

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação do papel da proteína ATR na indução de autofagia e senescência
por Temozolomida em células de Glioblastoma**

Alexandra Souza Vigna

Orientador: Dr. Guido Lenz

Co-orientador: Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Porto Alegre, Março de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação do papel da proteína ATR na indução de autofagia e senescência
por Temozolomida em células de Glioblastoma**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Alexandra Souza Vigna

Orientador: Dr. Guido Lenz

Co-orientador: Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Porto Alegre, Março de 2017

Dedicatória

Ao meu querido pai, Adalberto Vigna (*in memoriam*), pelo amigo e pai exemplar que sempre foi.

Agradecimentos

À minha mãe, Cléo Vigna que sempre lutou com muita força para que pudéssemos ter uma educação excelente. Sei que não foi fácil proporcionar isto a três filhos, mas tu fizeste com muita garra, dedicação e muito amor;

Ao meu pai (*in memoriam*), que além de ser um grande pai, meu amigo, amigo dos meus amigos e amante da vida sempre deixou a vida de todos - a minha principalmente - mais leve.

Agradeço a minha irmã e irmão pelo amor e a família Inglesa, os Barkers, que participou de toda a minha formação acadêmica apoiando cada decisão e acompanhando todos os meus passos desde 2010.

Aos meus queridos amigos da Inglaterra, que me apoiaram minha decisão de voltar pra encarar esse projeto e aos amigos de Porto Alegre e Florianópolis que me deram força ao longo do projeto;

Cléo, Adalberto (*in memoriam*), Nicolle e Carlo Vigna. Loralie, Randal, Zoe, Hugo e Max Barker: Amo todos vocês.

À minha namorada, Antônia Pereira, que caminha comigo há seis anos e que com muito amor e paciência participou diretamente, não só deste projeto, mas de muitos outros. Devo também um agradecimento à sua família, em destaque à Eliane Maria Cortêz Teixeira Leite Flores, que participou diretamente do meu ingresso à UFRGS e que esteve sempre presente ao longo desses últimos anos aqui no Brasil.

Aos meus colegas do Labsinal não somente agradeço como deixo minha grande admiração pelos grandes profissionais que são. “ Quando crescer quero ser igual à vocês”.

Em especial, agradeço aos meus colegas e amigos Giovana Onzi, Marcos Paulo Thomé e Mariana Brutschin pela paciência, ajuda, parceria e amizade nesses últimos dois anos. A vocês devo o pouco que sei dentro da ciência e a força que

tive pra trabalhar muitas vezes sobre pressão e em um ambiente muitas vezes caótico. Obrigada por fazerem esses momentos mais alegres.

Aos queridos que me orientaram direta ou indiretamente nesse trabalho, Karina Bettega, Guido Lenz e Eduardo Cremonese Filippi-Chiela, muito obrigada pela paciência e orientação. Admiro-os muito e confio no trabalho de todos vocês.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, funcionários e professores do PPGBCM. Foi um grande prazer poder aprender um pouco com vocês, pessoas que admiro muito.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo financiamento.

Sumário

<u>Lista de Abreviaturas</u>	<u>7</u>
<u>Lista de Figuras e Tabelas</u>	<u>10</u>
<u>Resumo</u>	<u>11</u>
<u>Abstract</u>	<u>12</u>
<u>1 Introdução</u>	<u>13</u>
1.1 DANO NO DNA	13
1.1.1 Resposta ao dano no DNA (DDR).....	14
1.1.2 Dano induzido por Temozolomida.....	18
1.2 AUTOFAGIA	20
1.2.1 Tipos de autofagia.....	21
1.2.1.1 Microautofagia.....	21
1.2.1.2 Autofagia mediada por chaperonas.....	22
1.2.1.3 Macroautofagia.....	22
1.2.2 Progressão Morfológica e Maquinaria.....	22
1.2.3 Autofagia e Câncer.....	26
1.2.4 Autofagia e DDR.....	29
1.3 SENESCÊNCIA	30
1.3.1 Mecanismos moleculares da Senescência.....	32
1.3.2 Tipos de Senescência.....	33
1.3.2.1 Senescência Replicativa.....	33

1.3.2.2 Senescência Induzida.....	34
1.3.3 Senescência e Câncer.....	36
2 Objetivos	38
3 Artigo Científico	39
3.1 Introduction.....	42
3.2 Results.....	44
3.3 Discussion.....	52
3.4 Materials and Methods.....	55
4 Discussão	60
5 Conclusões	63
6 Referencias Bibliográficas	64
7 Currículo Lattes	68

