôndrias por autofagia, onde mitocôndrias não funcionais podem ser a causa da produção aumentada de ROS que, por sua vez, podem não apenas danificar o DNA e causar mutações, mas também impactar em todas as fases da formação do tumor (iniciação, promoção e progressão). Neste sentido, a autofagia contribui para a eliminação dessas mitocôndrias, contribuindo para a estabilidade genômica, atuando, assim, como um mecanismo de supressão tumoral (Mizushima, 2007; Rosenfeldt e col; 2011; Yang e col; 2011; Vessoni e col; 2013; Zhang, 2013; Galluzzi e col; 2015). A superexpressão de *ATG6* (Beclina 1) em células de câncer de mama fez com que a autofagia fosse restaurada e a malignidade revertida, ou seja, a capacidade de desenvolvimento tumoral foi reduzida através da indução da autofagia (Cuervo, 2004; Kondo e col, 2005; Yang e col, 2011). De fato, alguns estudos recentes revelaram que tanto a *BECN1* como a *ATG5* funcionam como "guardiões" do genoma celular (Mizushima e col, 2008).

Por outro lado, nas células tumorais, especialmente durante o estágio de promoção tumoral, esse processo é ativado em resposta, por exemplo, ao estresse ambiental, favorecendo, assim, a progressão do câncer. De fato, as células tumorais que estão localizadas no meio da massa tumoral sofrem autofagia para sobreviver frente às condições hipóxia e falta de nutrientes as quais ocorrem devido à vascularização precária (Kondo e col, 2005; Rosenfeldt e col, 2011; Yang e col, 2011). Além do estágio do câncer, o nível de diferenciação celular, o tipo de tecido, as condições circundantes e a questão genética, podem influenciar a atividade autofágica nas células tumorais. Dessa forma, fica claro que autofagia tem um papel duplo na biologia tumoral (Rosenfeldt e col, 2011; Galluzzi e col, 2015; Cuervo, 2004) (**Figura 12A e B**).

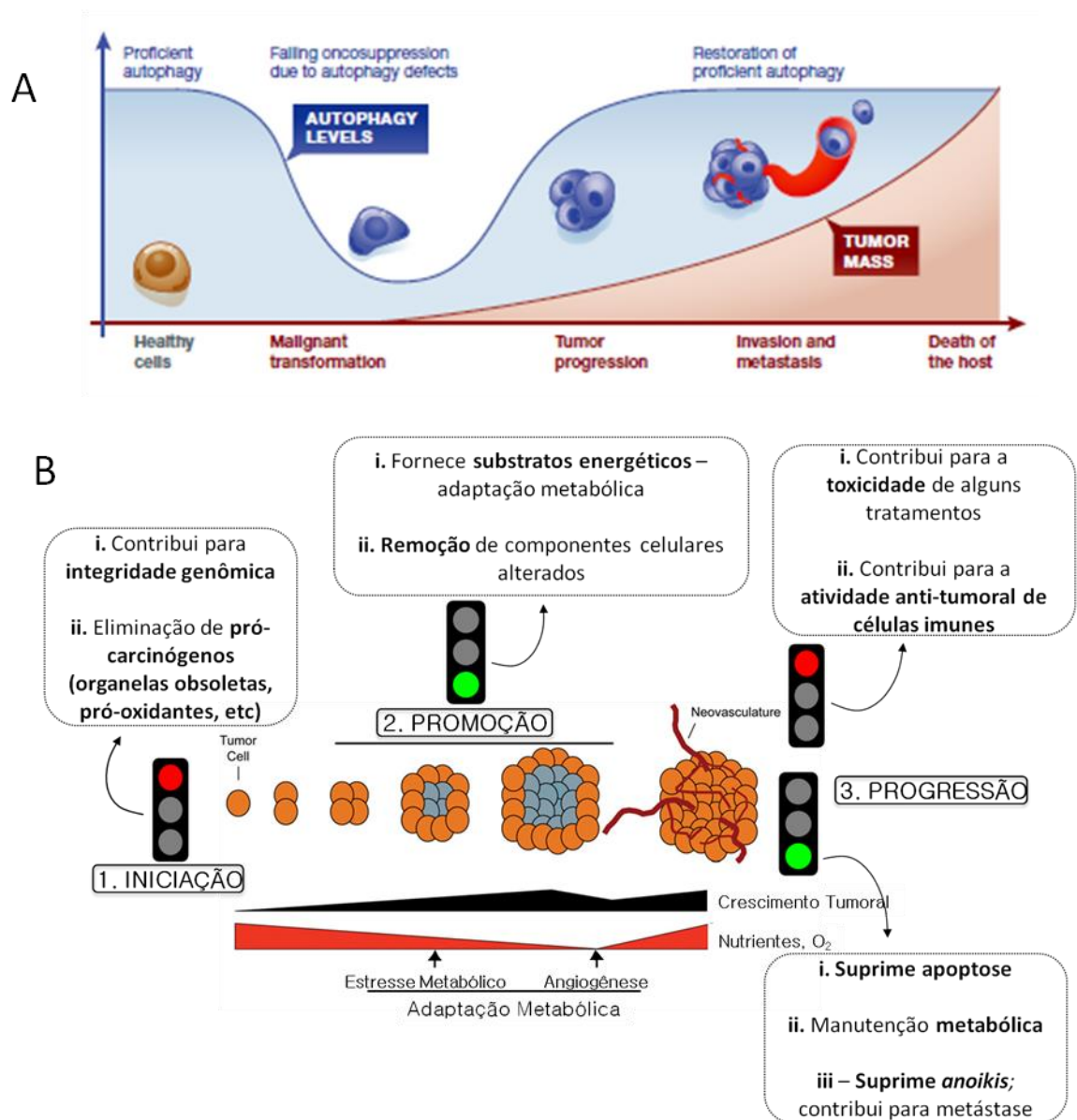


Figura 12. O papel da autofagia no câncer. (A) A autofagia é um processo fisiológico para a degradação e reciclagem de componentes celulares danificados, que visa a manutenção da homeostase celular em condições adversas (privação de nutrientes, presença de patógenos, e etc). Problemas no processo possibilitam a aquisição de características malignas em células saudáveis e, uma vez que isso acontece, o reestabelecimento da autofagia servirá para proteger as células malignas, possibilitando sua sobrevivência e progressão (Galluzzi e col, 2015). **(B)** Assim, a autofagia pode exercer um papel antitumoral ou pró-tumoral, dependendo da fase em que é ativada durante o desenvolvimento tumoral. Inicialmente, a autofagia atua prevenindo a formação de células pré-tumorais; já durante a promoção, contribui para a sobrevivência e manutenção tumorais, gerando um contexto adaptativo ao estresse metabólico pelo qual as células do tumor em crescimento são expostas. Finalmente, em um tumor sólido formado em progressão, a autofagia pode tanto contribuir para a sobrevivência celular quanto para o efeito citotóxico de determinados quimioterápicos (retirado da tese de doutorado de Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, PPGBCM-UFRGS, 2014).

1.6.6.3. Autofagia como potencial alvo terapêutico

Considerando a resposta à terapia, a autofagia é induzida por diversos quimioterápicos, incluindo 5FU e OXA em células de CCR (ver Tabela 1 e 2). Na maioria dos casos, a autofagia parece funcionar como um mecanismo de resistência à quimioterapia, inibindo a morte das células tumorais por apoptose e favorecendo a sobrevivência de células tronco tumorais, entre outros mecanismos (Galluzzi e col, 2015). Dessa forma, a inibição farmacológica da autofagia juntamente com o tratamento quimioterápico têm se mostrado uma opção terapêutica com amplo potencial, uma vez que tanto *in vivo* quanto *in vitro* os resultados com a combinação mostraram que houve a supressão do crescimento tumoral e a indução da morte celular em maior extensão do que quando comparado com a quimioterapia isolada (Thorburn e col, 2014; Filippi-Chiela e col, 2015). Estes dados levaram ao desenvolvimento de inúmeros ensaios clínicos combinando quimioterápicos com inibidores de autofagia (Ozpolat e col, 2015).

Vários inibidores e ativadores farmacológicos, tais como a rapamicina, a 3-metiladenina (3MA) e a cloroquina (CQ) têm sido estudados a fim de investigar a relação entre a modulação da autofagia e o câncer (Zhang, 2013). Esses inibidores podem ser classificados de acordo com a fase de atuação, ou seja, existem aqueles que inibem a fase inicial do processo da autofagia, como por exemplo o 3MA, que é um inibidor de PI3K e impede a formação do autofagossomo, e àqueles que inibem a fusão tardia dos autofagosomos com os lisossomos, tais como a CQ ou hidroxicloroquina (HCQ) que impedem a acidificação dos lisossomos e a bafilomicina A₁ a qual é um inibidor específico da ATPase vacuolar (Kondo e col, 2005; Yang e col, 2011).

Yang e colaboradores (2011) comentam que a tolerância ao estresse relacionado à autofagia, permitindo a sobrevivência celular, mantendo a produção de energia e gerando resistência terapêutica, já foi mostrado em modelos pré-clínicos onde a inibição desse mecanismo, através de meios genéticos ou farmacológicos, restaurou a quimiossensibilidade e aumentou a morte celular apoptótica das células tumorais. Além disso, vários ensaios clínicos de fase inicial em humanos que avaliam essa mesma inibição, utilizando HCQ em combinação com quimioterapia, estão em andamento.

1.7. ESTUDOS CRÔNICOS X ESTUDOS AGUDOS *in vitro*

Estudos de biologia tumoral *in vitro* se baseiam, em sua maioria, na análise do mecanismo de morte celular induzido por diferentes compostos citotóxicos. Entretanto, mais importante do que entender como as células tumorais morrem é entender os mecanismos envolvidos na resistência celular a estes agentes. Considerando o comportamento tumoral clínico, estudos *in vitro* do comportamento de células tumorais após a exposição a agentes quimioterápicos deveriam incluir análises com acompanhamento crônico das células tratadas. De fato, Augustine e colaboradores (2009), demonstraram não existir correlação alguma entre a resposta clínica de pacientes com melanoma expostos ao quimioterápico Temozolomida e os efeitos observados agudamente *in vitro*. Por outro lado, a resposta clínica correlacionou positivamente com estudos *in vitro* por períodos maiores (12 dias, no caso específico deste estudo) (Augustine e col, 2009).

Apesar disso, nenhum estudo a longo prazo e seguindo o regime de tratamento com 5FU e OXA foi encontrado na literatura para análise do comportamento de células de CCR *in vitro*. Em função disso, nós objetivamos analisar a resposta a longo prazo de células de CCR expostas ao perfil de tratamento semelhante àquele utilizado na clínica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta de células de CCR expostas ao tratamento com 5FU e OXA, em perfil semelhante àquele utilizado na clínica, em prol de entender a resposta das células a longo prazo.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente projeto, utilizando células de CCR expostas ao tratamento com 5FU e OXA são:

- i. Avaliar os efeitos agudo e crônico dos tratamentos na proliferação celular e clonogenicidade das células tumorais;
- ii. Avaliar o efeito dos tratamentos no ciclo celular;
- iii. Avaliar a indução de apoptose, ROS, senescência e autofagia pelos diferentes tratamentos;
- iv. Modular a autofagia para avaliar o papel do mecanismo na resposta aos tratamentos.

3. ESTRATÉGIA DE AÇÃO

A estratégia de ação envolve duas etapas: **etapa 1** – exposição às drogas (48h) e **etapa 2** – crescimento das células tratadas em meio livre de droga (15d), para simular o período ‘entre ciclos de quimioterapia’, em que o paciente (e as células) permanecem em recuperação. Durante a fase de tratamento (etapa 1), as células foram expostas ao tratamento, por 48h, com doses clinicamente relevantes (**Figura 13**). Após, as células foram lavadas e replaqueadas em Meio Livre de Droga (MLD), simulando o período de recuperação do paciente. Durante este período, tanto no paciente quanto *in vitro* as células tumorais seguem respondendo à quimioterapia, sendo assim, é durante esta etapa que investigamos a proliferação celular, autofagia, morte celular, geração de ROS e senescência nas células tumorais. Esta etapa é fundamental para atingirmos dois objetivos maiores do nosso grupo de pesquisas: (i) entender o papel destes mecanismos na resistência à terapia com 5FU e OXA; e (ii) modular os mecanismos acima com o objetivo de aumentar a sensibilidade celular essa terapia.

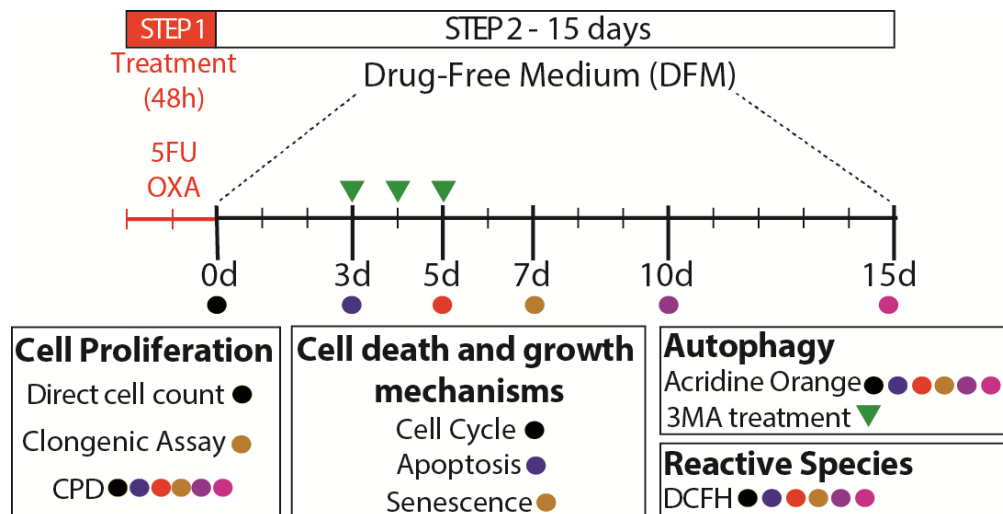


Figura 13. Desenho experimental. As células foram expostas ao tratamento com 5FU e OXA, semelhante ao tratamento FOLFOX utilizado em pacientes acometidos por CCR. O desenho experimental incluiu 2 etapas: **Etapa 1** – período de exposição das células às drogas, por 48h. Após esse período o meio foi recolhido, as células foram lavadas com PBS 1x e realizou-se a segunda etapa. **Etapa 2** – replaqueamento em Meio Livre de Droga (MLD) por duas semanas, para simular o período de recuperação do paciente. Nessa etapa realizamos a análise da proliferação celular, autofagia, morte celular, geração de ROS e senescência nas células tumorais, conforme experimentos indicados.

4. HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

4.1. HIPÓTESE

De acordo com a literatura, **(i)** a indução da apoptose em células tumorais é aumentada após o tratamento com 5FU e OXA, porém em todos os modelos testados há uma determinada proporção de células que sobrevivem aos tratamentos (Li e col, 2010; Roh e col, 2012; Pan e col, 2013); **(ii)** 5FU e OXA induzem autofagia em células tumorais, parecendo proteger as células da morte celular (Li e col, 2010; Ding e col, 2011). O papel da autofagia e o *link* dela com outros mecanismos de morte e proliferação celular, especialmente considerando o regime clínico com 5FU e OXA, não é conhecido. Dessa forma, partimos da hipótese de que as células de CCR expostas a esse tratamento alteram o mecanismo de autofagia em prol de resistir ao tratamento e levar à recorrência tumoral. Para modular racionalmente a autofagia e seu *crosstalk* com outros mecanismos é necessário entendermos o efeito do tratamento sobre os mesmos.

4.2. JUSTIFICATIVA

Apesar da sensibilidade das células de CCR ao tratamento com 5FU e OXA, a taxa de recorrência tumoral, causada pela resistência de uma pequena porcentagem das células da massa tumoral, é elevada. Assim, entender os mecanismos celulares que medeiam tal resistência é fundamental para permitir a modulação dos mesmos e superar esse processo, sendo que, dentre os mecanismos de resistência estão alterações na autofagia celular.

É importante destacar que a presente proposta faz parte de um objetivo maior que visa investigar e modular mecanismos envolvidos na resistência de células de CCR a **múltiplos ciclos** de tratamento com 5FU e OXA em perfil de tratamento semelhante ao utilizado clinicamente.

5. CAPÍTULO I - The response of colorectal cancer cells to 5-fluoruracil and oxaliplatin mimicking the clinical schedule involves the induction of apoptosis, senescence and cytoprotective autophagy

The response of colorectal cancer cells to 5-fluoruracil and oxaliplatin mimicking the clinical schedule involves the induction of apoptosis, senescence and cytoprotective autophagy

Andréa Baldasso Zanon¹; Nayara Franco¹; Patrícia Luciana da Costa Lopez^{1,2,3}; Guido Lenz⁴;
Eduardo C. Filippi-Chiela^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina UFRGS, UFRGS;

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

³Instituto Nacional de Medicina Translacional (INCT-TM);

⁴ Department of Biophysics and Center of Biotechnology, UFRGS.

* Corresponding author: Eduardo Cremonese Filippi-Chiela. MSc. PhD

PPG Gastroenterologia e Hepatologia - Faculdade de
Medicina -Hospital de Clínicas de Porto Alegre - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2350

CEP: 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

TEL: +55 51 30128435

e-mail: eduardochiela@gmail.com

ABSTRACT

Colorectal carcinoma (CRC) responds for the third highest mortality rate among all cancers. The most commonly used chemotherapy regimen is FOLFOX (5-fluorouracil + oxaliplatin + leucovorin), which is given for 2 days, followed by 15 days of recovery for the patient. Despite the sensitivity of CRC cells to this treatment, the rate of tumor recurrence is high and understanding the cellular mechanisms involved in the response to this treatment is very important to reduce tumor resistance. Here we evaluate the response of CRC cells exposed to 5-fluorouracil (5FU) and oxaliplatin (OXA) in a schedule similar to the clinical treatment in order to understand the cellular mechanisms involved in the chronic response. To this, HCT116 and HT29 CRC cell lines were treated for 48h with clinically relevant concentrations of 5FU and OXA, followed by replating in drug-free medium for 15 days. During this period, cell proliferation and cell cycle analyzes were performed, as well as the analysis of autophagy, cell death, senescence and intracellular reactive species production. 5FU and OXA did not have an additive acute cytotoxic effect. On the other hand, co-treatment had a strong additive chronically, also suppressing the clonogenicity of CRC cells. This additive effect was evoked by the combination of apoptosis induction and senescence. Despite this effect, cells from all treatments regrowth from day 7 onwards. In addition to this, treatments induced a transitory increase of autophagy and reactive species, reaching a peak at days 4 to 6. The rational suppression of autophagy during its peak of induction strongly reduced the clonogenicity and growth of cells that survived to the co-treatment, as well as to single treatments. In conclusion, the results showed that the additive effect of the 5FU and OXA treatment is mediated by the combined induction of apoptosis and senescence. Cells surviving acute cytotoxicity triggered autophagy, which acted to protect cells from cell death. Thus, the rational modulation of autophagy has an important potential to increase the efficacy of the treatment with 5FU and OXA in CRC cells.

Keywords: colorectal carcinoma; 5-fluorouracil; oxaliplatin; autophagy; apoptosis; senescence; long term; resistance

Colorectal carcinoma (CRC) is among the three most frequent and deadly types of cancer in the world, reaching more than 1 million people per year, with about one third of the CRCs being rectal (André et al., 2009; Markowitz et al., 2009; Cunningham et al., 2010; Roh et al., 2012; Tamas et al., 2015). Approximately 20 to 25% of the patients present metastasis at the time of diagnosis and between 50 to 60% of the remaining patients develop metastasis throughout the tumor development (Tournigand et al., 2004; Van Cutsem, Oliveira et al., 2005; Yoo, Lopez-Soler et al., 2006; Van Cutsem and Oliveira, 2008; Cunningham et al., 2010; Sanoff et al., 2013). CRC develops from a benign adenomatous polyp, which turns into an advanced adenoma with high-grade dysplasia and then progresses to invasive cancer (stages I and II). This type of cancer is curable, but if left untreated, they spread to the regional lymph nodes (stage III) and then metastasize to distant sites (stage IV) (Markowitz et al., 2009).

The primary therapy of choice for CRC treatment depends on the stage at which it is found. Tumors in stages I and II are curable by surgical excision and up to 73% of stage III disease cases are curable by surgery combined with adjuvant chemotherapy. Recent advances in chemotherapy have improved survival, but stage IV disease is generally incurable (André et al., 2009; Markowitz et al., 2009; Cunningham et al., 2010; Roh et al., 2012). The first-choice treatment depends on the tumor stage, and the most commonly used chemotherapy regimen is FOLFOX (5-fluorouracil + oxaliplatin + leucovorin), which is given for 2 days followed by 2 weeks of recovery for the patient in repeated cycles of 6 to 12 times (Loree et al., 2014; Cunningham et al., 2010).

5FU inhibits the thymidylate synthase enzyme, thus blocking the biosynthesis of DNA. In addition to this, metabolites from 5FU are incorporated into the DNA, leading to mispair, and into the RNA, leading to failures in the transcription (Longley et al., 2003). OXA, in turn, induces DNA inter-strand cross-linking (OXA), leading to the activation of DNA damage response, the inhibition of cell proliferation and cell death (Van Cutsem and Oliveira, 2008; Roh et al., 2012; Loree, Mulder et al., 2014). The ultimate cellular mechanisms triggered by 5FU and OXA include cell cycle arrest, apoptosis and autophagy induction (Mhaidat et al., 2014; Li et al., 2010; Alcindor et al., 2011). Folinic acid is a vitamin administered concomitantly with OXA, stabilizing the binding of 5FU to thymidylate synthase, thus potentiating the effect of 5FU (Roh et al., 2012).

Despite the clinical relevance of this therapeutic regimen, the long term response of CRC cells after the period of exposure to the drugs is poorly known. In this sense, in recent years the mechanism of autophagy has emerged as a common response observed in cancer cells exposed to DNA damage therapy. In this sense, both 5FU and OXA induce acute autophagy in CRC cells, and its inhibition triggers apoptotic death (Shi et al., 2012), as observed in numerous other models of DNA damage-induced autophagy (Li et al., 2010; Vessoni et al., 2013). However, chronic alterations and the role of autophagy in the response to 5FU and OXA are far from clear.

Thus, here we evaluate the response of CRC cells exposed to 5FU and OXA in a schedule similar to the clinical treatment in order to understand the mechanisms of action triggered after the treatment.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

HCT116 and HT29 cell lines were kindly provided by Annette Larsen from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Paris. The status of key tumor suppressors and oncogenes in these cells is shown in Table 1. Cells were cultured in DMEM low glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin and 0.1% gentamicin at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator.

	<i>TP53</i>	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	<i>APC</i>	<i>PTEN</i>
HCT116	WT	MUT	WT	WT	WT
HT29	MUT	WT	MUT	MUT	WT

Table 1 - Genetic profile of HCT116 and HT29 cells. The status of the *TP53*, *KRAS*, *BRAF*, *APC* and *PTEN* is shown. WT - wild type; MUT - mutated. (Ilyas, Tomlinson et al. 1997; Liu Y e tal. 2006)

Cell treatments

The cell lines were treated with 5FU, OXA or the combination of these drugs for 48h. Based on the literature and preliminary curves of dose-response (a pilot study was performed to verify the behavior of the cells as well as to confirm the doses that would be used - data not shown), we treated cells with the following doses: HCT116 - 10µM of

5FU, 5 μ M of OXA and the combination of these drugs; HT29 - 20 μ M of 5FU, 10 μ M of OXA and the combination of these drugs. Control cells were treated with the vehicle (DMSO) at a maximum concentration of 0.5% (v/v). Hereafter, analysis performed at the end of the period of exposure to the drugs (48h) are referred as `acute` analysis or responses (**Figure 1 – step 1**).

For long term experiments, cells were washed twice with PBS 1x, trypsinized, counted and replated in Drug-Free Medium (DFM). Data from this first cell count, performed in a hemocytometer, was considered as the short-term count (48h). After that, the experiments were performed at the indicated times, as shown in the **Figure 1 (step 2)**. Hereafter, analysis performed along this period are referred as `chronic` or `long term` response.

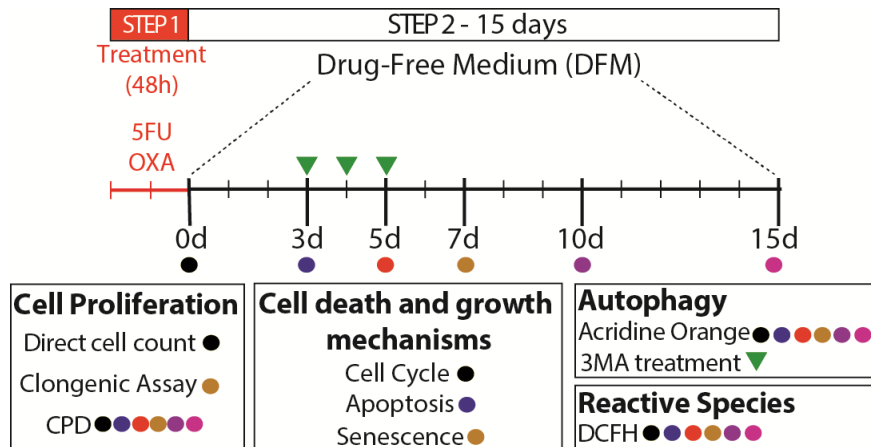


Figure 1. Experimental design. HT29 and HCT116 cells were exposed to 5-Fluoruracil (5FU), oxaliplatin (OXA) or the combination for 48h. After this, **acute responses (STEP 1)** were assessed (cell number, cell phenotype, autophagy, cell cycle, reactive species). Treated cells were then washed with PBS 1x and replated in Drug-Free Medium (DFM) for 15 days (**chronic response – STEP 2**), during which cellular mechanisms and processes were assessed at the indicated times (cell proliferation, autophagy, reactive species levels, apoptosis and senescence). All figures along the manuscript (from Figure 2 to 11) have a timeline to depict the experimental design performed in each figure.

Both cell line were also treated with the autophagy inhibitor 3-methyladenine 2mM (3MA, M9281, purchased from Sigma, PI3KIII kinase inhibitor), for 1h at days 3, 4 and 5 (peak of autophagy found in the experiment). After each incubation of 1h, the reagent was withdrawn, and complete DMEM was added to the well. Results are shown in Figure 11.

Cell Proliferation assay – Cumulative Population Doubling (CPD)

After medium removal, cell counting was performed in a Neubauer chamber, to assess the acute response. Subsequently, treated cells were washed twice with PBS, harvested and plated in DFM. After 0 (48h), 3, 5, 7, 10 and 15 days, the number of cells and the CPD were determined, as previously described (Zamin et al. 2009), according to the formula $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$, where $N(t)$ is the number of cells per well at the time of the count (passage) and $N(t_0)$ is the initial number of the cells. The sum of PDs was then plotted against the time of culture.

Clonogenic assay

For clonogenic assay, after medium removal, cells were washed twice with PBS, harvested and plated in drug-free medium. After 7 days, cells were trypsinized, counted and replated at a density of 10^2 cells/well in a 6-wells plate. After 12 days, colonies were fixed with cold methanol, followed by staining with 1% crystal violet. The number of colonies was counted manually and colonies were photographed to calculate their area, using the Image Pro Plus 6.0 (IPP6) software.

Cell cycle analysis

For cell cycle analysis, after medium removal were trypsinized, transferred to an eppendorf and centrifuged at 1400 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended with PBS and exposed to another centrifugation at 1400 rpm for 5min. The supernatant was discarded again and the cells were fixed with cold ethanol 70% (v/v in PBS) under vortexing. The cells were stored in the freezer at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for at least 2 hours for appropriate fixation. Fixed cells were centrifuged at 1400 rpm for 5min, washed once with PBS and the pellet was marked with a solution containing 50 $\mu\text{g/ml}$ PI, 0.1% Triton X-100 and 50 $\mu\text{g/ml}$ RNase for 30 min, in the dark, at room temperature. Marked cells were analyzed, after 48h, using the Attune flow cytometer. Doublets were excluded in a PI area versus PI width graph.

Annexin V and propidium iodide staining

Apoptosis was assessed using the Annexin V-FITC and propidium iodide (PI) technique (kit da Santa Cruz Biotechnology), according to the manufacturer's protocol. In the early stages of apoptosis, the cell membrane remains intact (healthy) and it is impermeable to the DNA marker (PI). At this same stage, the phosphatidylserine externalization allows the binding of Annexin V-FITC. On the other hand, during necrosis cells take up PI because the cell membrane is ruptured. This may also occur in late apoptosis in vitro, since phagocytes are absent. Thus, we assume that cells that take up both fluorochromes are late apoptotic cells, while those cells that do not take up PI but bind Annexin V are early apoptotic cells (Roh et al., 2012). Apoptosis was assessed 3 days after the replating of treated cells in DFM. To this, the supernatant and trypsinized cells were transferred to an eppendorf, centrifuged at 1400rpm for 5min, washed with 1x PBS and centrifuged again at 1400rpm for 5min. The supernatant was discarded and the annexin binding buffer containing annexin (2.5 µl/sample) and propidium iodide (3 µM/sample) was added to the pellet. Cells were incubated at room temperature, in the dark, for 15 min. Marked cells were analyzed using the Attune flow cytometer.

DCF (dichlorofluorescein) assay

To measure the levels of reactive species, we performed the DCFH assay. The fluorescein derivative DCF (Sigma- Aldrich) is a non-fluorescent compound which is converted to a highly fluorescent DCF upon oxidation by oxygen or nitrogen reactive species. To perform DCF assay, cells were trypsinized, resuspended with culture medium DMEM 10% and centrifuged at 1200 rpm for 5 min. The supernatant was discarded and the cells were incubated with 10 µM DCFH-DA (in PBS 1x) for 20 min at 37°C, in the dark. Then, cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min with PBS 1x, the supernatant was discarded again e the pellet was resuspended with PBS 1x. After 0 (48h), 3, 5, 7, 10 and 15 days, the intensity of fluorescence was analyzed by flow cytometer.

SA- β -gal assay

For senescence measurement, we staining cells with the substrate of the Senescence-Associated Acid β -Galactosidase (SA- β -gal), a molecular named as 5-dodecanoylamino fluorescein di-betaD-galactopiranoside (C12FDG, Life Technologies). C12FDG emits green fluorescence when cleaved by the enzyme. Senescence was assessed 7 days after replating treated cells in DFM. To this, cells were incubated with C12FDG for 2h at 33 μ M in the CO₂ incubator. Marked cells were then trypsinized and analyzed using the flow cytometer. Results are presented as ratio of SA-beta-gal-positive cells.

Detection of acidic vesicular organelles (AVOs)

Acridine orange (AO) is a marker of AVOs that fluoresces green in the whole cell (cytoplasm and nucleus), but in acidic compartments (mainly late autophagosomes), suffers protonation, accumulates and emits red fluorescence. Thus, AO has been used as an indirect marker of the formation of autolysosomes for initial screening of autophagy levels (Thomé et al., 2016). To perform the AO experiment, cells were trypsinized and incubated with 2.7 μ M of AO for 15 min, in DMEM, at room temperature at the indicated times and analyzed, after 0 (48h), 3, 5, 7, 10 and 15 days, by flow cytometry. Data will be presented as the percentage of AO-positive cells. Red fluor intensity was also assessed.

Statistical Analysis

All experiments were performed at least three times independently. Statistical analysis was conducted by t test or ANOVA test followed by Tukey test. Analyses were performed using the SPSS 18.0 software program. 'p' value under 0.05 was considered significant.

RESULTS

5FU and OXA do not exert an additive cytotoxic effect acutely

We initially assessed the effect of the co-treatment with 5FU+OXA on cell number after the period of exposure to the drugs (48h) (**Figure 2A**). In the HCT116 cell line, which was more sensitive to the treatment than HT29 cells, there was a reduction of 77% and 50% in the number of cells after treatment with 5FU and OXA, respectively. The combination 5FU+OXA, in turn, reduced the number of cells in 82%, not differing from 5FU alone. A similar result was observed with the HT29 cell line, but with lower intensity. In this case, 5FU and OXA reduced, respectively, 48% and 31% the number of cells relative to the control, while the combination reduced 55%, not statistically differing from 5FU alone (**Figure 2B**). These data show that the combination, at least in short-time (48h), does not exert a cytotoxic additive effect compared to 5FU alone.

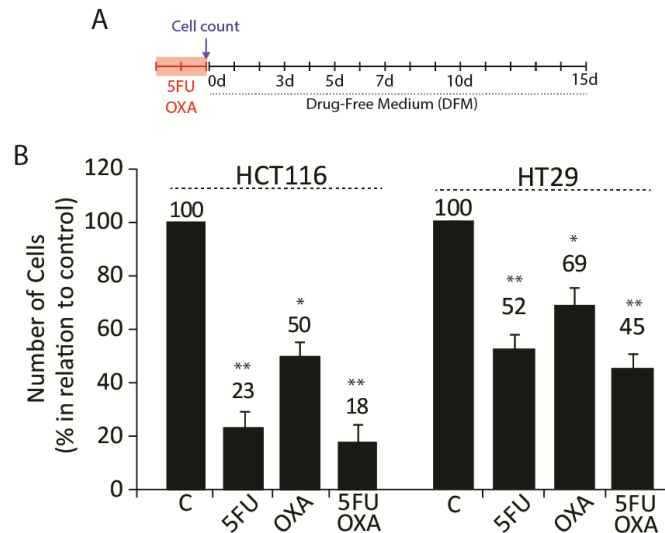


Figure 2. Cell count performed in 48h for HCT116 and HT29 cell line. (A) Cells were treated with 5FU, OXA and the combination of these drugs, in the following doses: *HCT116* - 10 μ M 5FU, OXA 5 μ M; *HT29* - 20 μ M 5FU, 10 μ M OXA; **(B)** After 48h the number of cells was determined by counting in a hemocytometer. Number of cells is shown as the percentage in relation to control, considered as 100%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5FU+OXA exert an additive cytotoxic effect at the long-term

After, we assessed the toxicity of the treatments at the long term, to measure the proliferative capacity of the cell population and single cells after the treatment. To this, we performed a Cumulative Population Doubling (CPD) assay (**Figure 3**) and the

clonogenic assay (**Figure 4**). CPD was performed along 15 days after the treatment, to mimick the clinical schedule (48h of treatment + 15d of recovery) (**Figure 3A**). As shown in **Figure 3B** and **C**, both cell lines were transiently sensitized after the treatment with 5FU and OXA. Similarly to the acute sensitivity, HCT116 cells showed a more pronounced sensitivity to the treatment also at long term. With the exception of HT29 cells treated with OXA, both cell lines respond to the treatment until day 7, from which an increase in the proliferation of the population occurred, in a profile that resemble tumor recurrence. Importantly, at the long term we observed a significant difference in the proliferation rate and the final CPD between the co-treatment in comparison to the treatments with isolated drugs.

We also analyzed the phenotype of cells along 15 days after the treatment. Initially, we looked to cell size and granularity based on flow cytometry parameters FSC (cell size) and SSC (cell granularity) (**Figure S1A**). Note that, in comparison to cells treated with single drugs, the number of cells with a phenotype that resemble the bulk of 'normal cells' (blue area) quite disappeared in the co-treatment in the HCT116 cell line (**Figure S1B** – red arrowheads indicate the time points where the population of normal cells quite disappeared); in HT29, which is less sensitive, this also occurred but in less extent (**Figure S1C**). However, in accordance with the CPD, this population of cells with normal phenotype reappeared at days 10 and 15 in both cell lines, suggesting the reacquisition of a normal and proliferative cellular phenotype.

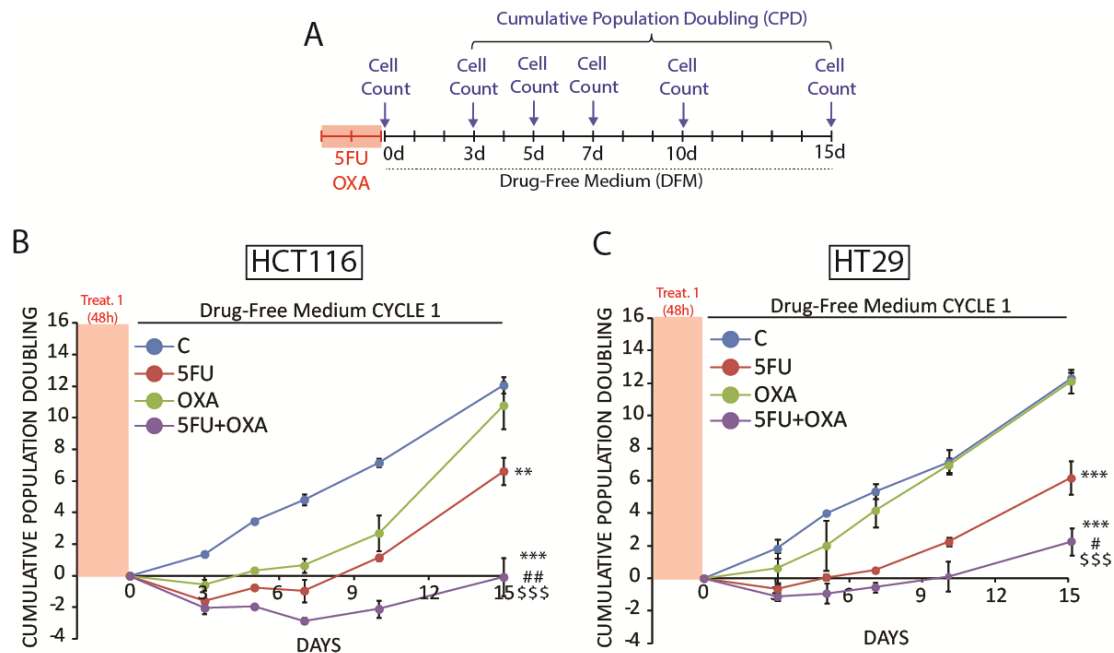


Figure 3. Cumulative Population Doubling in HCT116 and HT29 cell lines. (A) After treatment with 5FU, OXA and combination for 48h, cells were replated in drug-free medium. On days 3, 5, 7, 10 and 15, the number of cells was determined and (B) the population doubling cumulative was calculated. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (relative to control); ## $p < 0.01$ according to 5FU; \$\$\$ $p < 0.001$ according to OXA.

In order to verify the proliferative capacity of single cells that survived to the treatments, we performed a clonogenic assay from treated cells on 7th day (**Figure 4A**), once it was a common point of return of cell proliferative capacity (CPD curve). Corroborating data from CPD and acute cell counting, HCT116 cell line was more sensitive to the treatment with the 5FU and OXA when compared to the HT29 cell line. The co-treatment in both cell lines was more effective than the isolated drugs in reducing the clonogenic capacity of the cells, confirming that the combination of 5FU and OXA is more effective than the treatments alone at the long term (**Figure 4B** and **4C**). We also evaluated the area of the colonies (**Figure 4D** and **4E**). We found that the area of colonies formed from cells exposed to the co-treatment were smaller than the area of colonies formed from cells exposed to the treatments alone, suggesting that clones that survived to the co-treatment are less proliferative than clones that resisted to single treatments.

Summarizing, in both cell lines treatments reduced cell proliferation until day 7, followed by the regrowth and the return of a normal phenotype. Despite the regrowth, the rate of proliferation and the final CPD after 15 days was less pronounced to the co-

treatment. The co-treatment was also more effective in reducing the clonogenicity of the cells than the treatments alone.

OXA induces the accumulation of cells in G2/M and S-G2/M phases in HCT116 and HT29 cells, respectively, and 5FU induces G1 arrest in HT29 cell line

In an attempt to start to investigate the mechanisms underlying the additive effect of 5FU and OXA, we firstly assessed the distribution of cell cycle after 48h of treatment (**Figure 5A**). OXA induced the accumulation of cells in G2/M and S-G2/M phase in HCT116 (**Figure 5B**) and HT29 cells (**Figure 5C**), respectively. 5FU and the co-treatment induced the accumulation of cells in G1 phase in the HT29 cell line (Figure 5C), which was not observed in HCT116 cells. In conclusion, the effect of 5FU on the cell cycle prevails in the co-treatment; the acute modulation of cell cycle does not correlate with the chronic response of CRC cells to the treatments.

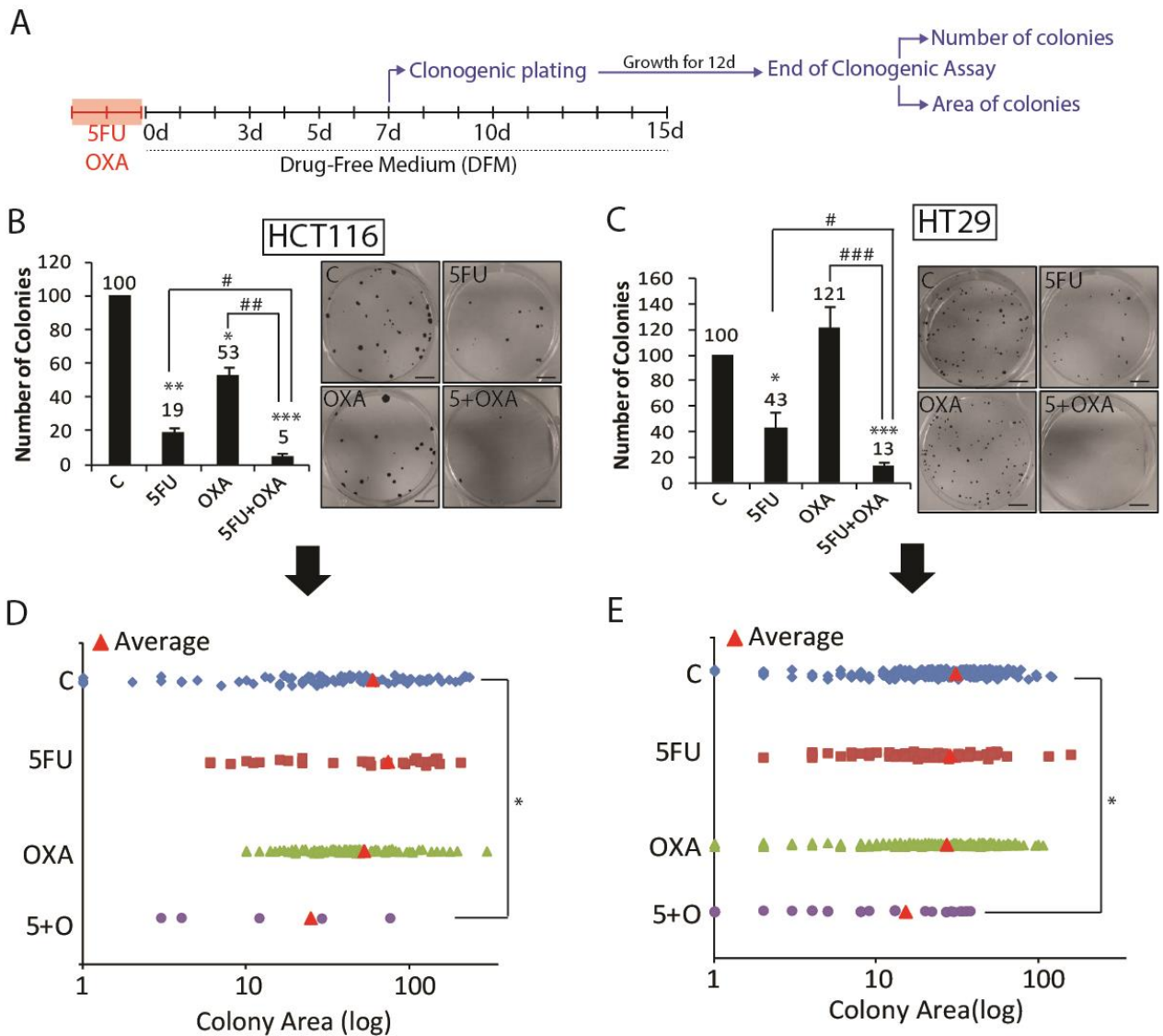


Figure 4. 5FU and OXA co-treatment reduces the clonogenic capacity additively. (A) After treatment with 5FU, OXA and combination for 48h, cells were replated in drug-free medium. On day 7 we plated 100 cells per well in a 6-wells plate. After 12d, colonies were fixed and stained with crystal violet. The number of cells and the area of colonies were determined. (B) HCT116 and (C) HT29; *Left* – number of colonies, shown as the percentage of colonies in relation to control. *Right* – representative images of colonies. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (relative to the control); # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ as indicated. (D) e (E) In this same day, the area of colonies was analyzed.