Lista de Abreviaturas

Akt (ou PKB) - *Protein Kinase B*

AMPK – *AMP-activated Protein Kinase*

AT - *Ataxia-telangiectasia*

ATG - *Autophagy-related Proteins*

ATM - *Ataxia-telangiectasia mutated*

AO - *Acridine Orange*

ATR - *Ataxia-telangiectasia and Rad3 related*

ATRIP- *ATR interaction Protein*

AVOs - *Acidic Vacuolar Organelles*

BER - *Base Excision Repair*

Brca - *Breast Cancer Associated*

CDK - *Cyclin-Dependent Kinase*

CDKN1A - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A*

CDKN2A - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*

Chk1/2 - *Checkpoint kinase 1 and 2*

CMA - *Chaperone-mediated Autophagy*

CPD - *Cumulative Population Doubling*

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DDR - *DNA Damage Response*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - *Dimethyl Sulfoxide*

DNA- *Deoxyribonucleic acid*

DSB - *Double-strand Break*

EGF - *Epidermal Growth Factor*

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

FBS - *Fetal Bovine Serum*

GBM - *Glioblastoma*

HIF1A - *Hypoxia- Inducible Factor 1- alfa*

IL - *Interleucin*

KD - *KnockDown*

kDa - *kilodalton*

LC3 (*MAP1LC3*) - *Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3*

MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MMR - *Mismatch Repair*

mTOR - *mammalian Target Of Rapamycin*

NER – *Nucleotides Excision Repair*

NHEJ – *Non-homologous End Junction*

NMA - *Nuclear Morphometric Analysis*

OIS - *Oncogene-Induced Senescence*

PAS - *Phagophore Assembly Site or Pre-Autophagosomal Structure*

PBS - *Phosphate-Buffered Saline*

PI - *Propidium Iodide*

PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIP3 - *Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate*

pRB - *Retinoblastoma protein*

PTEN - *Phosphatase and Tensin homolog*

ROS - *Reactive oxygen species*

RPA - *Replication Protein A*

SQSTM1/p62 - *Sequestosome 1*

TMZ - *Temozolomide*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1- Chk1 e Chk2 como mediadoras da sinalização pós dano no DNA.....	16
Figura 2- Efeitos da resposta ao dano no DNA e o desfecho celular.....	17
Figura 3 - Tipos de autofagia.....	21
Figura 4 - Organização geral do processo da autofagia.....	23
Figura 5 - Maquinaria da autofagia em diferentes estágios do processo.....	25
Figura 6 - Autofagia na Progressão tumoral.....	28
Figura 7 - Mecanismos da senescência.....	31
Tabela 1 - Tipos de senescência.....	33

Resumo

Autofagia é um processo de degradação fisiológico aumentado em diferentes condições de estresse, em que proteínas e organelas não funcionais são direcionadas ao lisossomo, onde são degradadas e os produtos da degradação reutilizados pela célula. Senescência é o processo em que as células param de dividir e entram em um estado de parada celular irreversível. Os dois processos, autofagia e senescência, podem ser induzidos na presença de dano no DNA, porém a maquinaria molecular que realiza a intermediação neste processo ainda é incerta. Temozolomida (TMZ) é um agente alquilante, usado para tratar pacientes com Glioblastoma, que induz dano no DNA. Lesões produzidas por TMZ ativam a resposta ao dano no DNA (DDR), uma sinalização complexa que medeia as respostas celulares, tais como a dinâmica do ciclo celular, autofagia, senescência e morte celular, ao dano genotóxico. Dada a importância desses mecanismos, esse trabalho objetiva avaliar o impacto da inibição da cinase Ataxia Telangiectasia mutada dependente de Rad3 (ATR), reguladora chave da DDR, na proliferação, autofagia e senescência em células de glioblastoma tratadas com TMZ. Para tal, nós utilizamos um inibidor farmacológico para ATR (VE-821), bem como shRNA para ATR com vetor lentiviral em células U87. A inibição farmacológica da proteína ATR não alterou o estado autofágico e de senescência em comparação com as células tratadas somente com TMZ. Esses resultados foram obtidos usando o método Laranja de Acridina (AO) e a ferramenta de Análise Morfométrica Nuclear (NMA). Na ausência de uma sinalização dependente de ATR, obtida pelas células shATR tratadas com TMZ, também não observamos alteração significativa em relação a esses processos. No entanto, nós observamos um acúmulo da proteína SQSTM1/p62, substrato da autofagia, nas células silenciadas para ATR. Esta alteração não se refletiu em aumento de foci intracelulares da proteína SQSTM1/p62. Em conclusão, ATR não parece participar diretamente da ativação da Autofagia e da Senescência induzidas por TMZ.