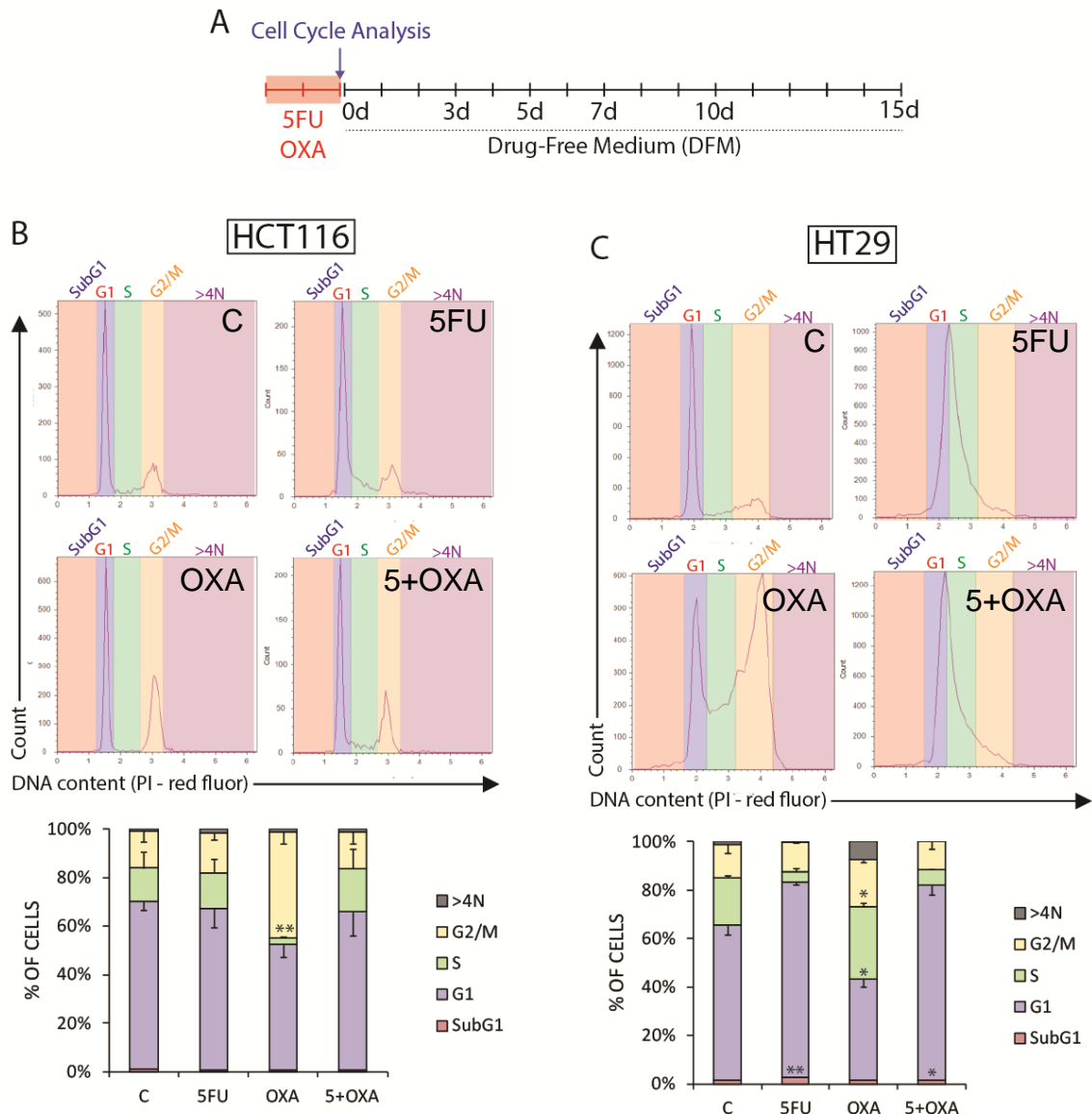


Figure 5. Cell cycle analysis of HCT116 and HT29 cells treated with 5FU and OXA. Cells were treated with drugs for 48h, followed by the analysis of cell cycle through flow cytometry using propidium iodide. **(A)** Experimental design. **(B)** HCT116 and **(C)** HT29. Up – Representative plots from flow cytometry. Bottom – data are shown as the percentage of cells in each phase of the cell cycle. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (relative to the control).

5FU and OXA do not exert an additive proapoptotic effect in CRC

It is well known that drugs that affect DNA integrity and biosynthesis usually trigger apoptosis in cancer cells. Thus, we assessed apoptosis 3 days (the lowest point in the CPD curve) after cell replating in DFM through co-labeling with annexin and propidium iodide followed by flow cytometry (**Figure 6A**). Cell phenotype suggests apoptosis induction by 5FU and co-treatment, in higher extent in HCT116 (**Figure 6B** –

images on top) cells than in HT29 (Figure 6C – images on top). We found that the HCT116 cell (Figure 6B) line was more sensitive to induction of apoptosis than HT29 (Figure 6C) cell line. However, despite an increase in the percentage of apoptotic cells in the co-treatment in relation to the treatments alone, this effect was not statistically different between 5FU isolated and its combination with OXA.

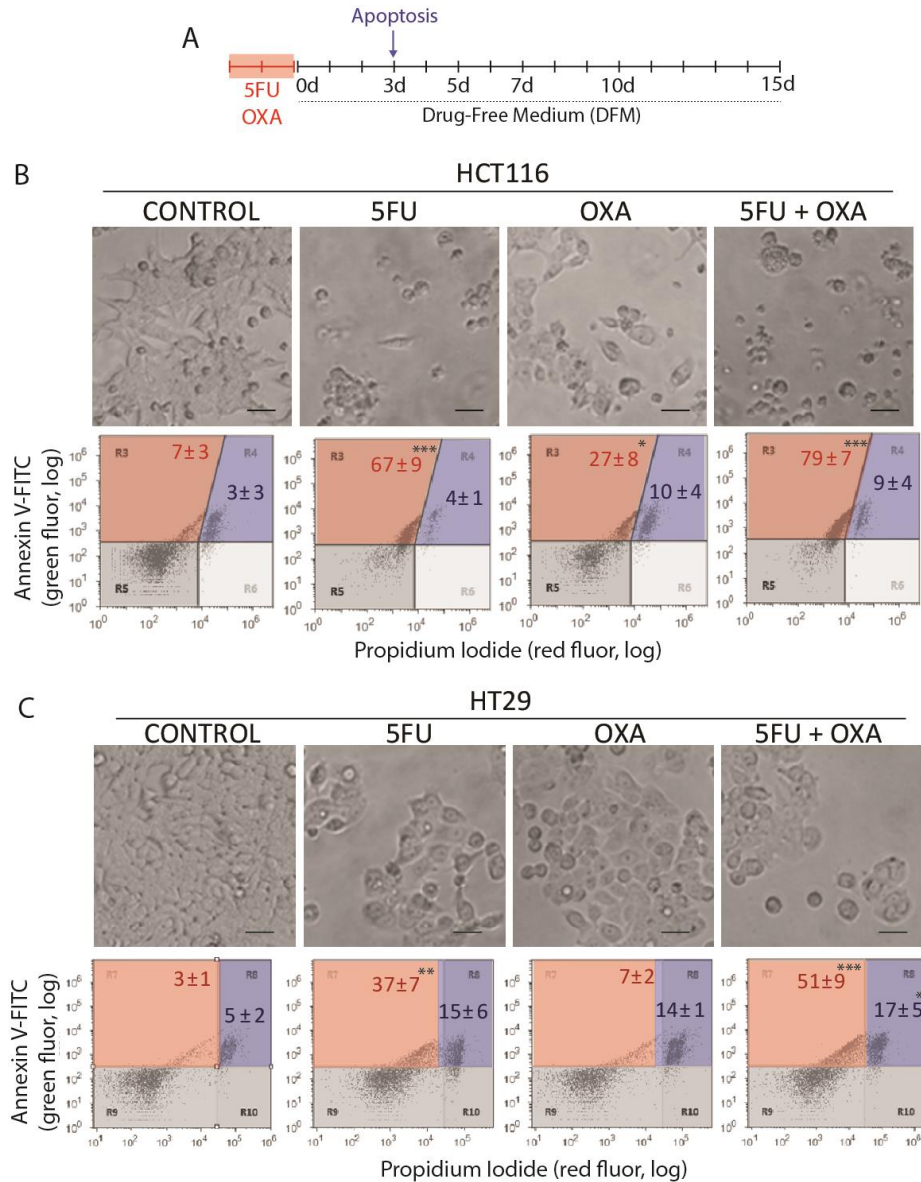


Figure 6. Cell phenotype and co-staining with annexin and propidium iodide of HCT116 and HT29 cells treated with 5FU and OXA. After 3 days in Drug-Free Medium, the percentage of cell death was determined by co-labeling with annexin V-FITC and propidium iodide, followed by flow cytometry. **(A)** Experimental design. **(B)** HCT116 and **(C)** HT29. *Top* – cell phenotype; note the cell shrinkage found in 5FU-treated cells and in the cotreatment. *Bottom* – plots from flow cytometry. Numbers indicate the percentage of cells in each quadrant (mean ± SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Intracellular reactive species (RS) production

Increasingly, studies have shown the induction of reactive species (RS) by chemotherapeutics, including 5FU and OXA, which exert a role in the effect of the drugs (Fu et al., 2014; Jiao et al., 2016). Then, we investigated intracellular RS production in CRC using DCFH-DA staining, a cell penetrating dye that becomes fluorescent after being oxidized by RS (**Figure 7A**). After 48h of treatment we did not find a significative increase in the DCF staining. On the other hand, we observed a transient robust increase of RS both in HCT116 (**Figure 7B**) and HT29 (**Figure 7C**), reaching a peak at day 7 and 5 for HCT116 and HT29, respectively. Importantly, co-treatment induced higher levels of RS in comparison to both treatments alone considering the area under the curve (**see the boxes on the bottom of graphs – Figure 7**).

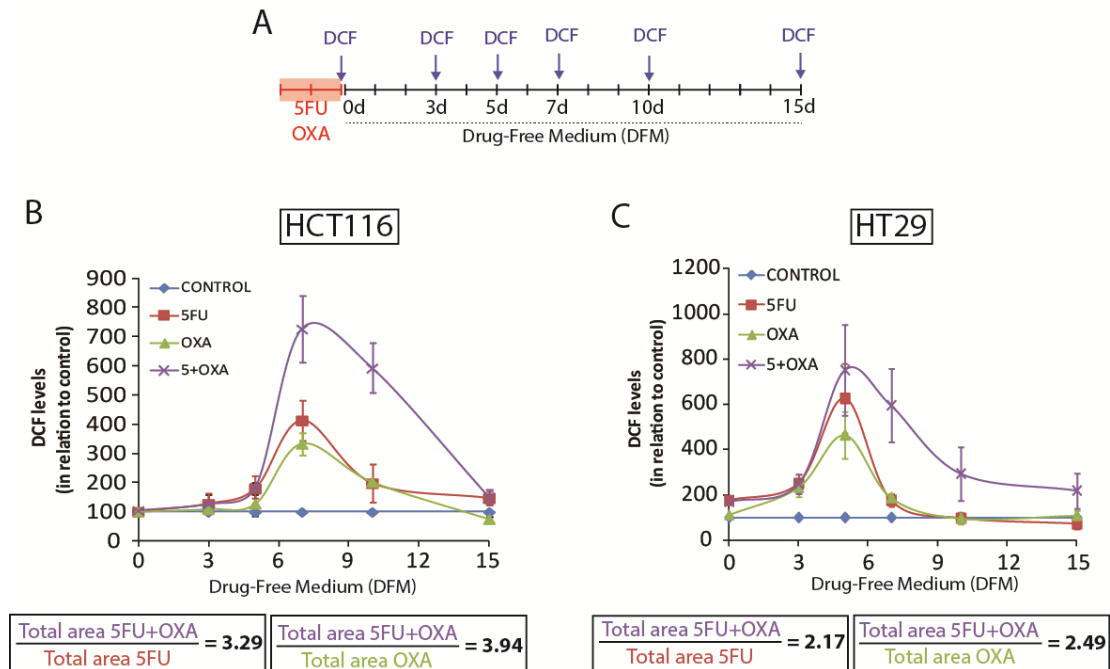


Figure 7. Long term intracellular RS assessed by DCF flow cytometry. After treatment with 5FU, OXA and combination for 48h, cells were replated in drug-free medium. On days 3, 5, 7, 10 and 15, levels of reactive species were assessed by DCF staining and flow cytometry. **(A)** Experimental design. **(B)** HCT116 and **(C)** HT29 - DCF intensity (green fluor) assessed by flow cytometry. Data are shown in relation to control, considered as 100%. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (relative to control); ## $p < 0.01$ according to 5FU; *** $p < 0.001$ according to OXA. Boxes at the bottom indicate the ratio between the total area under the curve of co-treatment in relation to single treatments.

Co-treatment induces senescence in CRC cell lines

While apoptosis usually is an acute response to DNA damage agents, senescence is an irreversible arrest that occurs at a long term. To evaluate senescence,

we incubated the cells with the substrate of the β -galactosidase enzyme, C12-FDG, followed by flow cytometer (**Figure 8A**). After 7 days (a common point of return of cell proliferative capacity shown in the CPD curve) in DFM, we observed an increase in the percentage of SA- β -gal-positive cells in response to OXA and 5FU, in higher extent in HCT116 cells (**Figure 8B** – gray area) than in HT29 cells (**Figure 8C** – gray area). The lower percentage of SA- β -gal-positive cells in the co-treatment in comparison to OXA alone in the HCT116 cell line is probably due to the massive apoptosis observed (as showed in Figure 6), which is also observed in histograms from **Figure 8B and C** (see the red area on the left region of the graph).

In addition to the increase of SA-beta-gal activity, senescent cells also became enlarged and flattened. In this sense, when we looked to cell size (FSC) in combination to SA- β -gal staining we found that only in HCT116 cell line the SA- β -gal-positive cells acquired an enlarged phenotype, and only in the co-treatment condition (**Figure 8D**). In HT29 cells, most SA- β -gal-positive cells did not show an increase in cell size, suggesting that these cells did not reach a complete senescent phenotype (**Figure E**). Indeed, the CPD (see Figure 3) for HT29 cells treated with OXA did not show a stationary cell growth curve, which would represent a senescent population. Also, in the co-treatment from 52% of SA- β -gal-positive cells only 19% increased cell size.

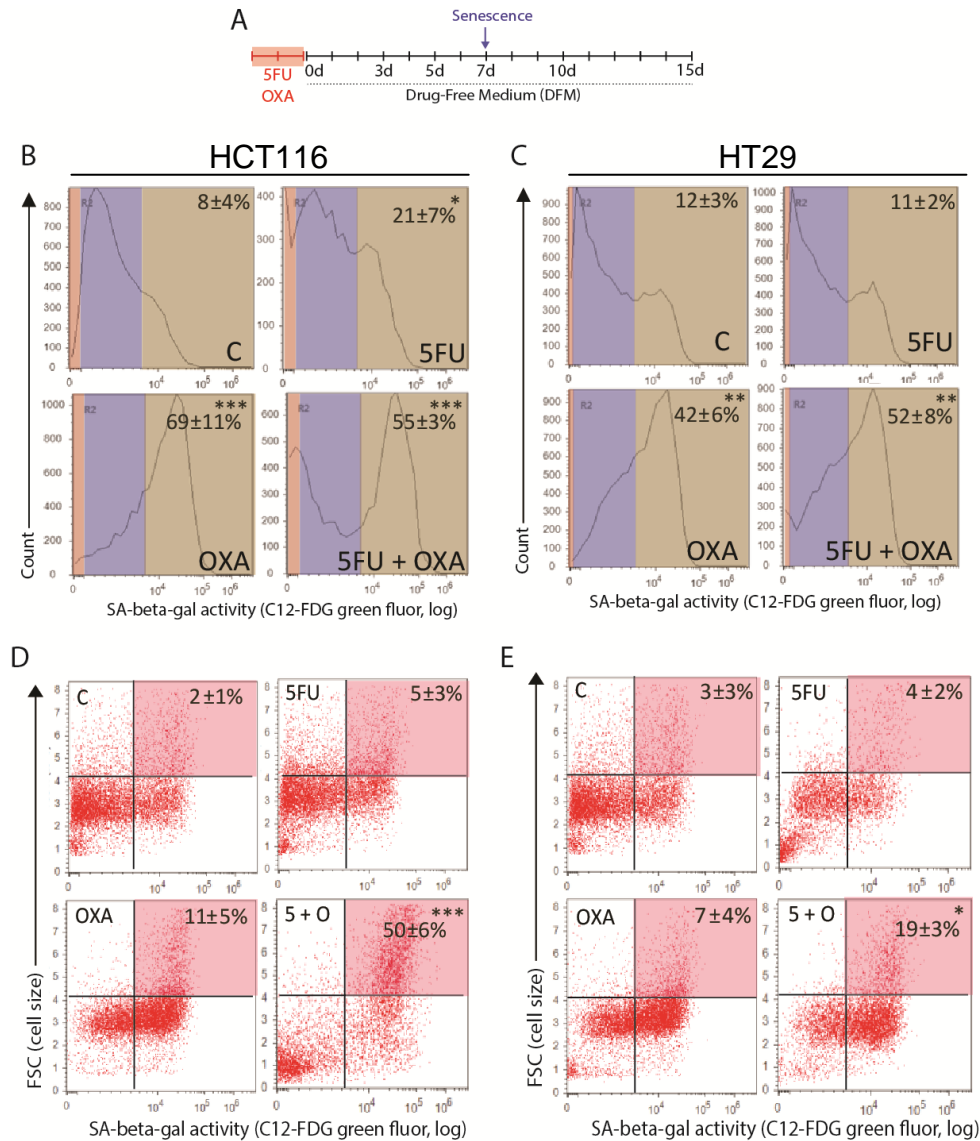


Figure 8. Levels of SA-β-gal activity based on the cleavage of C12-FDG substrate. Cells were incubated with the substrate of the β-gal enzyme after 7 days in DFM and analyzed on a flow cytometer. **(A)** Experimental design. **(B)** Levels of green fluorescence, which is proportional to the activity of the SA-beta-gal enzyme, which cleaves its fluorogenic substrate, C12-FDG. Red area indicates cells with low FSC (small, apoptotic cells); purple area indicates SA-β-gal-negative cells; gray area indicates SA-β-gal-positive cells. **(C)** FSC x SA-β-gal activity. Numbers represent the percentage of positive cells in each condition. Red area indicates SA-β-gal-positive and FSC^{high} cells. * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (relative to control).

5FU and OXA co-treatment induce an additive, transient increase of acridine orange staining and SSC at a long term

We next assessed the induction of autophagy by the treatments, both acutely (48h – **Figure 9A**) and at the long term (Figure 10). To this, we performed an Acridine Orange (AO) assay by flow cytometry. As an initial inference of autophagy induction, we

observed a robust increase in the side scatter (SSC) parameter of the flow cytometry, which is a marker of intracellular complexity, for both cell line and all treatments (**Figure 9B and 9C – left plots; see the increase of cells in the gray area**). Concerning AO data, we observed an increase in the percentage of AO-positive cells in both cell lines for 5FU and co-treatment (**Figure 9B and 9C – right graphs**). However, both the percentage of AO-positive cells and the intensity of AO red fluorescence did not differ between the co-treatment and the treatment with 5FU alone. This suggests that the acute effect of treatments on autophagy may not be related to the chronic effect of the treatments.

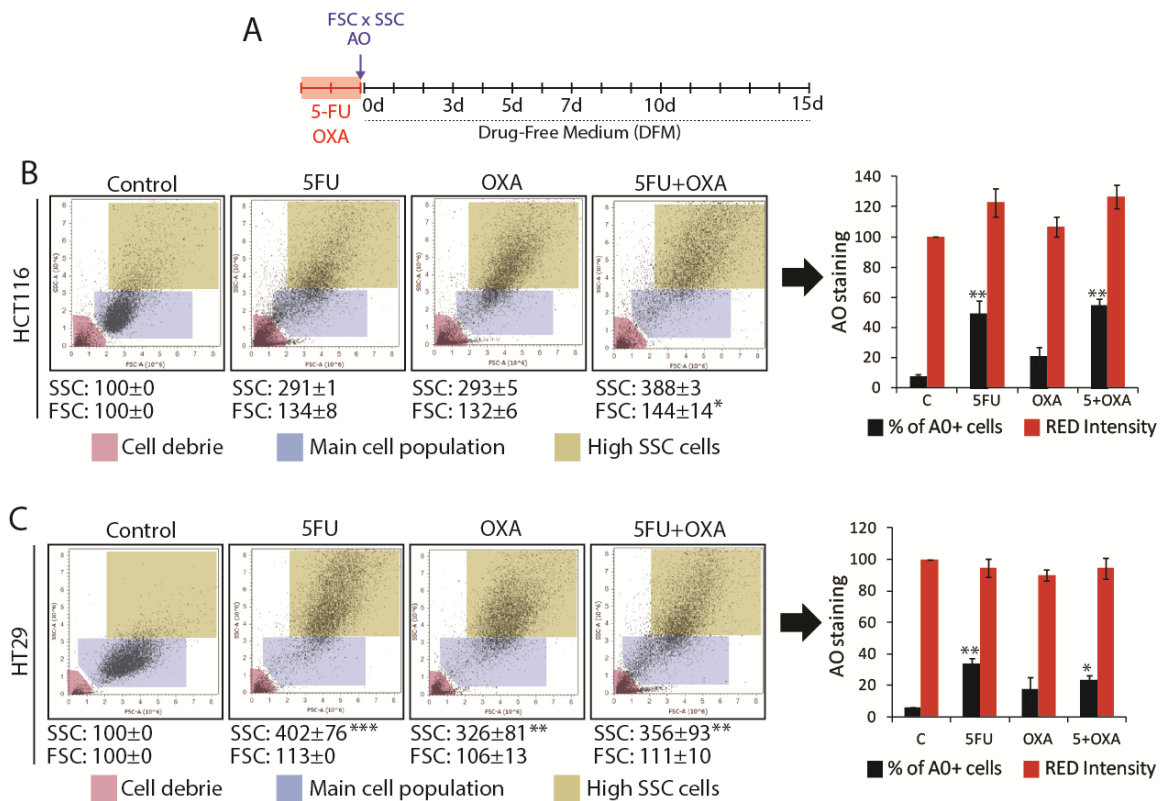


Figure 9. Evaluation of autophagy features in CRC cells treated with 5FU, OXA and co-treatment after 48h. Cells were treated with 5FU, OXA and co-treatment for 48h, followed by flow cytometry to AO. **(A)** Experimental design. **(B)** HCT116 and **(C)** HT29 - acridine orange staining. *Left* – FSC x SSC plot. On the bottom of plots is shown the average values of SSC and FSC, in relation to control. Red area indicates small cells and cell debris; blue area indicates the ‘basal’ condition of FSC x SSC. Green area indicates complex (high SSC) cells. *Right* – bar graphs showing the percentage of AO-positive cells and the intensity of red fluorescence of AO-positive cells, in relation to control (considered as 100%). **p<0.01 and ***p<0.001

We next assessed the intensity of AO staining for 15 days after the treatment. We observed a transient increase in the percentage of AO-positive cells, reaching a peak at days 3 to 5 to both treatment in both cell lines (**Figure 10B** and **10C - graphs**). Importantly, this increase was higher in the co-treatment in comparison to treatments alone, as indicated by the relation of areas under of the curve (**Figure 10B** and **10C – boxes under the graphs**). Furthermore, the increase in the percentage of AO-positive cells was followed by the increase in the red intensity (*i.e.* an inference of autophagolysosomes quantity), reaching a peak at day 7 in both cell line (**Figure 10D** and **10E - graphs**). As for the percentage of AO-positive cells, the intensity of AO red staining was higher in co-treated cells than in cells treated with the chemotherapeutics alone, as indicated by the relation of areas under of the curve (**Figure 10D** and **10E - boxes under the graphs**).

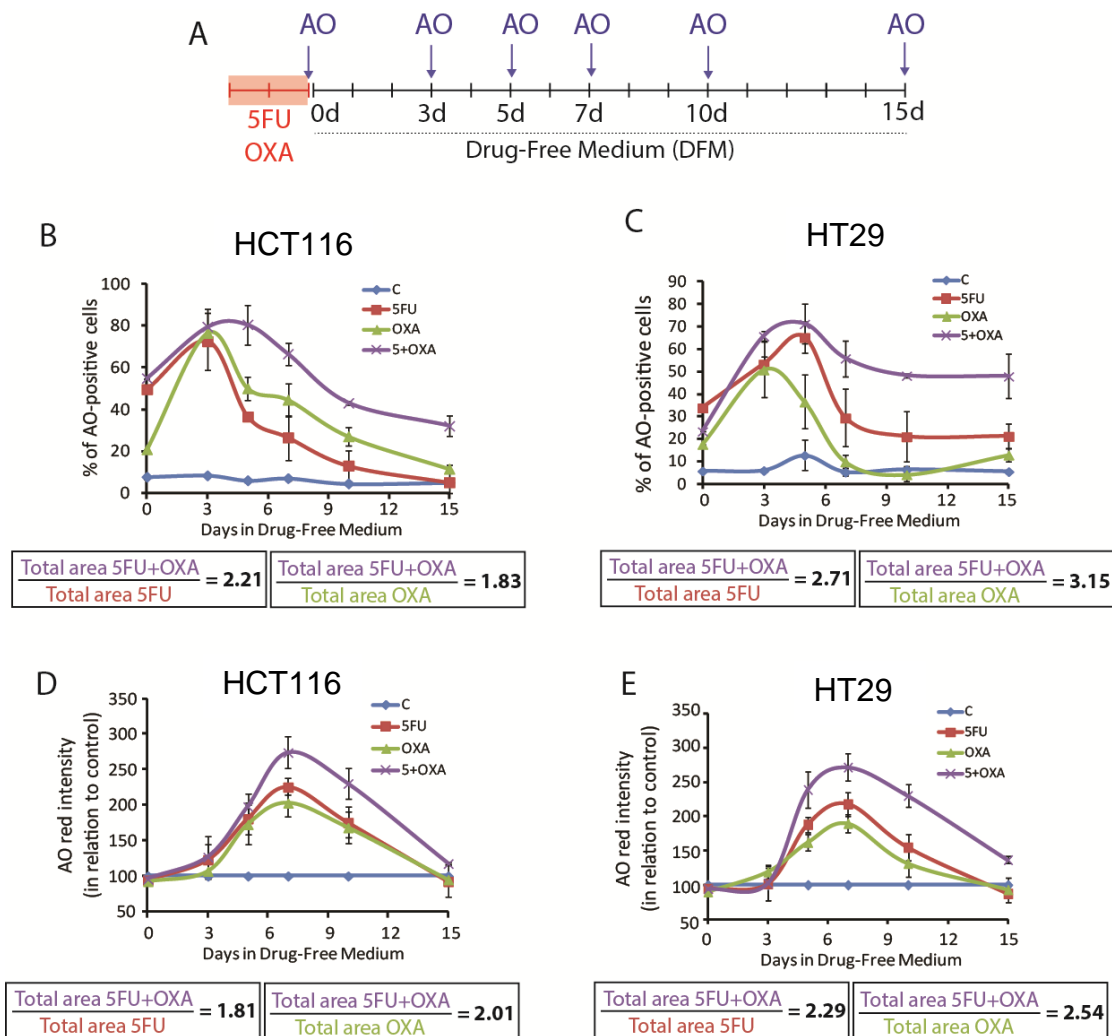


Figure 10. Evaluation of acridine orange staining in CRC cells treated with 5FU, OXA and co-treatment at a long term. Cells were treated with 5FU, OXA and the combination for 48h, followed by replating in DFM. After 3, 5, 7, 10 and 15d cells were stained with acridine orange and evaluated by flow cytometry. **(A)** Experimental design. **(B)** and **(C)** show the percentage of AO-positive cells to HCT116 and HT29 cells, respectively. *Bottom* – relation between the total area under the curve of the co-treatment and single treatments. **(D)** and **(E)** show the AO red intensity to HCT116 and HT29, respectively, in relation to control. *Bottom* – relation between the total area under the curve of the co-treatment and single treatments.

Inhibition of autophagy sensitizes CRC cell lines to the treatment with 5FU and OXA

With the results from AO in mind, we next assessed the role of autophagy (*i.e.* whether prosurvival or prodeath) through treating cells with 3-methyladenin (3MA), an inhibitor of the early step of autophagy. To this, we added 3MA to cells, 1h *per* day, during the peak of autophagy from day 3 to 5 (**Figure 11A**). Inhibition of autophagy strongly sensitized cells in the long term, leading to a reduction of CPD in both cell lines

and in all conditions, suggesting cell death (**Figure 11B and C**). The comparison between the final CPD, at day 15, showed a strong reduction after 3MA treatment (**Figure 11B and C – see the table on the bottom of graphs**).

Finally, we performed a clonogenic assay to compare the proliferative capacity of cells treated or not with 3MA. To this, we replated treated cells at day 7, as shown in Figure 11A. We found that autophagy inhibition reduced the clonogenic capacity of both cell lines treated with 5FU and OXA and co-treatment (**Figure 11D – 11G**), suggesting that cells that survived to the treatments triggered a cytoprotective autophagy, and the suppression of this mechanism strongly sensitize cells to die.

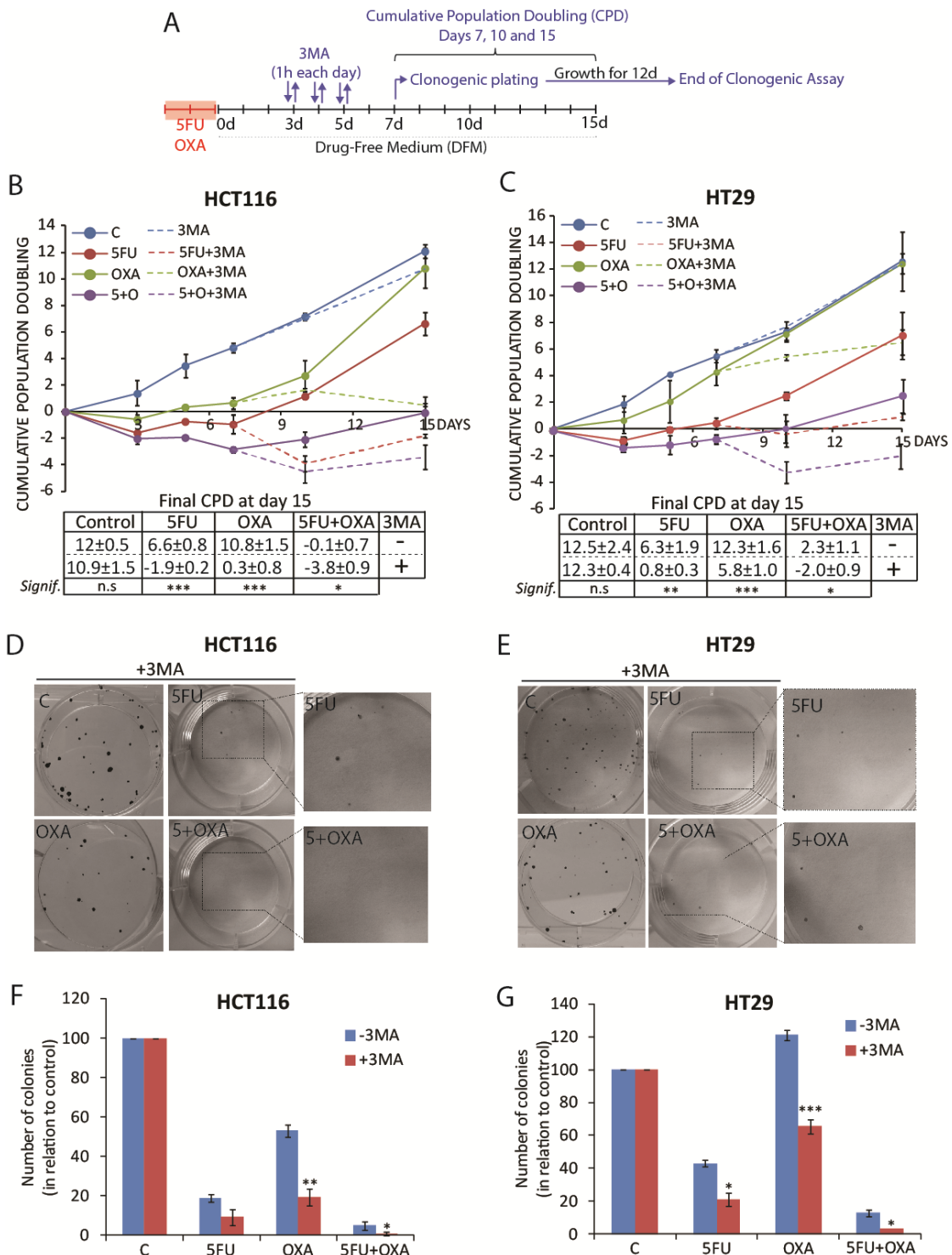


Figure 11. Inhibition of autophagy sensitizes CRC cells in the long term. (A) Cells were treated with the autophagy inhibitor at days 3, 4 and 5, for 1h each day. CPD of 3MA treated cells was assessed at days 10 and 15, and plotted with treatments without 3MA. At day 7, 100 cells were replated in a 6-wells plate to assess the clonogenicity of cells. (B) HCT116 and (C) HT29 - CPD for cells treated or not with 3MA, an autophagy inhibitor; on the bottom is shown the final CPD, at day 15, to each condition. (D) HCT116 and (E) HT29 - representative images of colonies formed after treatments with 3MA. (F) HCT116 and (G) HT29 - comparison between the number of colonies formed from cells not treated with 3MA (data from Figure 4) or treated with 3MA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ (in relation to control without 3MA).

DISCUSSION

Here we evaluated the response of CRCs cells to the treatment with 5FU and OXA, especially after drug withdraw, using a schedule that mimics the one used in the clinics (2d of treatment + 15d of recovery). We found that the co-treatment with 5FU and OXA had a strong additive effect at a long term in CRC cells through the induction of apoptosis (mainly by 5FU) and senescence (mainly by OXA). In parallel, CRC cells triggered a massive transitory increase of cytoprotective autophagy, which can be suppressed in order to increase the sensitivity of cancer cells to 5FU and OXA co-treatment.

Acutely, the 5FU and OXA had no additive cytotoxic effect in comparison to 5FU alone. On the other hand, at the long term we found a strong additive effect to the combination in relation to the drugs alone. This observation is clinically relevant since the in vivo response correlates well with long term in vitro data (12d or more) but not with acute in vitro data (Augustine et al., 2009). This highlights the importance of analyzing chronic cell fates in vitro, using regimens that resemble the clinical schedules. Then, we assessed the main cell growth and death mechanisms to shed some light on the outcome of CRC cells during the period that succeeds drugs exposure.

After the stress, cells trigger initial adaptive responses, mainly **cell cycle** arrest and autophagy. OXA, a classic inducer of DNA crosslinks and double strand breaks, induced the accumulation of cells in the S-G2/M and G2/M in HT29 and HCT116 cell lines, respectively. 5FU and co-treatment, on the other hand, induced the accumulation of cells in G1-phase in the HT29 cell line, as observed in laryngeal squamous carcinoma cells and oral carcinoma (Li et al., 2004; Liu H. C. et al., 2006). This effect may be due on the inhibition of the enzyme thymidylate synthase and the subsequent reduction of the pool of nucleotides, which activates the G1 checkpoint (Linke et al., 1996; Agarwal et al., 1998). These different outcomes may rely on the different phenotypes of the **cell lines** used here: while HT29 cells are classified as CIN (Chromosomal INstability – the most common phenotype of CRC, characterized by loss of *APC* gene, aneuploidy and chromosomal alterations), HCT116 cells are classified as MSI (Microsatellite Instability), caused by loss of several DNA repair proteins, thus leading to defective DNA repair and the accumulation of mutations (Thompson et al., 2008; Knutsen et al., 2010). As a

consequence, HCT116 cells are more sensitive to treatments including DNA damage agents.

Furthermore, HCT116 cell line are characterized by homozygous mutations in the coding region of the hMLH1 (hMLH1 - / - and hMSH3 - / -) gene, they are considered MMR deficient and have resistance to 5FU treatment (Arnold et al., 2003; Iwaizumi et al. Col, 2011; Sinicrope et al, 2012). The other cell line, HT29, exhibits partial methylation of the hMLH1 gene (Herman et al, 1998).

After cell cycle arrest, cells can follow different cell fates, including apoptosis and senescence, depending on the genetic background and the characteristic of the stress. Here, despite both cell lines increased the percentage of SA-beta-gal-positive cells, only HCT116 cells acquired a 'full' senescent phenotype in response to the co-treatment (i.e. increased cell size concomitant to increased SA-beta-gal activity and an arrest in cell proliferation). This may be due to the different status of the *TP53* protein in the cell lines (HCT116 - *TP53*^{wt}; HT29 – *TP53*^{mut}) since this protein is central to define the long-term cell fate after DNA damage (Hirose et al., 2001; Zhang et al., 2009; Chen et al., 2013). Here, we showed that co-treatment strongly increased the induction of senescence in comparison to single treatments, which may explain, at least partially, the delay of cell regrowth in this cell line. The induction of senescence by 5FU (Tato-Costa et al., 2016) and by OXA (Qu et al., 2013; Seignez et al., 2014) has been demonstrated in cells from different tumor types as well as in an in vivo model of CRC treated with OXA (Seignez et al., 2014).

In addition to senescence, 5FU induced higher levels of apoptosis than OXA in both cells lines, corroborating results from others (De Angelis et al., 2006; Bijnsdorp et al., 2010; Li et al., 2010; Fu et al., 2014; Yang et al., 2015). As to senescence, the co-treatment also increased apoptosis in higher extent than single treatments. As for senescence, *TP53* may also contribute to the induction of apoptosis in CRC cells, since the HCT116 cells were more sensitive to the pro-apoptotic effect of 5FU and OXA, as also shown by others (Fridman et al., 2003; Beckerman et al., 2010). Similarly, OXA treatment suppressed the proliferation of HCT116 cells (*TP53*^{wt}) but not of HT29, SW480s (*TP53*^{mut}) and HCT116 *p53*^{KO}, suggesting that OXA exerts its toxicity in CRC cells in a p53-dependent manner (Yang et al., 2015). Molecularly, 5FU-induced

apoptosis involves the increase of ROS, and antioxidants decrease the proapoptotic effect of the drug (Fu et al., 2014).

Despite the chronic toxicity, cells from all treatments regrowth from day 7 onwards, resembling clinical recurrence. Based on our findings and other studies, we build three hypotheses about the resistance and regrowth of CRC in response to 5FU and OXA: (1) hypothesis 1 – autophagy; (2) hypothesis 2 - of CSCs; (3) hypothesis 3 – senescence.

Hypothesis 1. Several studies have already shown the induction of **autophagy** after acute treatment (24h to 72h) with 5FU and OXA in CRC cells (Li et al., 2009; Bijnsdorp et al., 2010; Sui et al., 2014; Cottone et al., 2015; Liu et al., 2015; Yang et al., 2015). In all cases, the pharmacological or genetic inhibition of autophagy decreased cell viability and increased apoptosis (Li et al., 2009; Li et al., 2010; Shi et al., 2012; Cottone et al., 2015). In this sense, we recently showed that the levels of autophagy induced after DNA damage can influence the cell fate: low levels of autophagy favor apoptosis, while high levels may allow cells to reach cell senescence (Filippi-Chiela et al., 2015). Here, building on this data we found that the suppression of autophagy strongly reduced the CPD and the clonogenic capacity of CRC cells to regrowth after the treatments.

Hypothesis 2. Besides contributing to suppress apoptosis, autophagy also contributes to the resistance of **cancer stem cells (CSCs)** to OXA (Yang et al., 2015). These cells have some features that favor their resistance to treatment, such as increased DNA repair capacity and increased antioxidant defenses (Abdullah et al., 2013). Both cell lines used here have CSCs, and several studies found an enrichment of CSCs after 5FU or OXA treatment in HT29 (Denise et al., 2015) and in HCT116 cells (Huang et al., 2015) CSCs that survived from 5FU treatment have high mitochondrial mass (Denise et al., 2015), which corroborates some studies showing that CSCs have increased oxidative metabolism, including in CRCs (Song et al., 2015a; Song et al., 2015b). CSCs are also more resistant to glucose deprivation than non-CSCs, probably due to their capacity to induce autophagy and adapt to the metabolic stress (Pastò et al., 2014; Yang et al., 2015). This characterization of CSCs from CRCs as well as the differences between CSCs and non-CSCs may allow, in the next years, the rational

design of combined modulators of cell metabolism or autophagy with chemotherapeutics to affect these cells with higher efficacy (Song et al., 2015a).

Hypothesis 3. Finally, it is worth mentioning that senescent cells have a paracrine role in the tumor microenvironment through the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). These molecules can stimulate cell growth and angiogenesis, suppress the anti-tumor immunity and induce the epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is essential to the metastatic process. (Seigneur et al., 2014; Collado et al., 2007; Tato-Costa et al., 2016). Indeed, CRCs cells induced to senescence by 5FU increased cell invasion in vitro through the SASP, while tumors exposed to chemotherapy using 5FU showed some niches of senescent cells, in which it was also found an increase in EMT markers (Tato-Costa et al., 2016). As a consequence, the induction of senescence has a dual role at a long term, and the development of strategies to eliminate those cells that enter in senescence state may increase the efficacy of therapies.

In conclusion, our data suggest that cells from CRC trigger a long term response to 5FU and OXA after the drug withdraw, which involves the combined induction of (day 3, mainly by 5FU) and senescence (day 7, mainly by OXA) by the co-treatment. On the other hand, cells from all conditions regrowth in both cell lines, and this resistance could be mediated by autophagy induction, paracrine signaling mediated by senescent cells and/or the survival of CSCs. From these putative mechanisms of resistance, the unique that can be directly pharmacologically modulated is autophagy. In this sense, our data suggest that the rational combination of 5FU+OXA with an autophagy inhibitor could potentiate the effect of 5FU and OXA in CRC cells, thus reducing tumor resistance and recurrence.

Our main findings are shown in **Figure 12**.

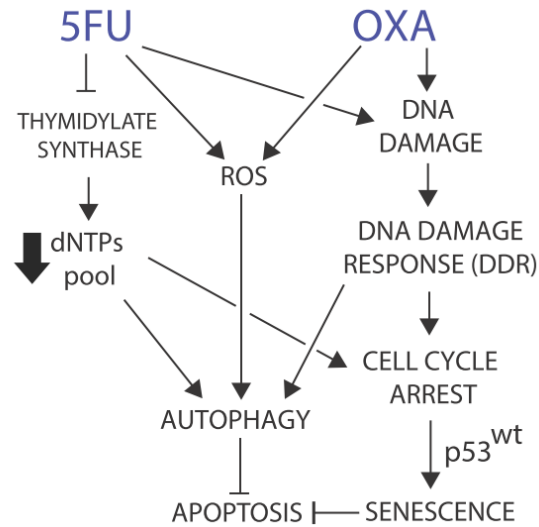


Figure 12. Schematic of the mechanisms of action of 5FU and OXA co-treatment. 5FU inhibits the thymidylate synthetase as well as incorporate some metabolites into nucleic acids, causing DNA damage. OXA causes DNA damage and activates a DNA Damage Response. Both drugs generate ROS and activate the process of autophagy and arrest the cell cycle. Cells that have functional p53 enters senescence, which have a dual role – despite arresting their growth, these cells can release some molecules that can contribute to tumor survival and growth, CSCs enrichment and suppression of anti-tumor immunity. Finally, treated cells trigger autophagy to adapt to the stress and avoid apoptosis, so that the suppression of autophagy contribute to sensitize CRC cells treated with 5FU and OXA.

CONCLUSION

In conclusion, the results showed that there was no cytotoxic additive effect, in short-time, of co-treatment with 5FU and OXA when compared to 5FU alone, but, on the other hand, there was a reduced cell proliferation until the 7th day, followed by the return of proliferation in both cell lines, suggesting that these cells may be contributing to tumor resistance and recurrence. The efficacy of co-treatment was showed with the less pronounced result of final CPD performed after 15 days and with the reduced in clonogenic capacity of the cells. Furthermore, the effect of 5FU on the cell cycle prevails in the co-treatment and there was an induction of apoptosis by 5FU and senescence by OXA, with a transient increased of ROS in both cell lines. Also, there was, in short term, an increase in autophagy in both cell lines with no difference between treatments, and a transient increase with a peak between days 3 to 7 to both treatments in both cell lines. A modulation of autophagy was performed and showed that the cells was sensitized in

long term, leading to a reduction of CPD and suggesting that the inhibition of autophagy has an important potential to increase the effectiveness of the treatment.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments: We would like to thank Prof. Jennifer Saffi from Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) that kindly provided HCT116 and HT29 cells line used in this project and the Brazilian agencies: FINEP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), ICGEB BRA (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Brazil) and, CAPES (Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for financial support.

Abbreviations: 3MA: 3-methyladenin; 5FU: 5-fluoruracil; AO: Acridine Orange; APC: Adenomatous Polyposis Coli; AVO: Acidic vesicular organelles; C12FDG: 5-dodecanoylamino fluorescein di-betaD-galactopiranoside; CIN: Chromosomal Instability; CPD: population doubling cumulative; CRC: colorrectal cancer; CSC: Cancer Stem Cells; DCF: Dichlorofluorescein; DFM: Drug-free medium; DNA: Deoxyribonucleic acid; EMT: Epithelial-mesenchymal transition; FBS: fetal bovine serum; FOLFOX: 5-fluoruracil + oxaliplatin + leucovorin; FSC: Forward-scatter; MSI: Microsatellite Instability; MUT: mutated; OXA: oxaliplatin; PI: Propidium iodide; ROS: Reactive oxygen species; RS: Reactive species; SD: standard deviation; SA-B-gal: Senescence-Associated Acid β -Galactosidase; SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype; SSC: side-scatter; WT: Wild type.