Abstract

Autophagy is a catabolic process, that shows increased levels in stressful situations, whereby dysfunctional proteins and organelles are engulfed and targeted to lysosomes for degradation and recycled back to the cell. Senescence is the process by which cells stop dividing and enter a state of growth arrest. Both processes, autophagy and senescence, can be induced by DNA damage, however, the molecular machinery that mediates this process is still uncertain. Temozolomide (TMZ) is an alkylating agent, used to treat patients with Glioblastoma, that drives DNA damage. Lesions produced by TMZ activate the DNA damage response (DDR), a complex signalling pathway, that mediates cellular outcomes such as cell cycle distribution, autophagy, senescence and cellular death, to genotoxic damage. Given the importance of such mechanisms, this work aims to evaluate the impact of inhibiting the Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) kinase, key regulator of the DDR, on cellular proliferation, autophagy and senescence, on Glioblastoma (GBM) cells treated with TMZ. In order to do that, we used a pharmacological inhibitor for ATR (VE-821) as well as shRNA to ATR, in U87 cells using lentiviral vectors. The pharmacological inhibition of ATR did not alter the autophagic or senescence status in comparison with the cells treated with TMZ only. Such results were obtained by Acridine Orange (AO) assessment and Nuclear Morphometric Analysis (NMA) tool. In the absence of an ATR dependent signalling, assessed through shATR cells treated with TMZ, no significant alteration in relation to such processes was seen. However, we observed an accumulation of the SQSTM1/p62 protein, a selective autophagy substrate, on cells silenced for ATR. This accumulation did not reflect in increased intracellular foci formation of SQSTM1/p62 protein. In conclusion, ATR doesn't seem to play a direct role in the Autophagy and Senescence induced by TMZ.

1 Introdução

1.1 Dano no DNA

Em condições fisiológicas, células sofrem inúmeros eventos de danos no DNA e diferentes mecanismos de resposta e reparo são disparados para que a célula mantenha a integridade genômica. Diversos agentes químicos, radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante e inúmeros fármacos, são apenas alguns exemplos de indutores de dano que geram lesões no DNA (Roos *et al.*, 2016). De fato, a instabilidade genômica é considerada um dos *hallmarks* do câncer e está associada ao acúmulo de danos no DNA (Hanahan & Weinberg, 2011).

Células respondem ao dano pela ativação de vias que direcionam o desfecho celular, sinalizando para o reparo, para modulação do estado proliferativo celular (ciclo celular e senescência), respostas adaptativas (autofagia e modulações do metabolismo celular) ou para morte celular. Essa “decisão”, entre sobreviver ou morrer, é dependente de fatores que reconhecem esse dano e estão envolvidos no reparo, ou fatores que ativam apoptose, necrose, autofagia e senescência (Zhou and Elledge, 2000). Esses fatores, fazem parte de um complexo de aproximadamente 450 proteínas que interagem entre si, por múltiplas vias e “decidem” o destino da célula pelo mecanismo de resposta ao dano no DNA (DDR- **DNA Damage Response**). Pela DDR, diferentes formas de danos são reparadas por diferentes sistemas de reparo, com a ativação de vias de sinalização. No entanto, vias específicas que não são ativadas em caso de dano podem ser compensadas por outras (O’Connor, 2015). Uma analogia que pode ser feita nesse caso seria a de um carpinteiro, que necessita de uma ferramenta para fazer um conserto e, na ausência desta, usa outra para concluir o trabalho. Nesse caso, o trabalho é concluído, porém, sem a mesma qualidade ou resultado do que se o carpinteiro tivesse usado a ferramenta correta (O’Connor, 2015).

Em células humanas existem 5 principais sistemas de reparação de DNA: Reparo por excisão de base (BER), reparo por recombinação homóloga (HRR),

junção de extremidades não homologas (NHEJ), reparo por excisão de nucleotídeo (NER) e reparo de mal pareamento (MMR). Os mecanismos desses reparos não serão discutidos em detalhe, porém é importante destacar que além de depender do tipo de dano, a ativação dessas vias de reparo também é dependente do status do ciclo celular (Haken, 2008; O'Connor, 2015).