SUPPLEMENTARY FIGURES

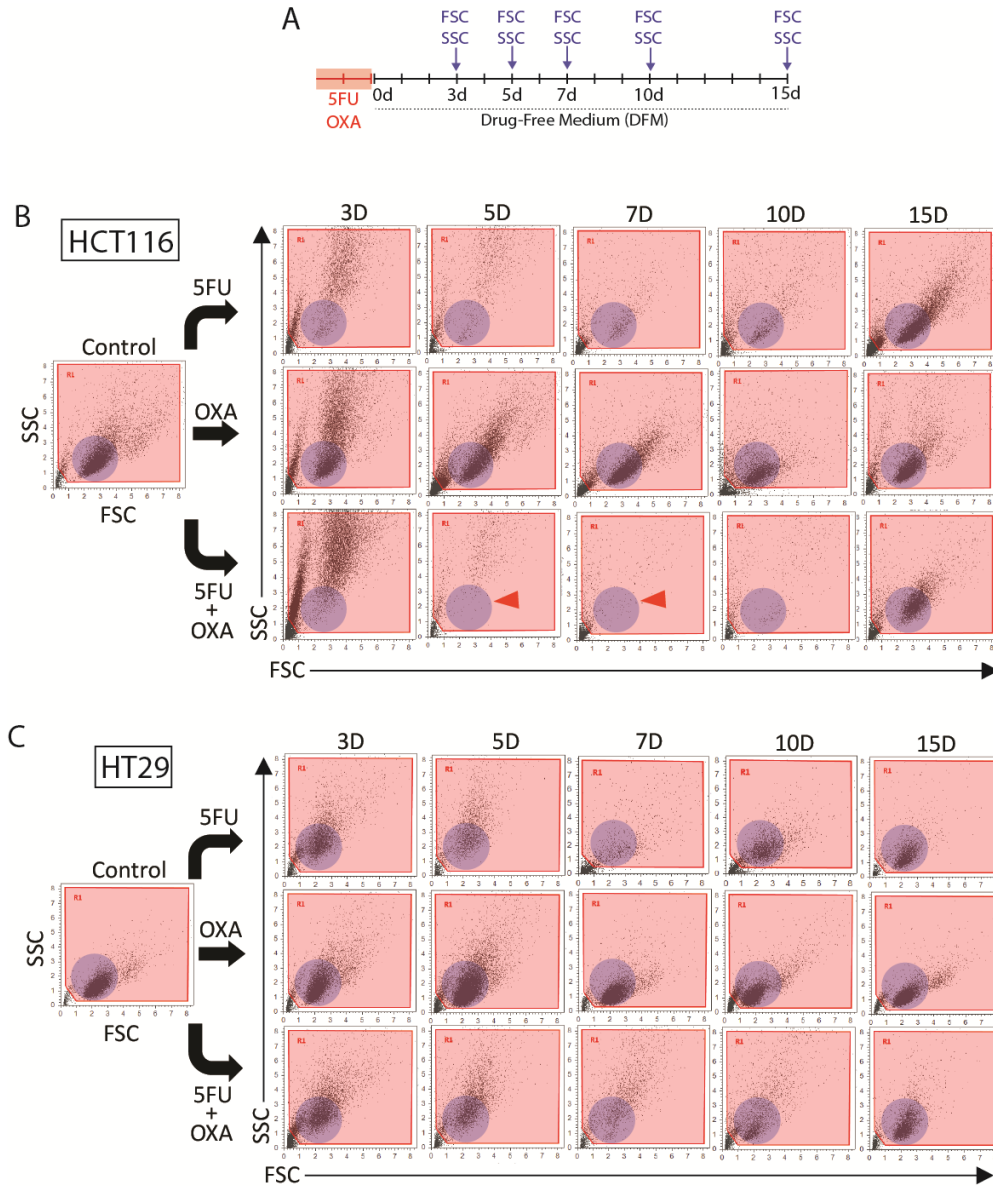


Fig. S1. Long term phenotype (FSC and SSC) of HCT116 and HT29 cells treated with 5FU, OXA and the combination. Cells were treated with 5FU, OXA and co-treatment for 48h, followed by replating in DFM, as shown in **A**. At days 3, 5, 7, 10 and 15 we assessed the FSC (cell size) and the SSC (intracellular complexity) of treated cells. **(B)** HCT116 and **(C)** HT29. Blue circle represents the area where the main population of control cells is. Red arrowheads point to the time point when the population of 'normal cells' reduced to its lowest number.

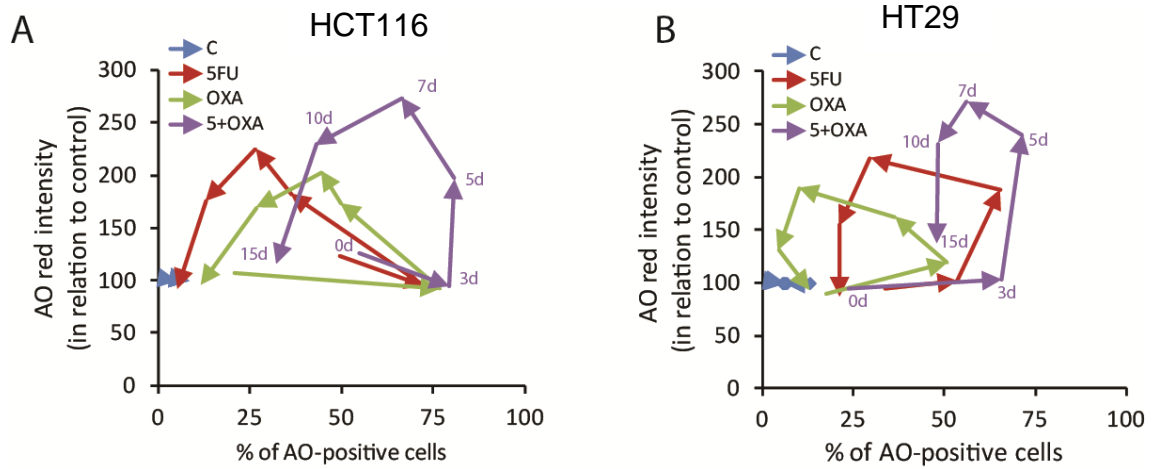


Fig. S2. Acridine orange staining of HCT116 and HT29 cells treated with 5FU, OXA and the combination. Cells were treated with 5FU, OXA and co-treatment for 48h, followed by replating in DFM, as shown in A. At days 3, 5, 7, 10 and 15 we assessed AO staining.

REFERENCES

- Abdullah, L. N. and E. K. H. Chow. (2013). "Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells". Clinical and Translational Medicine 2:3: 1-9.
- Agarwal, M. L., A. Agarwal, et al. (1998). "A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides". Cell Biology 95: 14775–14780.
- Alcindor, T; Beauger, N. (2011). Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. Curr Oncol. 2011 Feb; 18(1): 18–25.
- André, T., C. Boni, et al. (2009). "Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial". Journal of Clinical Oncology 27 (19): 3109-3116.
- Augustine, C. K., J. S. Yoo, et al. (2009). "Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma." Clin Cancer Res 15(2): 502-510.
- Beckerman, R. and C. Prives. (2010). "Transcriptional regulation by p53". Cold Spring Harb Perspect Biol 2(8): a000935: 1-18.
- Bijnsdorp, I. V., G. J. Peters, et al. (2010). "Differential activation of cell death and autophagy results in an increased cytotoxic potential for trifluorothymidine compared to 5-fluorouracil in colon cancer cells". Int. J. Cancer 126: 2457–2468
- Chen, K., Y. H. Huang, et al. (2013) "Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges". Acta Pharmacologica Sinica 34: 732–740.
- Collado, M., M. A. Blasco, et al. (2007). "Cellular Senescence in Cancer and Aging". Cell 130: 223-233.
- Cottone, L., A. Capobianco, et al. (2015). "5-Fluorouracil causes leukocytes attraction in the peritoneal cavity by activating autophagy and HMGB1 release in colon carcinoma cells". Int. J. Cancer: 136, 1381–1389.
- Cunningham, D., W. Atkin, et al. (2010). "Colorectal cancer." Lancet 375(9719): 1030-1047.
- De Angelis, P. M., D. H. Svendsrud et al. (2006). "Cellular response to 5-fluorouracil (5FU) in 5FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery" Molecular Cancer 5:20: 1-25.
- Denise, C., Paoli et al. (2015). "5-Fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPPOS to survive and enhance stem-like traits" Oncotarget 6 (39): 41706-41721.
- Filippi-Chiela, E. C. (2015). Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. Autophagy 1(7):1099-1113.
- Fridman, J. S. and S. W. Lowe. (2003). "Control of apoptosis by p53". Oncogene 22, 9030–9040.
- Fu Y., G. Yang, et al. (2014). "Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation". Cell Death Dis 5, e983: 1-10
- Hirose, Y., M. S., Berger, et al. (2001). "p53 Effects Both the Duration of G2/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells". Cancer Res 1;61(5): 1957-1963.

- Huang, R., G. Wang, et al. (2015). "Colorectal cancer stem cell and chemoresistant colorectal cancer cell phenotypes and increased sensitivity to Notch pathway inhibitor". Molecular Medicine Reports 12: 2417-2424.
- Jiao L., D. Dan Li, et al. (2016). "Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelial-mesenchymal transition and invasive potential in colon cancer". Tumour Biol 37(6): 8413-8423.
- Knutsen, T., H. M., Padilla-Nash, et al. (2010). "Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of 15 Colorectal Cancer Cell Lines". Genes Chromosomes Cancer 49(3): 204–223.
- Li, J., N. Hou, et al. (2009). "Inhibition of Autophagy by 3MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells". Ann Surg Oncol 16:761–771.
- Li, J., N. Hou, et al. (2010). "Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model." Eur J Cancer 46(10): 1900-1909.
- Li, M. H., D. Ito, et al. (2004). "Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines". Oral Oncology 40: 63–70.
- Linke, S. P, K. C., Clarkin, et al. (1996). "A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage". Genes Dev 10: 934-947.
- Liu, H. C., G. G., Chen, et al. (2006). "5-fluorouracil mediates apoptosis and G1/S arrest in laryngeal squamous cell carcinoma via a p53-independent pathway". Cancer J. 12(6): 482-493.
- Liu, W., Z. Zhang, et al. (2015). "HMGB1-mediated autophagy modulates sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin via MEK/ERK signaling pathway". Cancer Biol Ther. 16(4): 511-517.
- Longley, D; Harkin, P; Johnston, P (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer 3, 330-338
- Loree, J. M., K. E. Mulder, et al. (2014). "Retrospective comparison of CAPOX and FOLFOX dose intensity, toxicity, and clinical outcomes in the treatment of metastatic colon cancer." J Gastrointest Cancer 45(2): 154-160.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli.(2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med 361(25): 2449-2460.
- Mhaidat, N. M., M. Bouklichacene et al. (2014) "5- Fluorouracil induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase 9 dependent and mediated by activation of protein kinase C δ ". Oncology Letters 8: 699-704.
- Pastò A, C Bellio, et al. (2014). "Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation". Oncotarget 5(12): 4305-4319.
- Qu, K., X. Xua, et al. (2013). "Negative regulation of transcription factor FoxM1 by p53 enhances oxaliplatin-induced senescence in hepatocellular carcinoma". Cancer Letters 331(1): 105–114.
- Roh, S., E. Y. Choi, et al (2012). "Characterization of biological responses of colorectal cancer cells to anticancer regimens". J Korean Surg Soc 83(1): 21-29
- Sanoff, H. K. and R. M. Goldberg (2013). "How we treat metastatic colon cancer in older adults". Journal of Geriatric Oncology 4: 295-301.

- Seignez, C., A. Martin, et al. (2014). "Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils" Oncotarget 5(22): 11442–11451.
- Shi, Y., B. Tang, et al. (2012). "Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells." PLoS One 7(11): e51076: 955–963.
- Song, I. S., Y. J. Jeong, et al. (2015a). "Mitochondrial metabolism in cancer stem cells: a therapeutic target for colon cancer". BMB Rep 48(10):539-540.
- Song, I. S., Y. J. Jeong, et al. (2015b). "FOXO1-Induced PRX3 Regulates Stemness and Survival of Colon Cancer Cells via Maintenance of Mitochondrial Function". Gastroenterology 149(4): 1006-16.e9.
- Sui, X., N. Kong, et al. (2014). "JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy." Sci Rep 4:4694: 1-8.
- Tamas, K., A. M. E. Walenkamp, et al. (2015). "Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site". Cancer Treatment Reviews 41:671–679.
- Tato-Costa, J., S., Casimiro, et al. (2016). "Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer". Clinical Colorectal Cancer 15(2): 170–178.e3
- Thomé, M. P., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2016). "Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy." J Cell Sci 129: 4622-4632.
- Thompson, S. L. and D. A., Compton, et al. (2008). "Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells". The Journal of Cell Biology 180(4): 665–672.
- Tournigand, C., T. André, et al. (2004). "FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study". Journal of Clinical Oncology 22 (2): 229-237.
- Vessoni, A. T., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2013). "Autophagy and genomic integrity." Cell Death Differ 20(11): 1444-1454.
- Zamin, L. L., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2009). "Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells." Cancer Sci 100(9): 1655-1662.
- Zhang, X. P., F. Liu et al. (2009). "Cell fate decision mediated by p53 pulses". PNAS 106(30): 12245-12250.
- Yang, H. Z., Y Ma, et al. (2015). "Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment". Cancer Letters 361: 128–136.
- Yoo, P. S., R. I. Lopez-Soler, et al. (2006). "Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab." Clin Colorectal Cancer 6(3): 202-207.

6. DISCUSSÃO INTEGRADA

No presente trabalho, nós avaliamos o efeito e os mecanismos de ação do tratamento com 5FU e OXA, isoladamente e combinados, em células de CCR, tanto de maneira aguda quanto crônica, em perfil de tratamento semelhante ao utilizado na clínica (2 dias de tratamento + 15 dias de recuperação). A modulação dos principais mecanismos celulares, tais como proliferação celular, ciclo celular, morte celular, autofagia, senescência e estado oxidativo celular, foi avaliada de maneira racional e integrada.

O tratamento combinado de 5FU + OXA não exerceu efeito agudo citotóxico aditivo em comparação com os tratamentos isolados. **Na linhagem HCT116**, grande parte das células tratadas com 5FU ou 5FU + OXA entrou em apoptose, enquanto as células sobreviventes dispararam elevados níveis de autofagia, a qual tem papel adaptativo de sobrevivência uma vez que a sua inibição reduziu bruscamente a proliferação celular; no dia 7, após o co-tratamento e após o tratamento apenas com OXA, encontramos níveis elevados de células com características senescentes. A partir do dia 7, podemos sugerir que o dano causado às células que sobreviveram foi pelo menos parcialmente resolvido, uma vez que a população de células voltou a aumentar, mimetizando a recorrência tumoral. Já nas **células HT29** nós observamos que parte das células tratadas com 5FU e com o co-tratamento entrou em apoptose, em menor quantidade do que na linhagem HCT116, enquanto as células sobreviventes ativaram elevados níveis de autofagia citoprotetora. Considerando as células HT29 tratadas com OXA, nós observamos intensa parada no ciclo celular, porém grande parte destas células rapidamente conseguiu resolver o dano celular, uma vez que retornaram a proliferar em taxa semelhante ao controle entre 3 e 5 dias após o tratamento. Apesar do aumento na porcentagem de células SA- β -gal positivas, estas células não aumentaram de tamanho, assim como não pararam sua proliferação, de modo que acreditamos não ter havido indução plena de senescência nestas células. Já no co-tratamento observamos aumento tanto das células com fenótipo senescente quanto redução da proliferação.

Assim, fica evidente que temos uma resposta heterogênea após o tratamento com 5FU e OXA, que inclui diferentes mecanismos celulares com diferentes cinéticas. De fato, os cânceres são formados por subpopulações celulares com diferentes *backgrounds* genético e epigenético, o que faz com que cada subpopulação celular responda diferente a um dado estresse ou estímulo (Marusyk e col, 2010; Alizadeh e col, 2015). Aqui, nós observamos uma subpopulação de células que entrou em apoptose, outra subpopulação que adquiriu fenótipo senescente e uma terceira população celular que resistiu às terapias e retomou o crescimento populacional especialmente 7 dias após o tratamento ao longo dos 15 dias após o tratamento.

As seções a seguir (D1 a D7) discutem os principais achados e integram os resultados, ao mesmo tempo em que hipóteses são levantadas acerca tanto da resposta quanto de possíveis mecanismos de resistência das células de CCR à 5FU e OXA.

D1. O perfil genético das linhagens em estudo

D2. Sensibilidade aguda *versus* crônica

D3. Ciclo celular e Apoptose

D4. Autofagia e Apoptose

D5. Espécies Reativas (RS) e Autofagia

D6. Senescência e o Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP)

D7. Mecanismos de resistência

D1. O perfil genético das linhagens em estudo

No presente estudo, nós utilizamos como modelo as linhagens de CCR humano HCT116 e HT29, ambas geneticamente bem caracterizadas (Ahmed e col, 2013). Estas linhagens apresentam um perfil genético diferente considerando os principais genes envolvidos na carcinogênese colorretal, incluindo supressores tumorais (*TP53*, *APC* e *PTE**N*) e oncogenes (*KRAS*, *BRAF*). Estas proteínas são relevantes, de forma direta ou indireta, para todos os mecanismos celulares avaliados aqui, de modo que o perfil genético relacionado às mesmas explica, ao menos em partes, os resultados encontrados. A linhagem HT29 possui mutações em 3 destes genes (*TP53*, *BRAF* e

APC), em comparação com a linhagem HCT116, que possui mutação apenas no oncogene *KRAS*. Esta característica, entre outras, resulta em um fenótipo mais agressivo para a linhagem HT29, com tempo de duplicação menor (HT29: 25.9h; HCT116: 28.5h), e tumores maiores formados em modelo *in vivo* (Yao e col, 2005). Além disso, a célula HT29 se mostrou mais resistente aos tratamentos com 5FU e OXA quando comparada à HCT116, tanto agudamente (48h) quanto a longo prazo. Este resultado corrobora outros estudos da literatura que utilizaram ambas linhagens (veja **Tabelas 1 e 2**).

Considerando os genes-chave da carcinogênese colorretal, a linhagem HCT116 possui mutação apenas em *KRAS*, a qual pode acelerar a sobrevivência celular, contribuir para a supressão da apoptose e ativar a senescência induzida por oncogene (Fariña-Sarasqueta e col, 2010; Hanahan e col, 2011; Roh e col, 2012; Arends e col, 2013). Porém, 5FU e o co-tratamento induziram níveis elevados de apoptose na linhagem HCT116 (*KRAS^{mut}*), inclusive superiores aos níveis induzidos nas células HT29 (*KRAS^{wt}*), demonstrando que o papel da mutação de *KRAS* em suprimir apoptose não foi dominante sobre o fenótipo observado. De fato, a sensibilidade à apoptose induzida pelo 5FU se correlaciona não com o perfil de *KRAS* mas sim com os níveis de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X_L), pró-apoptóticas (Bax) e com o gene supressor tumoral *TP53* (Violette e col, 2002).

Dessa forma, o status de *TP53*, a qual é ativada por estresse genotóxico e que atua classicamente como 'guardião do DNA', parece ser central na resposta de células de CCR aos tratamentos realizados. Após um estresse genotóxico e a parada no ciclo celular, a *TP53* atua de maneira central na decisão do desfecho celular a partir da intensidade de estresse genotóxico detectado e da intensidade do sinal de *TP53* (Purvis e col, 2012; Kracikova e col, 2013). Sendo assim, *TP53* sinaliza e ativa a apoptose quando o dano ao DNA ou outros componentes celulares for muito intenso (Liu H. C. e col, 2006; Markowitz e col, 2009; Arends, 2013) mas, por outro lado, níveis menores de danos sentidos por *TP53* levam à parada no ciclo celular, não ultrapassando o limiar da apoptose e possibilitando à célula sobreviver ao estresse através do reparo das lesões no DNA ou através da ativação da senescência celular (Purvis e col, 2012; Kracikova e col, 2013). Aqui, ambas as linhagens (HCT116 - *TP53^{wt}*; HT29 - *TP53^{mut}*) ativaram

parada no ciclo celular em resposta à OXA, sugerindo que este efeito seja independente de *TP53*. Considerando a senescência, observamos que apenas a linhagem HCT116 adquiriu fenótipo pleno de senescência (aumento de SA- β -gal, aumento do tamanho celular e parada na proliferação celular), sugerindo que *TP53* pode ter papel não na parada no ciclo celular mas sim no destino celular a longo prazo, conforme já sugerido por outros autores em células de glioblastoma (Hirose e col, 2001). Considerando o papel de *TP53* na apoptose, a linhagem HCT116 (*TP53*^{wt}) foi mais sensível ao efeito pró-apoptótico do 5FU, sugerindo que a presença de *TP53* pode contribuir para a indução de apoptose em células de CCR expostas à 5FU e à combinação de 5FU+OXA. Efeito semelhante foi observado em células HCT116 tratadas com OXA, nas quais o *knockdown* de *TP53* reduziu em quase 40% a sensibilidade das células (Yang e col, 2016). De fato, *TP53* está intimamente ligada à indução de apoptose por atuar diretamente sobre a transcrição de genes pró-apoptóticos (Fridman e col, 2003; Beckerman e col, 2010). Clinicamente, o *status* das principais proteínas envolvidas na apoptose tem poder prognóstico em CCR (Zeestraten e col, 2013), e mutações na via da apoptose têm sido implicadas na resistência de células de CCR à terapia.

Outros dois genes centrais na regulação de sinais de crescimento celular são os genes *BRAF* (oncogene) e *APC* (gene supressor tumoral). A linhagem HT29 também apresenta mutações no oncogene *BRAF*, a qual pode contribuir para um fenótipo mais agressivo e proliferativo no CCR (Markowitz e col, 2009; Fariña-Sarasqueta e col, 2010; Philips e col, 2010; Davies e col, 2012). O supressor tumoral *APC*, por sua vez, tem papel central no controle da proliferação celular em células do epitélio colorretal através da supressão da via Wnt/ β -catenin, estimulatória da divisão celular nas criptas intestinais (Behrens e col, 1998), sendo um passo inicial na carcinogênese colorretal (Powell e col, 1992). Além disso, a proteína *APC* tem papel central no controle do número de cromossomos por célula após a divisão celular (Cotii e col, 2000; Markowitz e col, 2009; Arends, 2013). Dessa forma, a perda de *APC* favorece a instabilidade cromossômica nas células HT29, as quais possuem um fenótipo chamado CIN (*Chromosomal Instability*), que é um fenótipo mais comum em CCR caracterizado por células tipicamente aneuplóides e com rearranjos cromossômicos amplos. De fato, a

linhagem HT29 é triploide e possui 24 anormalidades cromossômicas, enquanto a linhagem HCT116 possui apenas 7 anormalidades cromossômicas, além de possuir um lote cromossômico muito próximo à diploidia. As células HCT116, por sua vez, são cromossomicamente estáveis, e apresentam o fenótipo chamado MSI (*microsatellite instability*), causado não pela perda de *APC*, mas sim por deficiência em inúmeras proteínas de reparo de DNA, levando a um número elevado de mutações (Thompson e col, 2008; Knutsen e col, 2010).