1.1.1 A resposta ao dano no DNA

A cascata de sinalização da DDR é ativada na presença de lesões no DNA, que foram geradas por indutores de dano ou estresse replicativo. Em células de mamíferos, ataxia-telangiectasia mutada (ATM), ATM relacionada a Rad3 (ATR) e as proteínas cinases dependentes de DNA (DNA-PKs), são as cinases centrais da DDR. Dessas proteínas, sai o sinal *downstream* para conduzir uma parada e prevenir a progressão do ciclo celular, via ativação de proteínas de ponto de checagem, bem como pelo recrutamento de proteínas envolvidas na reparação do DNA (Roos *et al.*, 2016).

As proteínas ATM e ATR possuem um papel central na DDR e apresentam especificidades distintas. Enquanto a ATM é primeiramente ativada em locais de quebra dupla da fita no DNA (DSB; **Double Strand Breaks**), ATR responde a diversos tipos de dano que interferem na replicação, incluindo DSBs (Maréchal & Zou, 2013). Mediante a sua ativação inicial, ATM sinaliza para a fosforilação da H2AX (histona H2A fosforilada). O reconhecimento e processamento do dano na cromatina requer modificações da H2AX para que a sinalização para o reparo do DNA aconteça. Em princípio, essas três cinases (ATR, ATM e DNA-PK) possuem o potencial de fosforilar a H2AX. No entanto, por estar presente imediatamente nos sítios de modificação, onde ocorre quebra dupla, ATM é a cinase que fosforila a H2AX com maior frequência (Kinner *et al.*, 2008). A proteína ATM é rapidamente ativada e sinaliza para a fosforilação de diferentes substratos, tais como as supressoras tumorais Brca1 e p53, e a proteína de ponto de checagem Chk2.

Como descrito anteriormente, diferente da ATM, a ATR é fosforilada em diferentes situações de dano no DNA. Essa ativação é mediada pela interação de ATR com a proteína de interação da ATR (ATRIP; **ATR Interaction Protein**). A localização de ATR-ATRIP nos sítios de dano é dependente da interação de ATRIP com a proteína de replicação A (RPA; **Replication Protein A**), localizada nas fitas simples do DNA (Maréchal & Zou, 2013). Quando a DSB acontece antes da replicação, a primeira linha de defesa, porém bastante passível de erro, é pela junção das pontas do DNA por NHEJ. Contudo, quando a quebra acontece no garfo de replicação na fase S ou depois da replicação na fase G2 um segundo mecanismo para o reparo da DSB é acionado, a HR. Na HR, é necessária uma sequência homóloga ao DNA e pontas da fita simples do DNA para a procura dessa sequência. Dessa forma, há uma transição entre a fosforilação da ATM e posterior ativação da ATR em sítios de quebra dupla do DNA. Assim, a proteína ATR sinaliza para a fosforilação de Chk1, que ativa o ponto de checagem na fase S e G2/M para parada no ciclo celular, e Rad51, para promover o reparo (Maréchal & Zou, 2013).

Todavia, as vias ATR-Chk1 e ATM-chk2 não são estritamente separadas uma da outra. A fosforilação de Chk1 pode ser dependente de ATM em resposta a dano induzido por radiação ionizante, bem como Chk2 dependente de ATR em resposta a irradiação UV (Eich *et al.*, 2013). A sinalização mediada por Chk1 e Chk2 pós dano induzido ou problemas na replicação do DNA está representada na Figura 1.