De acordo com Lengauer e colaboradores (1997) e Herman e colaboradores (1998), resultados obtidos a partir de experimentos, sugerem que exista uma relação entre MMR e a metilação do DNA alterada em células humanas, sendo que essa última desempenha um papel no controle da expressão gênica e, poderia exercer um papel nos processos de segregação cromossômica no câncer.

A perda desse sistema ocorre no câncer colorretal esporádico (10-15%) e, geralmente, é causada por hipermetilação *hMLH1*. A deficiência de MMR tem mostrado conferir resistência a vários agentes citotóxicos que atuam através de danos no DNA, dentre eles o 5-fluorouracila (5FU), uma vez que torna as células tumorais tolerantes às drogas que geralmente seriam tóxicas (Herman e col, 1998; Arnold e col, 2003; Sinicrope, 2010; Iwaizumi e col, 2011; Sinicrope e col, 2011). Por outro lado, as proteínas MMR não reconhecem os adutos relacionados com a oxaliplatina, uma vez que ela contém uma porção volumosa que se incorpora ao DNA através de adutos citotóxicos intra e intercadeia, fazendo, dessa forma, com que a quimiossensibilidade à oxaliplatina seja independente ao sistema MMR (Sinicrope e col, 2012).

As células da linhagem HCT116 são caracterizadas por mutações homozigóticas na região de codificação do gene *hMLH1* (*hMLH1*^{-/-} e *hMSH3*^{-/-}), são consideradas deficientes de MMR e apresentam resistência ao tratamento com 5FU (Arnold e col, 2003; Iwaizumi e col, 2011; Sinicrope e col, 2012). A outra linhagem, HT29, apresenta uma metilação parcial do gene *hMLH1* (Herman e col, 1998).

Uma meta-análise que incluiu 32 estudos com 1.277 pacientes com CCR deficientes de MMR, mostrou que houve uma redução de 35% no risco de morte para os pacientes com tumores com deficiência de MMR versus aqueles com tumores proficientes de MMR (Sinicrope, 2010). Além disso, estudos mostraram que pacientes

com tumores deficientes de MMR não apresentaram benefícios após o tratamento adjuvante com a quimioterapia baseada em 5FU, enquanto aqueles com tumores proficientes de MMR tiveram um benefício de sobrevivência significativo com este tratamento (Sinicrope, 2010; Iwaizumi e col, 2011).

D2. Sensibilidade aguda versus crônica

Com o objetivo de selecionar as doses de 5FU e OXA para a realização dos experimentos, desenvolvemos um experimento piloto (dados não mostrados), utilizando doses semelhantes para ambas as linhagens celulares, com base na literatura (veja a **Tabelas 1 e 2**) e nas doses plasmáticas atingidas por estes compostos (concentração plasmática máxima – 5FU: 28-34 μM ; OXA: 30-80 μM) (Graham e col, 2000; Casale e col, 2004; Burz e col, 2009). A linhagem HCT116 mostrou-se mais sensível quando comparada à HT29 para doses semelhantes e, portanto, a dose precisou ser reduzida à metade a fim de permitir a análise a longo prazo dos resultados. De fato, outros trabalhos também demonstraram que a linhagem HCT116 é mais sensível do que a linhagem HT29 frente a vários compostos, como OXA (Liu H. C. e col, 2015), 5FU (Shi e col, 2012; Mhaydat e col, 2014), cisplatina (Sui e col, 2014; Li X. e col, 2015) e ribavirina (Richard e col, 2015). É interessante notar, porém, que a linhagem HT29 se mostrou mais sensível à metformina (inibidor da fosforilação oxidativa utilizado no tratamento do diabetes tipo 2) em comparação com HCT116 (Richard e col, 2015). Posteriormente, esta questão será melhor debatida nesta discussão.

Os resultados obtidos aqui para a toxicidade aguda (contagem 48h) são semelhantes aos resultados obtidos por outros autores. As **Tabelas 1 e 2** resumem os principais trabalhos que avaliaram a toxicidade aguda (24h a 72h) de 5FU e OXA em células de CCR, respectivamente. Considerando a combinação de 5FU e OXA, não houve efeito aditivo a curto prazo (48h) do co-tratamento quando comparado com 5FU sozinho. Dessa forma, fica evidente que o efeito do 5FU foi predominante na toxicidade aguda do co-tratamento.

Por outro lado, é sabido que resultados *in vitro* possuem potencial translacional quando comparados a resultados *in vivo* apenas em experimentos de longo prazo (Augustine e col, 2009). Um dos objetivos centrais do presente estudo foi investigar o

comportamento das células de CCR durante o período equivalente à recuperação do paciente entre um ciclo de quimioterapia e outro. No CCR, este protocolo corresponde a 2 dias de tratamento, seguidos de 15 dias de recuperação. Aqui, portanto, as células de CCR foram expostas ao mesmo regime de tratamento, durante o qual houve redução na proliferação celular até o sétimo dia, exceto para o tratamento com OXA nas células HT29, seguido por um retorno da proliferação em ambas as linhagens celulares. Este perfil de crescimento sugere um comportamento de resistência e recorrência tumorais a partir do sétimo dia, à semelhança do que ocorre nos pacientes. Porém, é importante notar que o PDC final, atingido após 15 dias em MLD, foi menor para o co-tratamento em comparação com os tratamentos isolados. É interessante notar que o dado do PDC é corroborado pelo ensaio clonogênico, que mostra que células individuais expostas ao co-tratamento tem capacidade clonogênica reduzida, tanto em número quanto em capacidade de formar colônias grandes, se comparadas às células tratadas com os tratamentos isolados, justificando, assim, a utilização dos dois compostos combinados em detrimento aos tratamentos isolados.

De todos os tratamentos realizados aqui, apenas a OXA na linhagem HT29 não apresentou uma toxicidade significativa cronicamente. Este dado corrobora os resultados de Yang e col (2015), os quais mostraram que OXA suprimiu a proliferação de células HCT116 ($TP53^{wt}$) mas não de HT29 e SW480 ($TP53^{mut}$) e HCT116 KO para $TP53$. Estes dados se confirmaram em modelo murino *in vivo* (Yang e col, 2016), no qual OXA reduziu o volume de tumores formados por células HCT116 $TP53^{wt}$ mas não por células HCT116 *knock out* para $TP53$. Estes resultados sugerem que OXA exerce sua toxicidade em células de CCR de maneira $TP53$ -dependente.

Outra conclusão importante a partir dos dados de OXA, e que corrobora dados de células de glioma tratadas com Temozolomida (Silva e col, 2016), nos mostra que respostas agudas (como a parada no ciclo celular) não possuem papel prognóstico na resposta crônica das células. De fato, nós mostramos que células HT29 tratadas com OXA acumulam em fase S e em G2/M após 48h; porém, não houve indução de apoptose em 3 dias após as 48h de tratamento, nem a aquisição de um fenótipo plenamente senescente. Além disso, a curva de crescimento a longo prazo, apesar de uma pequena redução nos 3 primeiros dias, não se mostrou diferente do controle.

D3. Ciclo celular e Apoptose

A partir destes resultados, nós passamos a investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito aditivo da combinação de 5FU e OXA a longo prazo – apoptose, modulação do ciclo celular, autofagia e senescência.

A indução de apoptose por 5FU em células de CCR já foi mostrada em diversas linhagens de CCR (De Angelis e col, 2006; Li e col, 2009; Bijnsdorp e col, 2010; Li e col, 2010; Fu e col, 2014), incluindo HCT116 e HT29. Molecularmente, a apoptose induzida por 5FU em CCR não envolve *TP53*, uma vez que ocorre tanto em linhagens *TP53^{wt}* quanto *TP53^{mut}* (Mhaydat e col, 2014; Sui e col, 2014), corroborando nossos dados. Por outro lado, parece envolver a proteína *PKCδ* e a ativação das caspases 7 e 9 (Fu e col, 2014; Mhaydat e col, 2014), aumento de ROS e ativação mediada por ROS da via Src, a qual ativa a via das caspases (Fu e col, 2014). É interessante notar, conforme mostrado por De Angeli e col (2006), que após o tratamento das células HCT116 com 5FU foram observados 2 picos de indução de apoptose, um após 10 dias e outro após 20 dias do tratamento com 5FU. Porém, é de suma importância destacar que a dose utilizada pelos autores é extremamente alta – 770 μ M – e não fisiológica (De Angelis e col, 2006).

Da mesma forma, a indução de apoptose após o tratamento com OXA e o dano ao DNA causado pelo quimioterápico também já foi mostrado em células de CCR (Shi e col, 2012; Yang e col, 2015). Aqui, nós observamos que OXA induziu apoptose apenas nas células HCT116, em níveis inferiores àqueles induzidos por 5FU, enquanto o co-tratamento induziu níveis de apoptose semelhantes aos de 5FU isoladamente.

Através da análise do ciclo celular, observamos que a OXA induziu acúmulo de células nas fases G2/M e S-G2/M em HCT116 e HT29, respectivamente, demonstrando que a parada no ciclo celular ativada por OXA ocorre de maneira *TP53*-independente. A parada em G2/M de maneira independente de *TP53* (e do efetor da parada, p21) em resposta a compostos platinados já foi demonstrada em células de CCR tratadas com satraplatina (Hata e col, 2005; Kalimutho e col, 2011), cisplatina e oxaliplatina. O tratamento com 5FU e o co-tratamento, por sua vez, não induziram alterações significativas no ciclo celular da linhagem HCT116, enquanto induziram acúmulo de células em fase G1-S na linhagem HT29. Em células de carcinoma escamoso de

laringe e carcinoma oral, 5FU também induziu parada na fase G1, de maneira *TP53*-independente (Li e col, 2004; Liu H. C. e col, 2006). Essa parada em fase G1 possivelmente foi induzida em função do mecanismo de ação do 5FU, que envolve a inibição da enzima timidilato sintase, ocasionando uma redução do *pool* de nucleotídeos. Esta redução é 'sentida' pela maquinaria do ponto de checagem de G1, levando à parada no ciclo celular mesmo na ausência de dano ao DNA (Linke e col, 1996; Agarwal e col, 1998), parada esta que atua como uma resposta antiapoptótica ao estresse metabólico (Hoeflerlin e col, 2011). Assim, conforme sugerido por Focetti e col (2014), a ativação da parada no ciclo celular pode ser um mecanismo de resistência do tumor frente ao 5FU. Conclusão semelhante pode ser feita a partir dos dados da OXA em HT29, a qual respondeu a esse tratamento com acúmulo de células em fase S e G2/M após 48h, seguido da proliferação normal da população celular, provavelmente devido à reparação do dano genotóxico. Neste contexto, a diferença observada entre as células HT29 e as células HCT116 (que acumularam em fase G2 com subsequente aumento de apoptose e redução da proliferação celular a longo prazo) pode ser explicada pelo fato da linhagem HCT116 apresentar mutações em inúmeras proteínas de reparo de DNA, conforme já citado, não sendo capaz de reparar o DNA.

A não alteração na dinâmica do ciclo celular nas células HCT116 em resposta tanto à 5FU quanto à OXA está provavelmente relacionado com os altos níveis de apoptose induzidos nestas células. As células HCT116 possuem duas características já citadas e que justificam este resultado: possuem a proteína *TP53* funcional e um fenótipo hipermutador. A partir de um número elevado de mutações, a ativação de *TP53* ultrapassa o chamado limiar de apoptose, levando as células à morte celular. De fato, a proteína *TP53* parece ter um papel importante na indução da apoptose, uma vez que a inibição de *TP53* em células HCT116 reduziu a apoptose induzida por OXA, sugerindo que *TP53* tem um papel importante neste processo (Chiu e col, 2009). Além de *TP53*, a proteína *APC* também parece ter um papel importante na decisão entre parada no ciclo celular e apoptose. Corroborando os dados encontrados aqui, células de CCR mutadas para *APC* (caso da linhagem HT29) apresentaram menor sensibilidade à 5FU, baixos níveis de apoptose e acúmulo em fase G1 do ciclo celular (Martino-Echarri e col, 2014).

No caso do tratamento com OXA, a porcentagem de células HCT116 acumuladas na fase G2/M do ciclo celular é elevada, enquanto a taxa de apoptose é menor em comparação ao tratamento com 5FU e com o co-tratamento, no qual não há parada no ciclo celular. Estes dados sugerem que quando há parada no ciclo celular (em resposta à OXA, por exemplo), há reparação de DNA e o sinal de dano não ultrapassa o limiar apoptótico. Esta resposta é semelhante nas células da linhagem HT29, porém com níveis reduzidos de apoptose tanto no tratamento com 5FU, quanto no co-tratamento, nos quais há acúmulo significativo de células em fase G1. Dessa forma, é possível inferirmos que a ativação do mecanismo de citoproteção e reparação de DNA permite às células sobreviverem, enquanto que nas condições em que o dano genotóxico e a sinalização de danos são elevados, há ativação de apoptose.

Nesse sentido, é possível hipotetizar que o co-tratamento de células de CCR com OXA e/ou 5FU combinados com inibidores de *checkpoint* (por exemplo, inibidores das proteínas *Chk1* e *Chk2*), culminaria em uma divisão mitótica incorreta e a morte celular (Zhou e col, 2004), potencializando o efeito da quimioterapia. De fato, o tratamento de células HCT116 *knock out* para a proteína *Chk2* potencializou o efeito da OXA através da indução de apoptose, o que não ocorreu em células *Chk2^{wt}* (Pires e col, 2010). Efeito semelhante foi observado em células de CCR tratadas com 5FU, nas quais o silenciamento de *Chk1* aumentou a sensibilidade ao quimioterápico (Martino-Echarri e col, 2014).

D4. Autofagia e Apoptose

Diversos trabalhos já mostraram a indução de autofagia após tratamento agudo (24h a 72h) com 5FU e OXA em células de CCR (**Tabelas 1 e 2**). Em inúmeros trabalhos, a apoptose foi induzida em paralelo à autofagia (Li e col, 2009; Bijnsdorp e col, 2010; Sui e col, 2014; Cottone e col, 2015; Liu H. G. e col, 2015; Yang e col, 2015). Em todos os casos, tanto na autofagia induzida por 5FU quanto induzida por OXA, a inibição farmacológica (3MA, Baf A1 e wortmannin) ou genética (shRNA para Atg5, *BECN1* e Atg7) reduziu a viabilidade das células e aumentou a apoptose induzida pelos quimioterápicos (Li e col, 2009; Li e col, 2010; Shi e col, 2012; Cottone e col, 2015) . Este resultado foi confirmado *in vivo* com a combinação de 5FU e 3MA, a qual reduziu o

tamanho tumoral em relação aos tratamentos isolados (Li e col, 2010). Por outro lado, a ativação da autofagia usando rapamicina contribuiu para proteger as células de CCR da toxicidade tanto do 5FU (Cottone e col, 2015) quanto da OXA (Shi e col, 2012), demonstrando o papel citoprotetor da autofagia.

Aqui, nós tratamos as células com o inibidor de autofagia 3MA, e observamos uma potencialização do efeito dos quimioterápicos, com redução do PDC e da capacidade clonogênica das células resistentes. Dessa forma, é possível hipotetizar que o co-tratamento de 5FU e/ou OXA em conjunto com um inibidor de autofagia poderia potencializar o efeito dos quimioterápicos, além de reduzir a resistência e a recorrência tumorais. É importante ressaltar que dados preliminares do grupo sugerem que a inibição da autofagia durante o momento de máxima ativação dos mecanismos tem um efeito significativamente maior em reduzir a proliferação celular quando comparado à inibição da autofagia concomitante ao tratamento com quimioterápicos.

O *crosstalk* entre autofagia e apoptose tem sido cada vez mais entendido (Mariño e col, 2014), incluindo os mecanismos moleculares que medeiam esta interação e podem ter um potencial translacional elevado para a clínica oncológica (Mariño e col, 2014; Galluzzi e col, 2015). Entre estes mecanismos, o mais clássico envolve a interação da proteína autofágica *BECN1* com a proteína antiapoptótica *Bcl-2*. A interação entre estas proteínas ‘neutraliza’ o papel da proteína *BECN1* na autofagia, impedindo a indução da mesma. Estímulos que desfazem esta interação, entre os quais está a fosforilação de *Bcl-2*, liberam a proteína *BECN1* para formar seu complexo de iniciação da autofagia. Neste sentido, o tratamento com 5FU induz aumento da proteína *JNK*, a qual fosforila a proteína *Bcl-2* e, conseqüentemente, libera a proteína *BECN1* para a célula em estresse disparar autofagia. A inibição de *JNK* reduz drasticamente a autofagia e aumenta a apoptose induzida por 5FU (Sui e col, 2014). Além desse mecanismo, a depleção de nucleotídeos causada pela ação da 5FU em inibir a timidilato sintase e a incorporação de 5FU ao DNA e o subsequente reparo do DNA são outros dois mecanismos que devem contribuir para o estímulo pró-autofágico causado pela 5FU (Linke e col, 1996; Agarwal e col, 1998; SenGupta e col, 2013).

Cronicamente, a indução transitória da autofagia após o tratamento agudo com quimioterápico foi recentemente mostrado em células de glioblastoma tratadas com

Temozolomida por 3h. Neste modelo também ocorreu um pico de indução de autofagia entre os dias 3 e 5, e a inibição de autofagia com 3MA também desviou as células tumorais à apoptose, reduzindo assim a senescência celular; por outro lado, a inibição da fusão de autofagossomos com lisossomos utilizando Bafilomicina A1 não induziu este efeito. É interessante notar que o retorno da proliferação das células de CCR ocorre exatamente a partir do dia em que há redução tanto da autofagia quanto de espécies reativas (RS), sugerindo que a partir do sétimo dia após o tratamento, as células já definiram o desfecho celular causado pelo estresse.

D5. Espécies reativas (RS) e Autofagia

O aumento de RS por 5FU faz parte do mecanismo de indução de apoptose pela droga, através da ativação da via pró-apoptótica SRC, sendo que os antioxidantes (NAC e catalase, por exemplo) reduzem o efeito pró-apoptótico do quimioterápico (Fu e col, 2014). Por outro lado, o aumento de RS induzido por OXA é importante para a indução de autofagia em células de CCR, a qual contribui para reduzir os níveis de RS em um mecanismo de *feedback* negativo e eliminação de dano intracelular, favorecendo a sobrevivência celular (Shi e col, 2012).

De fato, a autofagia parece ser importante para controlar os níveis de ROS intracelulares e a qualidade dos componentes celulares, especialmente das mitocôndrias. Corroborando esta hipótese, os níveis de ROS e a permeabilização mitocondrial foram aumentados em células A549 de câncer de pulmão tratadas com 5FU combinado com 3MA quando comparado com o tratamento com 5FU sozinho (Pan e col, 2013). Da mesma forma, Shi e col (2012) demonstraram que o tratamento com 3MA aumentou a produção de ROS por OXA em células de CCR, enquanto a Rapa (indutor da autofagia) diminuiu essa produção, sugerindo um importante papel da autofagia no controle dos níveis de ROS intracelulares. Uma vez que sabemos, conforme discutido nas seções anteriores da presente discussão, que o aumento de ROS está envolvido na indução de apoptose inclusive em células de CCR tratadas com 5FU e OXA, talvez parte do efeito anti-apoptótico observado da autofagia ocorra por supressão dos níveis de ROS.

Apesar de não termos analisado diretamente causa e consequência entre autofagia e níveis de RS, é possível inferirmos que exista uma relação de *crosstalk* semelhante à citada acima para a OXA (Shi e col, 2012). Aqui, nós observamos um aumento transitório de RS, com cinética bastante similar a da marcação com o laranja de acridina (AO). O pico de formação de RS ocorreu no dia 7 na linhagem HCT116 e no dia 5 para as células da linhagem HT29; já para o AO, o pico de indução ocorreu entre os dias 3 e 5, considerando a quantidade de células positivamente marcadas, e no dia 7, considerando a intensidade de indução. Nas duas linhagens o co-tratamento induziu maiores níveis de RS e AO do que os tratamentos isolados.

D6. Senescência e o Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP)

A longo prazo, nós observamos aumento da marcação para SA- β -gal tanto no tratamento com OXA quanto no co-tratamento após 7 dias, em ambas as linhagens. Em HCT116, à semelhança do efeito pró-apoptótico, o aumento por OXA foi mais pronunciado, especialmente considerando a quantidade de células grandes (FSC *high*) e positivamente marcadas para SA- β -gal. Na verdade, é importante destacar que na linhagem HT29 foi observado um aumento da marcação para SA- β -gal nos tratamentos com OXA e com a combinação, porém quando analisamos, ao mesmo tempo, o tamanho celular, verificamos que as células positivamente marcadas para SA- β -gal não apresentavam aumento de FSC. Considerando que houve um retorno da proliferação, em níveis semelhantes ao controle, após 3 dias do tratamento com OXA, é possível hipotetizar que apenas a marcação positiva para SA- β -gal pode não ser suficiente para determinar o fenótipo senescente. Por outro lado, no co-tratamento observamos um aumento de células positivas para SA- β -gal e com FSC elevado, acompanhado de uma parada na proliferação. O número de células com este fenótipo (SA- β -gal+ e FSC elevado) foi menor quando comparado com a linhagem HCT116, o que está de acordo com as diferenças na taxa de proliferação das células co-tratadas a partir do dia 5 e no PDC atingido ao final dos 15 dias para as duas linhagens. Uma vez que sabemos, conforme citado anteriormente, que a senescência induzida por OXA é *TP53*-dependente e a linhagem HT29 possui a proteína *TP53* mutada, podemos inferir que,

de fato, apenas a marcação positiva para SA- β -gal não define o processo de senescência propriamente dito.

No tratamento com a combinação de 5FU e OXA, nas células da linhagem HCT116, nós observamos uma porcentagem menor de senescência quando comparado ao tratamento com OXA sozinho, provavelmente em função da elevada indução de apoptose no dia 3. É interessante notar que, embora no co-tratamento não tenhamos visto uma evidente parada no ciclo celular após 48h, especialmente em HCT116, nós observamos aumento considerável de células em senescência (SA- β -gal+ e FSC elevado) após 7 dias.

A indução de senescência por 5FU (Tato-Costa e col, 2016) e, em maiores níveis, por OXA (Qu e col, 2013; Seignez e col, 2014) já foi demonstrada em células de diferentes tipos tumorais. Além disso, elevados níveis de senescência foram observados em modelo animal de CCR tratado com OXA (Seignez e col, 2014). Mais importante do que o processo de parada na proliferação celular, propriamente dito causado pela senescência em si, é preciso destacar o papel parácrino exercido por moléculas secretadas por células senescentes (o chamado Fenótipo Secretor Associado à Senescência – SASP) no microambiente tumoral. Entre as moléculas secretadas por células senescentes encontram-se fatores de crescimento como VEGF e PDGF, moléculas imunomoduladoras, moléculas moduladoras da inflamação, moléculas anti-apoptóticas, entre outras (Pérez-Mancera e col, 2014; Rao e col, 2016). Assim, através do SASP as células senescentes do microambiente tumoral proporcionam um ambiente favorável para o crescimento do câncer (Collado e col, 2007).

Moléculas presentes no SASP tem papel central na indução de dois processos observados em CCR, um pró-tumoral e outro anti-tumoral: (1) a transição epitélio-mesenquima (TEM), transformação do fenótipo epitelial das células tumorais em um fenótipo mesenquimal e migratório, favorecendo assim a progressão tumoral e o desenvolvimento de metástases (Tato-Costa e col, 2016); (2) o recrutamento de neutrófilos para o tumor, favorecendo a resposta imunogênica (Seignez e col, 2014).

O meio de cultura contendo o SASP de células HCT116 tratadas com 5FU induz TEM nessas células (Tato-Costa e col, 2016). Processo semelhante foi observado

em células epiteliais de pâncreas (Ohuchida e col, 2004) e mama (Coppé e col, 2008) expostas a um meio condicionado de fibroblastos contendo SASP. O processo de TEM é fundamental para a progressão tumoral e para o desenvolvimento de metástases. Através da TEM, ocasionada por mutações genéticas e alterações epigenéticas, as células tumorais adquirem resistência à *anoikis*, apoptose causada pelo despreendimento da matriz extracelular e pelo contato com outras células. De fato, as células HT29 resistentes à OXA adquirem um fenótipo mesenquimal, sugerindo a ocorrência de TEM, sendo possível inferir que este evento possa ter ocorrido por sinalização parácrina a partir de moléculas do SASP (Yang e col, 2006). Desse modo, eliminar as células senescentes geradas a partir do primeiro ciclo de terapia pode ter um papel central para evitar a recorrência tumoral. Além disso, é importante notar que fibroblastos senescentes também favorecem a TEM (Laberge e col, 2012; Val e col, 2015), o que sugere que não apenas a senescência induzida, mas também a senescência replicativa, exercem tal efeito.

Considerando o recrutamento de células imunológicas, recentemente Liu e col (2015) demonstraram que OXA induz aumento de HMGB1, marcador clássico de morte imunogênica, que também está envolvido na autofagia induzida por OXA, favorecendo a sobrevivência celular. Dessa forma, podemos hipotetizar que a combinação de OXA com moduladores da resposta imunogênica, poderia ser uma poderosa estratégia terapêutica para o tratamento de CCR. O racional por trás dessa combinação é que a OXA induziria senescência nas células tumorais, as quais secretariam moléculas de sinalização parácrina que, por sua vez, recrutariam células imunes para o sítio tumoral. Porém, sabe-se que as células tumorais superexpressam moléculas que ‘desligam’ as células do sistema imune, como os linfócitos T citotóxicos. É nesse ponto que o modulador da resposta imune antitumoral, como os inibidores de *checkpoint* imunogênico (anti-PD-L1), agem. Resultados iniciais envolvendo essa hipótese, mas com outro modulador do sistema imune que não moléculas anti-PD-L1, são promissores. Em modelo murino, Seignez e col (2014) trataram os animais com OXA e adicionaram o modulador imunológico OM-174, um análogo do lipídeo A. Esse modulador aumentou os índices de apoptose induzidos por OXA no tecido tumoral, ao mesmo tempo em que reduziu a porcentagem de células senescentes, provavelmente

pelo desvio das células à apoptose. A análise das citocinas presentes no microambiente tumoral tratado com OXA, o qual apresenta massiva indução de senescência, mostrou um aumento significativo de *IL6*, *IL8* (ambas pró-inflamatórias), além de *IFN-γ*, *IL-1β* e *TNF-α* (Seigneur e col, 2014). Este aumento, provavelmente, está envolvido no recrutamento de células imunes para o sítio tumoral. A dualidade do efeito do SASP no microambiente tumoral é reforçada neste modelo, pelo fato de, concomitante ao aumento das citocinas inflamatórias supracitadas, ter havido um aumento dos níveis de MMP3, o que facilitaria a progressão tumoral. Esta dualidade está presente também no papel da citocina IL6, que por um lado contribui para a resposta imune antitumoral e, por outro, também favorece a TEM (Lee e col, 2016), tornando ainda mais complexo este contexto. É importante destacar que o OMC-174 está atualmente em estudo clínico de fase 2 que já se mostrou eficiente em reduzir o câncer de mama, colorretal e melanoma *in vivo*.

D7. Mecanismos de resistência

O estudo acerca dos mecanismos de resistência envolvendo 5FU e OXA é fundamental para evitar que ocorra a recorrência tumoral, como observado aqui a partir de 7 dias após o tratamento. Alguns trabalhos têm buscado entender estes mecanismos, e nesta seção serão apresentados potenciais mecanismos de resistência a estes quimioterápicos. Neste sentido, De Angelis e col (2006) utilizaram como modelo a linhagem HCT116 parental e duas sublinhagens de HCT116 resistentes à 5FU (chamadas de continB e continD, sendo esta última a mais resistente). Os autores observaram que, embora as células resistentes à 5FU apresentaram índices bem menores de apoptose, os níveis de incorporação de 5FU foram semelhantes em ambas as linhagens, sugerindo que a apoptose induzida por 5FU independe da incorporação do mesmo ao DNA, mas sim por outros mecanismos como a depleção de nucleotídeos e aumento de ROS. Em outro trabalho, Denise e col (2015) mostraram que as células HT29 resistentes à 5FU possuem fosforilação oxidativa aumentada e maior massa mitocondrial. Além disso, foi observado um enriquecimento de 8 a 10 vezes da população de CSCs (células-tronco tumorais) após o tratamento (Denise e col, 2015), o que também foi observado por Huang e col (2015) na linhagem HCT116. O

enriquecimento de CSCs também foi observado em células de CCR após tratamento com OXA, incluindo a linhagem HCT116, sendo que neste caso a autofagia exerceu papel importante na resistência e sobrevivência da CSCs (Huang e col, 2015; Yang e col, 2015).

Portanto, a partir de tudo que foi discutido nas seções anteriores, entre os mecanismos de resistência à 5FU e OXA em células de CCR que parecem ter papel importante a partir dos nossos dados e dos estudos da literatura estão: (i) autofagia; (ii) modulação do ciclo celular, incluindo proteínas da resposta de dano ao DNA, como a *TP53*; (iii) presença de CSCs; (iv) alterações metabólicas e de estado oxidativo celulares; (v) resistência à apoptose por mutações em oncogenes e supressores tumorais. Alguns destes mecanismos já foram citados, porém outros merecem maior destaque por terem um potencial clínico relevante, conforme discutido aqui.

A resistência à apoptose é um ponto crítico que pode possibilitar a sobrevivência de tumores sob estresse metabólico, além de poder levar à quimiorresistência. Entre as abordagens que podem reverter essa resistência, de maneira indireta, está a modulação da autofagia. Devido a isso, a inibição da autofagia pode melhorar o efeito da quimioterapia como uma terapia adjuvante para tratamento do câncer (Liu et al. 2015). De fato, a autofagia parece ter um papel central na resistência de células de CCR à quimioterapia com 5FU e OXA. Recentemente, Filippi-Chiela e col (2015), demonstraram que os níveis de autofagia disparados por células individuais de glioma tratadas com Temozolomida contribuem para definir o desfecho da célula. Células com níveis reduzidos de autofagia tendem a entrar em apoptose, enquanto células com níveis mais elevados de autofagia tendem a sobreviver e entrar em senescência. Dessa forma, em mais de 70% dos contextos em que autofagia é induzida por quimioterápicos, esta atua favorecendo a sobrevivência tumoral (Galluzzi e col, 2015). Sendo assim, a modulação racional da autofagia em combinação com quimioterápicos apresenta amplo potencial terapêutico para reduzir as células tumorais resistentes (Thorburn e col, 2014).

Aqui nós observamos que a inibição da autofagia durante o período de ativação máxima do mecanismo, reduziu consideravelmente a curva de proliferação celular a longo prazo, sugerindo a indução de morte celular após o tratamento com 5FU isolado

ou em combinação. Além disso, observamos uma redução extrema do número de colônias formadas após a inibição da autofagia. Esta é a primeira vez, de nosso conhecimento, que é realizada uma análise a longo prazo de autofagia após tratamento com 5FU, OXA e com a combinação, de modo que este resultado abre a possibilidade da realização de ensaios em modelos animais.

Além do *crosstalk* com a apoptose, citado anteriormente, no qual a autofagia atua no sentido de suprimir a apoptose, a autofagia induzida por OXA contribui para a sobrevivência e enriquecimento de CSCs nas linhagens de CCR SW620 e SW480. A inibição da autofagia reduziu o número de CSCs que resistiram ao tratamento com OXA. Este *interplay* entre autofagia e CSCs forma um contexto poderoso de resistência tumoral, o qual pode ser modulado terapêuticamente para reduzir os índices de recorrência tumoral.

Até aqui, discutimos como a modulação da autofagia pode contribuir para reduzir a resistência tumoral. Porém, nos últimos anos tem-se obtido dados relevantes e com potencial para uso em terapia considerando a biologia das CSCs. As CSCs são células com diversas características que favorecem a resistência à morte celular, incluindo proliferação celular mais lenta (o que pode favorecer o controle de qualidade celular), metabolismo oxidativo aumentado (o que pode favorecer a resistência tumoral) e maior capacidade de reparação do DNA (Chen e col, 2013; Leon e col, 2016; Sancho e col, 2016). Além destas características, as CSCs têm maior capacidade antioxidante tornando-as não responsivas aos tratamentos e, ainda, mantendo sob controle os níveis de ROS que estão usualmente elevados durante todos os estágios de desenvolvimento do câncer (Dieh e col, 2009; Liou e col, 2010).

Em CCR diversos autores observaram o enriquecimento de células tronco após o tratamento tanto com 5FU, nas linhagens HCT116 (Huang e col, 2015) e HT29 (Denise e col, 2015) quanto com OXA, na linhagem HCT116 (Huang e col, 2015). Além disso, em ambas as linhagens HT29 (Dallas e col, 2009) e HCT116 (Huang e col, 2015), tanto as células resistentes à 5FU quanto as resistentes à OXA proliferaram mais lentamente do que as células parentais, sugerindo um fenótipo típico de CSCs. É interessante notar que nestes trabalhos a análise realizada sempre foi aguda (entre 24h e 72h), de modo que podemos inferir que as CSCs são as responsáveis pela retomada

de crescimento a longo prazo observada aqui (recorrência tumoral). Além disso, é importante destacar que o enriquecimento de CSCs após terapias não é exclusiva de CCR, tendo sido também observada em câncer de pâncreas (Viale e col, 2014), mama (Owens e col, 2015), pulmão (Leon e col, 2016), entre outros.

Denise e col (2015) observaram, utilizando a linhagem HT29, que as CSCs resistentes ao tratamento com 5FU possuem **aumento da massa mitocondrial**, além de apresentar um **aumento da fosforilação oxidativa** em resposta ao tratamento. Nesse mesmo estudo, a supressão da fosforilação oxidativa reduziu o potencial de formar esferas e a expressão dos marcadores de CSCs. Este aspecto é bastante interessante por duas razões: (i) a linhagem HT29 apresenta maior porcentagem de CSCs do que a linhagem HCT116 (Yeung e col, 2010); (ii) a linhagem HT29 se mostrou mais sensível à metformina (inibidor da fosforilação oxidativa) em comparação à linhagem HCT116 (Richard e col, 2015). De fato, CSCs parecem ter fosforilação oxidativa aumentada como principal fonte provedora de ATP (Viale e col, 2014; Gao e col, 2016), de modo que a modulação do metabolismo poderia ser uma estratégia terapêutica para reduzir a sobrevivência destas células e a recorrência tumoral (Song e col, 2015; Sancho e col, 2016).

Após o tratamento quimioterápico, De Angelis e col (2006) observaram o surgimento de dois picos de indução de apoptose, sendo que 90% das células sofreram o processo no dia 10 e 80% no dia 15. Isso sugere a presença de duas populações, sendo que aquela relacionada ao segundo pico pode ser caracterizada por CSCs, uma vez que, conforme já mencionado anteriormente, estas células realizam a progressão no ciclo celular mais lentamente, além de possuir uma maior capacidade de reparo dos danos do DNA. Neste modelo, é possível que o tratamento tenha sido capaz de afetar as CSCs, uma vez que a dose utilizada foi extremamente alta (770 μ M).

Finalmente, além da resistência à terapia, CSCs também exercem funções que favorecem a sobrevivência e progressão tumoral, incluindo a secreção de fatores de crescimento no microambiente tumoral como o VEGF, dando origem a outras células importantes para a progressão tumoral, como os pericitos dos vasos sanguíneos, entre outras características.

Considerando todos os aspectos levantados na discussão, é possível sugerirmos racionalmente algumas combinações de compostos com o objetivo de potencializar o efeito da quimioterapia em CCR:

1. 5FU + OXA + inibidores de autofagia: nós observamos que a inibição da autofagia durante o período de ativação máxima do mecanismo após tratamento com 5FU + OXA sensibilizou fortemente as células tumorais. A inibição farmacológica ou genética da autofagia aumenta, experimentalmente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a eficácia de algumas drogas e é uma abordagem com potencial para a melhoria das terapias atuais (Lopez e col, 2013). Inúmeras questões permanecem em aberto nesse sentido, tais como: (i) quando inibir a autofagia, principalmente no que diz respeito ao regime de tratamento do quimioterápico? (ii) qual etapa da autofagia inibir? Durante a formação do autofagossomo ou durante a fusão com o lisossomo? (iii) qual o melhor alvo molecular a ser inibido?

2. OXA + inibidores de Chk1/2: a parada no ciclo celular é um evento citoprotetor e, portanto, pró-tumoral; a inibição das proteínas Chk1/2 `desligaria` a via de sinalização de parada no ciclo celular, forçando as células a seguirem no ciclo, mesmo na presença de dano ao DNA, levando a falhas na mitose e, subsequentemente, à morte celular;

3. OXA + imunomoduladores (ex. anti-PDL1): as células tratadas com OXA tornam-se senescentes e passam a secretar moléculas que recrutam células imunológicas anti-tumorais; uma vez que as células tumorais expressam proteínas que `desligam` o sistema imune, a adição de anti-PDL1 poderia reativar as células do sistema imune já presentes no microambiente tumoral;

4. 5FU + OXA + metformina: enquanto 5FU e OXA induzem apoptose e senescência em grande parte das células mas não em CSCs, a metformina poderia contribuir para reduzir a porcentagem de CSC e, conseqüentemente, frear a recorrência tumoral;

A Figura 14 representa um esquema dos mecanismos avaliados neste projeto, bem como dos potenciais co-tratamentos que visam potencializar o efeito da quimioterapia em CCR.

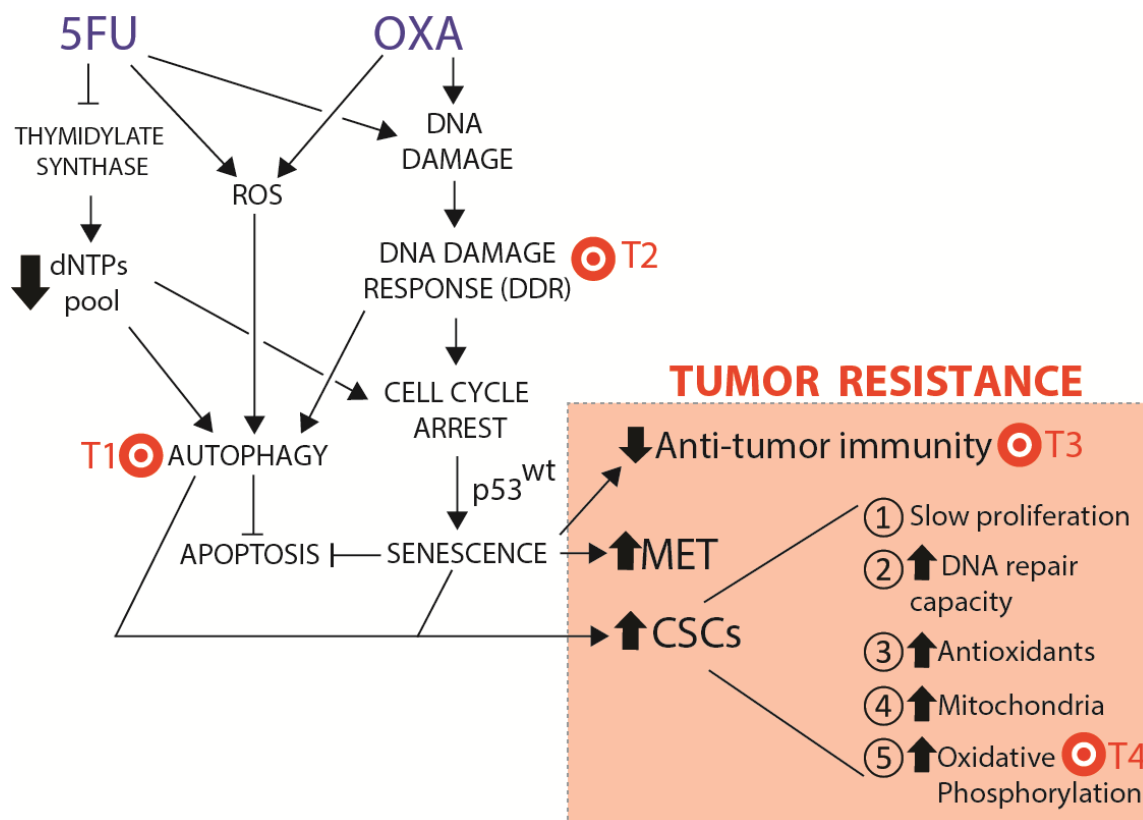


Figura 14. Visão geral do mecanismo de ação do co-tratamento 5FU+OXA em CCR e hipóteses geradas. O mecanismo de ação do 5FU se dá pela inibição da enzima timidilato sintetase, através da incorporação de seus outros metabólitos (fluoronucleotídeos) nos ácidos nucleicos, ocasionando bloqueio da síntese de DNA e danos no DNA. A OXA causa danos no DNA que, por sua vez, geram uma resposta de dano ao DNA (DDR), que envolve a ativação de uma série de proteínas, desde proteínas sensoras do dano ao DNA, moléculas transdutoras de sinal (como *Chk1/2* e *TP53*) e moléculas efetoras da parada no ciclo celular e reparadoras de DNA. Ambos os mecanismos geram ROS e ativam o processo de autofagia e a parada no ciclo celular, a fim de reparar os danos ocasionados pelos quimioterápicos. As células que possuem *TP53*wt conseguem evitar a apoptose e adquirem fenótipo senescente. Este comportamento pode: (i) favorecer a sobrevivência tumoral; (2) aumentar a probabilidade de ocorrência da transição epitélio-mesênquima (TEM) que permite a ocorrência de metástases; (3) diminuir a imunidade contra o tumor, permitindo a proliferação tumoral e, (4) juntamente com a autofagia, aumenta a presença de células tronco tumorais (CSCs). Estas, por sua vez, apresentam algumas características especiais com relação às células tumorais não tronco, entre elas: uma proliferação mais lenta, maior capacidade de reparo de DNA, além de ser mais antioxidante, ter mais mitocôndrias e maior capacidade de fosforilação oxidativa. Essas características podem contribuir para a resistência tumoral. Visando impedir esse processo, alguns tratamentos-alvo podem ser utilizados e estão representados através de T1 (inibidor da autofagia), T2 (inibição das proteínas *Chk1/2*), T3 (imunomoduladores) e T4 (inibidor da fosforilação oxidativa - metformina).

7. CONCLUSÃO GERAL

Dessa forma, seguem abaixo as principais conclusões obtidas no presente trabalho.

a. Não houve efeito citotóxico aditivo após o co-tratamento de 5FU e OXA em curto prazo quando comparado com o tratamento com 5FU sozinho.

b. A eficácia do co-tratamento foi demonstrada a longo prazo (15 dias) com o menor PDC após 15 dias e menor clonogenicidade no dia 7 para o co-tratamento com relação aos tratamentos isolados.

c. Apesar da redução na proliferação celular para todos os tratamentos (exceto OXA em HCT116), observamos um retorno da proliferação a partir do 7º dia em ambas as linhagens celulares, um perfil que sugere resistência tumoral e recorrência.

d. Por trás do efeito aditivo observado no co-tratamento está a combinação de mecanismos celulares ativados por cada droga - apoptose por 5FU e senescência por OXA (mas potencializado de maneira importante na combinação).

e. Observamos um aumento transitório dos níveis de RS e da marcação com laranja de acridina com um pico entre os dias 3 e 7 para ambos os tratamentos em ambas as linhagens celulares, em maior intensidade para o co-tratamento quando comparado aos tratamentos isolados.

f. A inibição racional da autofagia durante o pico de ativação dos mecanismos sensibilizou as células levando a uma redução do PDC e da clonogenicidade, sugerindo que a inibição da autofagia apresenta um potencial importante para aumentar a eficácia do tratamento.

8. PERSPECTIVAS

Diversas hipóteses foram geradas a partir dos dados obtidos e, por isso, como principais perspectivas do presente trabalho temos:

- i. Confirmar a indução do mecanismo da autofagia através de outro método, como por exemplo, LC3-GFP, ou western blot para LC3I-II e p62;
- ii. Realizar um experimento semelhante adicionando Leucovorin a fim de simular o tratamento FOLFOX utilizado na prática e verificar o efeito e o papel do mesmo no tratamento combinado de 5FU e OXA;
- iii. Avaliar a porcentagem de CSCs na população de células que sobrevivem aos tratamentos (dia 7 e dia 15);
- iv. Inibir a fosforilação oxidativa concomitante com o tratamento quimioterápico a fim de sensibilizar as células resistentes;
- v. Avaliar a quantidade e qualidade das mitocôndrias após o tratamento através dos métodos mitotracker e JC1 (em andamento);
- vi. Retratar as células expostas ao primeiro ciclo de tratamento e avaliar as respostas celulares diante deste segundo ciclo de tratamento.