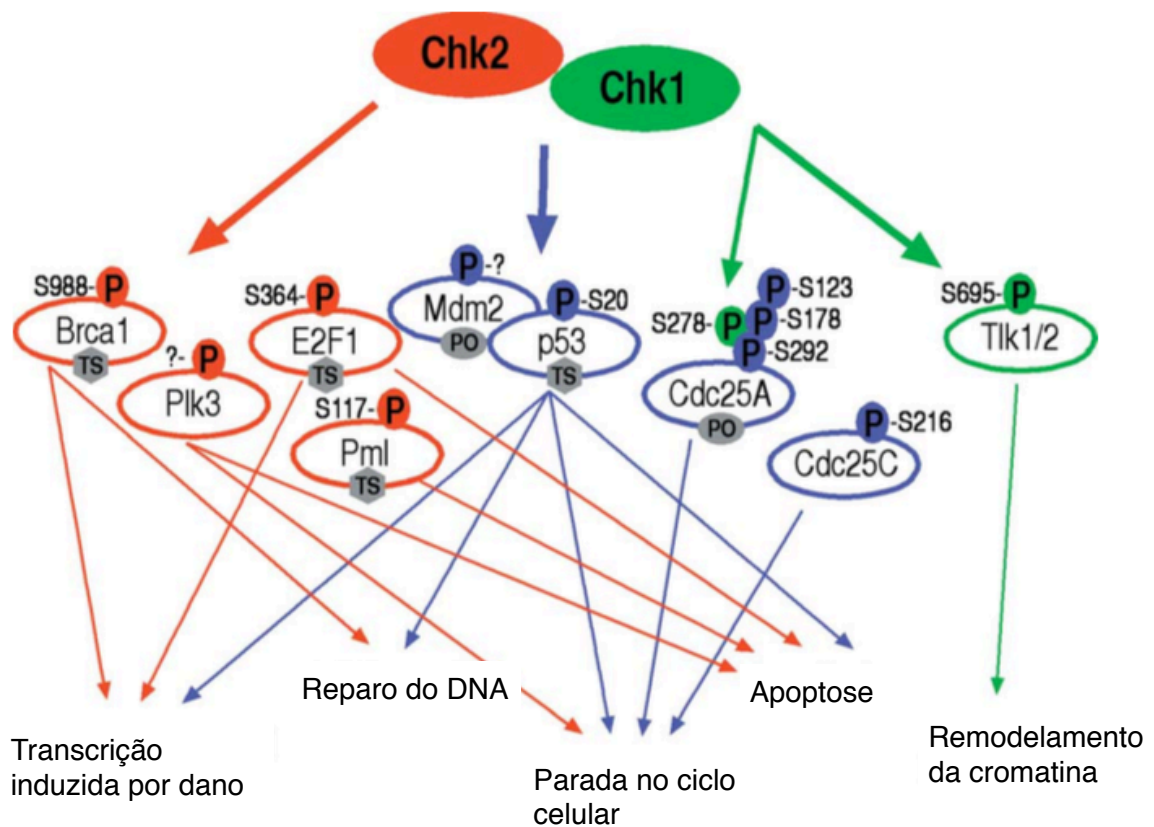


Figura 1 - Chk1 e Chk2 como mediadores da sinalização pós dano no DNA. Após sua ativação, Chk1 e Chk2 fosforilam unicamente (vermelho e verde) e em comum (azul), efetoras que propagam a sinalização de ponto de checagem. Dependendo do tipo de estresse, velocidade do dano e contexto celular, essa sinalização leva a transcrição de programas induzido por estresse (E2F1, Brca1, p53), iniciação direta ou indireta de reparo ao dano (BRCA1, p53), atraso na progressão do ciclo (Cdc25A, Cdc25C, p53, PIK3), indução de apoptose (Pml1, p53, E2F1) e remodelação da cromatina (TIK1/2). Algumas efetoras downstream são classificadas como protooncogenes (PO) ou supressoras tumorais (TS), como indicado. Adaptada de Bartek & Lukas, 2003.

Em um contexto geral, como consequência ao dano no DNA, as proteínas de ponto de checagem 1 e 2 são fosforiladas, bloqueiam a progressão do ciclo e sinalizam para o reparo do dano via cascata ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53. Contudo, diferentes níveis de danos sinalizam para diferentes desfechos celulares. Quando os níveis de dano são baixos, essas respostas são ativadas mostrando um perfil pró sobrevivência pela ativação transiente da p53 e, quando os níveis são mais severos, essas respostas sinalizam para morte pela ativação contínua da p53. Sabe-se que a complexidade desses eventos se dá pelo fato de que, pelas mesmas vias da DDR, são ativados mecanismos pró-morte, como apoptose e necrose e pro-sobrevivência, como reparo do dano, senescência e autofagia (Fig. 2) (Roos *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). Nesse contexto, limiares possuem papel bastante importante sobre a influencia da DDR dentro de cada processo celular e sobre o papel da DDR dentro da autofagia.