REFERÊNCIAS

- Adams, J. M. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy". Oncogene 26, 1324–1337.
- Agarwal, M. L., A. Agarwal, et al. (1998). "A p53-dependent S-phase checkpoint helps to protect cells from DNA damage in response to starvation for pyrimidine nucleotides". Cell Biology 95: 14775–14780.
- Agostinelli, E. and N. Seiler (2006). "Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications". Amino Acids 31: 341–355.
- Ahmed, D., P. W. Eide, et al. (2013). "Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines". Oncogenesis 16;2:e71: 1-8.
- Alcindor, T. and N. Beauger. (2011). "Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy". Current Oncology 18(1): 18-25.
- Alizadeh, A. A., V. Aranda, et al. (2015). "Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity". Nature Medicine 21, 846–853.
- André, T., C. Boni, et al. (2009). "Improved Overall Survival With Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin As Adjuvant Treatment in Stage II or III Colon Cancer in the MOSAIC Trial". Journal of Clinical Oncology 27 (19): 3109-3116.
- Angeline, P. D., M., F. V. Fluck, et al. (2013). "Constitutive HER2 Signaling Promotes Breast Cancer Metastasis through Cellular Senescence". Cancer Res 73(1): 450-458.
- American Cancer Society, < <http://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>>, acessado em 21 de Janeiro de 2017.
- Arends, M. J. (2013). "Pathways of colorectal carcinogenesis." Appl Immunohistochem Mol Morphol 21(2): 97-102.
- Arnold, C. N., A. Goel and R. Boland. (2003). "Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines". Int. J. Cancer. 106: 66–73.
- Augustine, C. K., J. S. Yoo, et al. (2009). "Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma." Clin Cancer Res 15(2): 502-10.
- Beckerman, R. and C. Prives. (2010). "Transcriptional regulation by p53". Cold Spring Harb Perspect Biol 2(8): a000935: 1-18
- Behrens, J., B. A. Jerchow, et al. (1998). "Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta". Science. 24:596-599.
- Bijnsdorp, I. V., G. J. Peters, et al. (2010). "Differential activation of cell death and autophagy results in an increased cytotoxic potential for trifluorothymidine compared to 5-fluorouracil in colon cancer cells". Int. J. Cancer 126: 2457–2468.
- Bracht, K., A. M. Nicholls, et al. (2010) "5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency". British Journal of Cancer 103: 340-346.
- Branzei, D. and M. Foiani. (2008). "Regulation of DNA repair throughout the cell cycle". Nat Rev Mol Cell Biol 9(4): 297-308.
- Burz, C., I. Berindan-Neagoe, et al. (2009). "Clinical and pharmacokinetics study of oxaliplatin in colon cancer patients". J Gastrointestin Liver Dis. 18(1): 39-43.

- BRASIL, <
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao+>>, acessado em 28 de Dezembro de 2016.
- Campisi, J. (2001). "Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism." TRENDS in Cell Biology 11(11): S27-31.
- Casale, F., R. Canaparo, et al. (2004). "Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients". Pharmacol Res 50(2): 173-179.
- Chaney, S. G., S. L. Campbell, et al. (2004). "Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function". J. Inorg. Biochem. 98, 1551–1559.
- Chen, K., Y. H. Huang, et al. (2013) "Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges". Acta Pharmacologica Sinica 34: 732–740.
- Chiu, S. J., Y. J. Lee, et al. (2009). "Oxaliplatin-induced gamma-H2AX activation via both p53-dependent and -independent pathways but is not associated with cell cycle arrest in human colorectal cancer cells". Chemico-Biological Interactions 182: 173–182.
- Choi, T. G. and S. S. Kim. (2013). "Autophagy in Redox Signalling". Hanyang Med Rev 33(2): 83-89
- Chow, A. Y. (2010). "Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells". Nature Education 3(9):7
- Collado, M., M. A. Blasco, et al. (2007). "Cellular Senescence in Cancer and Aging". Cell 130: 223-233.
- Collado, M., M. Serrano, et al. (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans". Nat Rev Cancer 10(1): 51-57.
- Coppé, J. P., C. K. Patil, et al. (2008). "Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor". PLoS Biology 6(12): 2853- 2868.
- Coto, C. E. (2004). "Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves" Revista Química Viva 1(6): 9-16.
- Cotti, G. C. D. C. et al. (abr./dez. 2000). "Genética do câncer colorretal". Rev Med 79(2/4): 45-64.
- Cottone L., A. Capobianco, et al. (2015). "5-Fluorouracil causes leukocytes attraction in the peritoneal cavity by activating autophagy and HMGB1 release in colon carcinoma cells". Int. J. Cancer: 136, 1381–1389.
- Cuervo, A. M. (2004). "Autophagy: in sickness and in health". TRENDS in Cell Biology 14 (2): 70-77.
- Cunningham, D., W. Atkin, et al. (2010). "Colorectal cancer." Lancet 375(9719): 1030-1047.
- Dallas, N. A., L. Xia, et al. (2009). "Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition". Cancer Res. 69(5):1951-1957.
- Davies, H. et al. (2008). "Mutations of the BRAF gene in human cancer". Nature 417(6892): 949-954.
- De Angelis, P. M., D. H. Svendsrud, et al. (2006). "Cellular response to 5-fluorouracil (5FU) in 5FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery" Molecular Cancer 5:20: 1-25.

- Denise, C., Paoli et al. (2015). "5-Fluorouracil resistant colon cancer cells are addicted to OXPHOS to survive and enhance stem-like traits" Oncotarget 6(39): 41706-41721.
- Diehn, M., R. W. Cho, et al. (2009). "Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells". Nature 458: 780-785
- Ding, Z. B., B. Hui, et al. (2011). "Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation". Clin Cancer Res 17(19): 6229-6238
- Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis". Science. 274(5293): 1664-1672
- Farinã-Sarasqueta, et al. (2010). "The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients". Ann Oncol 21(12): 2396-2402.
- Filippi-Chiela, E. C., M. M. Oliveira, et al. (2012). "Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities." PLoS One 7(8): e42522: 1-10.
- Filippi-Chiela, E. C. (2015). Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. Autophagy 1(7): 1099-1113.
- Focaccetti, C., A. Bruno et al. (2014). "Effects of 5-Fluorouracil on Morphology, Cell Cycle, Proliferation, Apoptosis, Autophagy and ROS Production in Endothelial Cells and Cardiomyocytes". PLOS ONE: 1-25.
- Fridman, J. S. and S. W. Lowe. (2003). "Control of apoptosis by p53". Oncogene 22: 9030–9040.
- Fu Y., G. Yang, et al. (2014). "Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation". Cell Death Dis 5, e983: 1-10.
- Fulda, S. (2009). "Tumor resistance to apoptosis". Int. J. Cancer 124: 511–515.
- Fulda, S. (2010). "Evasion of Apoptosis as a Cellular Stress Response in Cancer". International Journal of Cell Biology: 1-6.
- Fulda, S. (2015). "Targeting apoptosis for anticancer therapy". Seminars in Cancer Biology 31: 84–88.
- Galluzzi, L., F. Pietrocola, et al. (2015). "Autophagy in malignant transformation and cancer progression". EMBO J. 34(7): 856-880.
- Gao C., Y. Shen, et al. (2016). "Cancer Stem Cells in Small Cell Lung Cancer Cell Line H446: Higher Dependency on Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation than Non-Stem Cancer Cells". PLoS ONE 11(5): 1-10.
- Goldar, S., M. S., Khaniani, et al. (2015). "Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment". Asian Pac J Cancer Prev 16(6): 2129-2144.
- Graham M. A., G. F. Lockwood, et al. (2000). "Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review". Clin Cancer Res. 6(4): 1205-1218.
- Gramont, J-F. B., C. Milan, et al. (1997). "Randomized Trial Comparing Monthly Low-Dose Leucovorin and Fluorouracil Bolus With Bimonthly High-Dose Leucovorin and Fluorouracil Bolus Plus Continuous Infusion For Advanced Colorectal Cancer: A French Intergroup Study". Journal of Clinical Oncology 15 (2): 808-815.

- Grivennikov S. I., F. R. Greten, et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer". Cell 140(6): 883-899.
- Grivicich, I., A. R, et al. (2007). " Morte Celular por Apoptose". Revista Brasileira de Cancerologia 53(3): 335-343.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer". Cell Press 100: 57–70
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "The Hallmarks of Cancer". Cell Press 144: 646–674
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events". Science 246(4930): 629-634.
- Hata, T., H. Yamamoto, et al. (2005). "Role of p21waf1/cip1 in effects of oxaliplatin in colorectal cancer cells". Mol Cancer Ther. 4(10):1585-1594.
- Hayflick L. and P. S. Moorhead. (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains". Experimental Cell Research 25(3): 585-621.
- Herman, J. G., A. Umar, K. Polyak et al. (1998). "Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma". Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 6870–6875.
- Hirose, Y., M. S., Berger, et al. (2001). "p53 Effects Both the Duration of G2/M Arrest and the Fate of Temozolomide-treated Human Glioblastoma Cells". Cancer Res 61(5): 1957-1963.
- Hoeflerlin, L. A., N. V., Oleinik, et al. (2011). "Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress". Genes & Cancer 2(9): 889–899.
- Huang, R., G. Wang, et al. (2015). "Colorectal cancer stem cell and chemoresistant colorectal cancer cell phenotypes and increased sensitivity to Notch pathway inhibitor". Molecular Medicine Reports 12: 2417-2424.
- Ilyas, M., I. P. Tomlinson, et al. (1997). "Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers." Proc Natl Acad Sci U S A 94(19): 10330-10334.
- Iwaizumi, M., S. Tseng-Rogenski and J. M. Carethers. (2011). "DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells". Cancer Biology & Therapy 12 (8): 756-764.
- Jiao L., D. Dan Li, et al. (2016). "Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelial-mesenchymal transition and invasive potential in colon cancer". Tumour Biol 37(6): 8413-8423.
- Jones B. A. and G. J. Gores. (1997). "Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine". Am J Physiol 273(6 Pt 1): G1174-1188.
- Kalimutho, M., A., Minutolo, et al. (2011). "Platinum-(IV)-derivative satraplatin induced G2/M cell cycle perturbation via p53-p21waf1/cip1-independent pathway in human colorectal cancer cells". Acta Pharmacol Sin 32(11): 1387–1396.
- Karabay, A. Z., A. Koc, et al. (2016). "Methylsulfonylmethane Induces p53 Independent Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cells". Int. J. Mol. Sci. 17 (1123): 1-19.
- Knutsen, T., H. M., Padilla-Nash, et al. (2010). "Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of 15 Colorectal Cancer Cell Lines". Genes Chromosomes Cancer 49(3): 204–223.
- Kondo, Y., T. Kanzawa et al. (2005). "The role of autophagy in cancer development and response to therapy". Nature Reviews 5: 726-734.

- Kracikova, M., G. Akiri, et al. (2013). "A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis". Cell Death and Differentiation 20: 576–588.
- Laberge, R. M., P. Awad, et al. (2012). "Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts". Cancer Microenviron 5(1):39-44.
- Lao, V. V. and W. M. Grady. (2011). "Epigenetics and colorectal cancer". Nat Rev Gastroenterol Hepatol 8(12): 686-700.
- Lee, S. O., X. Yang, et al. (2016). "IL-6 promotes growth and epithelial-mesenchymal transition of CD133+ cells of non-small cell lung cancer". Oncotarget 7(6):6626-6638.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein. (1997). "DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells". Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 2545–2550.
- Lenz, G. (2012). "Endogenous anticancer mechanisms (EACMs)". Front Biosci (Schol Ed) 1(4):1017-1030.
- Leon G., L. MacDonagh, et al. (2016). "Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways". Pharmacol Ther. 158: 71-90.
- Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy". Developmental Cell 6: 463–477.
- Li J., N. Hou, et al. (2009). "Inhibition of Autophagy by 3MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells". Ann Surg Oncol 16:761–771.
- Li, J., N. Hou, et al. (2010). "Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model." Eur J Cancer 46(10): 1900-1909.
- Li, M. H., D. Ito, et al. (2004). "Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines". Oral Oncology 40: 63–70.
- Li X., B. Bai, et al. (2015). "Novel β -carboline against colorectal cancer cell growth via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling". Cell Death Discovery 1(1503): 1-9
- Li, Z., Y. Yang et al. (2011). "Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer". Biochemical and Biophysical Research Communications 414: 5–8.
- Linke, S. P, K. C., Clarkin, et al. (1996). "A reversible, p53-dependent Go/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage". Genes Dev 10: 934-947.
- Liou, G. Y. and P. Storz. (2010). "Reactive oxygen species in cancer". Free Radic Res 44(5): 1-31.
- Liu H. C., G. G., Chen, et al. (2006). "5-fluorouracil mediates apoptosis and G1/S arrest in laryngeal squamous cell carcinoma via a p53-independent pathway". Cancer J. 12(6): 482-93.
- Liu, W., Z. Zhang, et al. (2015). "HMGB1-mediated autophagy modulates sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin via MEK/ERK signaling pathway". Cancer Biol Ther. 16(4): 511-517.
- Liu Y. and W. F. Bodmer. (2006). "Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A 103(4): 976-981.
- Lopez, P. L., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2013). "Sensitization of glioma cells by X-linked inhibitor of apoptosis protein knockdown." Oncology 83(2): 75-82.

- Loree, J. M., K. E. Mulder, et al. (2014). "Retrospective comparison of CAPOX and FOLFOX dose intensity, toxicity, and clinical outcomes in the treatment of metastatic colon cancer." J Gastrointest Cancer 45(2): 154-160.
- Mariño, G. et al. (2014). "Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis". Nat Rev Mol Cell Biol. 15(2): 81-94.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med 361(25): 2449-2460.
- Martino-Echarri, E., B. R., Henderson, et al. (2014). "Targeting the DNA replication checkpoint by pharmacologic inhibition of Chk1 kinase: a strategy to sensitize APC mutant colon cancer cells to 5-fluorouracil chemotherapy". Oncotarget 5(20): 9889-9900.
- Marusyk, A. and K. Polyak. (2010). "Tumor heterogeneity: causes and consequences". Biochim Biophys Acta 1805(1): 105-117.
- Mehmood, R. K. (2014). "Review of cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments". Oncology Reviews 8:256.
- Mhaidat, N. M., M. Bouklihacene et al. (2014) "5- Fluorouracil induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase 9 dependent and mediated by activation of protein kinase C δ ". Oncology Letters 8: 699-704.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev 21(22): 2861-2873.
- Mizushima, N., B. Levine et al. (2008). "Autophagy fights disease through cellular self-digestion". Nature 451(7182): 1069–1075.
- Mjelle, R., S. A. Hegre, et al. (2015). "Cell cycle regulation of human DNA repair and chromatin remodeling genes". DNA Repair (Amst) 30: 53-56.
- Negrei, C., A. Hudita et al. (2016). "Colon Cancer Cells Gene Expression Signature As Response to 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, and Folinic Acid Treatment". Front. Pharmacol. 7 (172): 1-10
- Ohuchida K., K. Mizumoto, et al. (2004). "Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions". Cancer Res 64(9): 3215-3222.
- Okugawa Y, W. M. Grady, et al. (2015). "Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers". Gastroenterology 149(5): 1204-1225.e12.
- Otto, T and P. Sicinski. (2017). "Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy". Nat Rev Cancer 17(2): 93-115.
- Owens T. W. and M. J. Naylor. (2013). "Breast cancer stem cells". Front Physiol 4(225): 1-10.
- Ozpolat B. and D. M. Benbrook (2015). "Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments". Cancer Manag Res 7: 291-299.
- Pan, X., X. Zhang, et al. (2013). "Autophagy Inhibition Promotes 5-Fluorouracil-Induced Apoptosis by Stimulating ROS Formation in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells." PLoS One 8(2): 1-9.
- Pavlova N. N. and C. B. Thompson. (2016). "The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism". Cell Metabolism 23(1): 27–47.
- Pérez-Mancera, P. A., A. R. J., Young, et al. (2014). "Inside and out: the activities of senescence in cancer" Nature Reviews Cancer 14: 547–558.
- Phillips, B., M. Kalady, et al. (2010). "BRAF testing in advanced colorectal cancer: is it ready for prime time?" Clin Adv Hematol Oncol 8(6): 437-444.

- Pires, I. M., T. H. Ward et al. (2010). "Oxaliplatin responses in colorectal cancer cells are modulated by CHK2 kinase inhibitors". British Journal of Pharmacology 159: 1326–1338.
- Powell, S.M., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis". Nature 359: 235-237.
- Purvis, J. E., K. W. Karhohs, et al. (2012). "p53 dynamics control cell fate". Science. 336(6087): 1440–1444.
- Qu, K., X. Xua, et al. (2013). "Negative regulation of transcription factor FoxM1 by p53 enhances oxaliplatin-induced senescence in hepatocellular carcinoma". Cancer Letters 331(1): 105–114.
- Quail, D. F. and J. A. Joyce. (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis". Nature Medicine 19(11): 1423–1437.
- Rao, S. G. and J. G. Jackson. (2016). "SASP: Tumor Suppressor or Promoter? Yes!". Cell Press 2(11): 676–687.
- Richard, S. M., and V. L. M., Marignac. (2015). "Sensitization to oxaliplatin in HCT116 and HT29 cell lines by metformin and ribavirin and differences in response to mitochondrial glutaminase inhibition". J Cancer Res Ther 11(2): 336-340.
- Roh, S., E. Y. Choi, et al. (2012). "Characterization of biological responses of colorectal cancer cells to anticancer regimens". J Korean Surg Soc 83(1): 21-29.
- Rosenfeldt, M. T. and K. M. Ryan (2011). "The multiple roles of autophagy in cancer." Carcinogenesis 32(7): 955-963.
- Sancho, P., D. Barneda, et al. (2016). "Hallmarks of cancer stem cell metabolism". Br J Cancer. 114(12):1305-1312.
- Sanoff, H. K. and R. M. Goldberg (2013). "How we treat metastatic colon cancer in older adults". Journal of Geriatric Oncology 4: 295-301.
- Seignez C., A. Martin, et al. (2014). "Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils" Oncotarget. 5(22): 11442–11451.
- SenGupta, T., M. L. Torgersen. (2013). "Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy". Nature Communications 4:2674: 1-12.
- Shi, Y., B. Tang, et al. (2012). "Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells." PLoS One 7(11): e51076: 955–963.
- Silva, A. O. E. Dalsin, et al. (2016). "The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines". Exp Cell Res. 348(2):177-183.
- Sinicrope, F. A. (2010). "DNA mismatch repair and adjuvant chemotherapy in sporadic colon cancer". Nat Rev Clin Oncol. 7(3): 174–177.
- Sinicropet, F. A. and Z. J. Yang. (2011). "Prognostic and predictive impact of DNA mismatch repair in the management of colorectal cancer". Future Oncol. 7(3): 467–474.
- Sinicrope, F. A. and D. J. Sargent. (2012). "Molecular Pathways: Microsatellite Instability in Colorectal Cancer: Prognostic, Predictive, and Therapeutic Implications". Clin Cancer Res. 18(6): OF1- OF7
- Song, I. S., J. Jeong, et al. (2015). "Mitochondrial metabolism in cancer stem cells: a therapeutic target for colon cancer". BMB Rep 48(10):539-540.

- Sui X., N. Kong, et al. (2014). "JNK confers 5-fluorouracil resistance in p53-deficient and mutant p53-expressing colon cancer cells by inducing survival autophagy." Sci Rep 4:4694: 1-8.
- Tamas, K., A. M. E. Walenkamp et al. (2015). "Rectal and colon cancer: Not just a different anatomic site". Cancer Treatment Reviews 41:671–679.
- Tato-Costa, J., S., Casimiro, et al. (2016). "Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer". Clinical Colorectal Cancer 15(2): 170–178.e3.
- Thomé, M. P., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2016). "Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy." J Cell Sci 129: 4622-4632.
- Thompson, S. L. and D. A., Compton. (2008). "Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells". The Journal of Cell Biology 180(4): 665–672.
- Thorburn, A., D. H. Thamm, et al. (2014). "Autophagy and Cancer Therapy". Mol Pharmacol 85(6): 830–838.
- Tournigand, C., T. André et al. (2004). "FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study". Journal of Clinical Oncology 22 (2): 229-237.
- Val M. M., L. A. Mendes, et al. (2015). "Senescent bronchial fibroblasts induced to senescence by Cr (VI) promote epithelial-mesenchymal transition when co-cultured with bronchial epithelial cells in the presence of Cr(VI)". Mutagenesis. 30(2): 277-286.
- Van Cutsem, E. J. and J. Oliveira. (2008). "Advanced colorectal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol 19 Suppl 2: ii33-34.
- Van Cutsem, E. J., J. Oliveira, et al. (2005). "ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of advanced colorectal cancer." Ann Oncol 16 Suppl 1: i18-19.
- Vessoni, A. T., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2013). "Autophagy and genomic integrity." Cell Death Differ 20(11): 1444-1454.
- Viale, A., P. Pettazoni, et al. (2014). "Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function." Nature 514(7524): 628-632.
- Violette, S., Poulain, L., et al. (2002). "RESISTANCE OF COLON CANCER CELLS TO LONG-TERM 5-FLUOROURACIL EXPOSURE IS CORRELATED TO THE RELATIVE LEVEL OF BCL-2 AND BCL-XL IN ADDITION TO BAX AND P53 STATUS". Int. J. Cancer: 98, 498–504.
- Visconti, R., R. D. Monica et al. (2016). "Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword". J Exp Clin Cancer Res 35(1): 153: 2-8.
- Woynarowski, J. M., Chapman, W. G., et al. (1998). Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. Mol. Pharmacol. 54, 770–777.
- Yang A. D., F. Fan. (2006). "Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines". Clin Cancer Res.12(14 Pt 1):4147-4153.
- Yang, Z. J., C. E. Chee, et al. (2011). "The role of autophagy in cancer: therapeutic implications." Mol Cancer Ther 10(9): 1533-1541.

- Yang H. Z., Y. Ma, et al. (2015). "Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment". Cancer Letters 361: 128–136.
- Yang, C., Q. Zhou, et al. (2016). "Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines". Sci Rep 6:33078: 1-11.
- Yao, K., J. A. Gietema, et al. (2005). "In vitro hypoxia-conditioned colon cancer cell lines derived from HCT116 and HT29 exhibit altered apoptosis susceptibility and a more angiogenic profile in vivo". Br J Cancer 93 (12): 1356-1363.
- Yeung, T. M., S. C. Gandhi, et al. (2010). "Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines". Proc Natl Acad Sci U S A 107(8):3722-3727.
- Yoo, P. S., R. I. Lopez-Soler, et al. (2006). "Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab." Clin Colorectal Cancer 6(3): 202-207.
- Zamin, L. L., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2009). "Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells." Cancer Sci 100(9): 1655-1662.
- Zeestraten, E. C.M., A. Benard, et al. (2013). "The Prognostic Value of the Apoptosis Pathway in Colorectal Cancer: A Review of the Literature on Biomarkers Identified by Immunohistochemistry". Biomark Cancer. 5: 13–29.
- Zhang, J. (2013). "Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control." Redox Biol 1(1): 19-23.
- Zhou, B. B. S. and J. Bartek, et al. (2004). "TARGETING THE CHECKPOINT KINASES: CHEMOSENSITIZATION VERSUS CHEMOPROTECTION". Nature Reviews 4: 1-10.