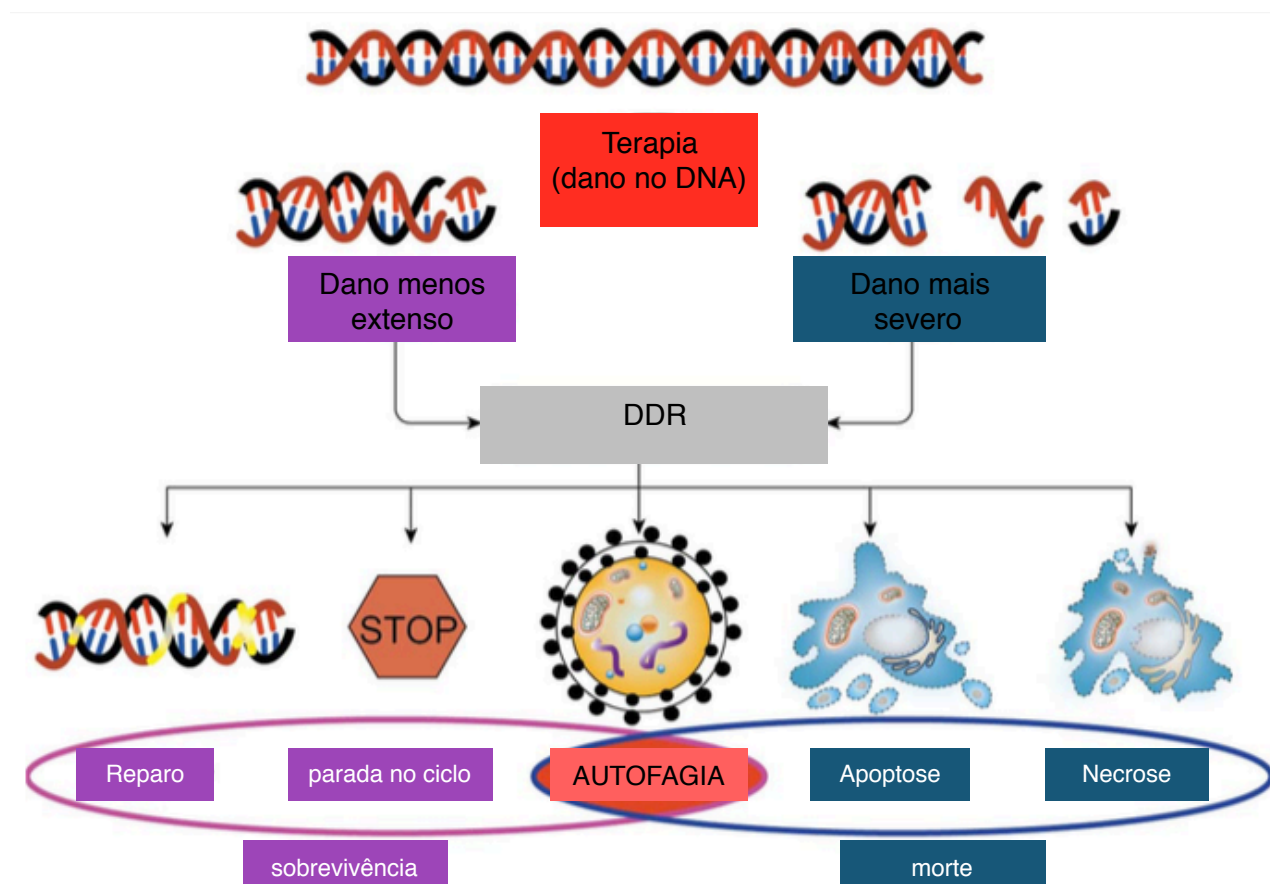


Figura 2 - Efeitos da resposta ao dano no DNA no desfecho celular. Dependendo da extensão do dano, o desfecho celular é determinado pela resposta do dano. Quando o dano é menos extenso e reparável, células recrutam vias de sinalização para promover a sobrevivência, incluindo o reparo do dano, parada no ciclo e autofagia. No entanto, quando o dano é severo e irreparável células sinalizam para morte celular como apoptose e necrose, podendo também induzir a autofagia. Nesse sentido, autofagia possui papel duplo podendo promover a sobrevivência da célula ou induzindo a morte. Adaptada de Zhang *et al.*, 2015.

Dada a importância dessas vias em manter a integridade do genoma, não é surpreendente que alterações nessas vias estejam associadas a patologias e à pré-disposição de cânceres. Assim, pacientes com ataxia-telangiectasia (AT), doença autossômica recessiva associada a mutação de ATM, além de apresentarem maior propensão ao desenvolvimento de cânceres como mama e cólon, são hipersensíveis à radiação (Haken, 2008). Na verdade, embora exista uma prevalência em mutações na ATM em pacientes com câncer, pacientes cujas funções da ATR estão comprometidas também apresentam maior riscos à instabilidade genômica e malignidades. No entanto, a presença de mutações em algumas dessas proteína cinases sugere que a capacidade de sobrevivência dessas células vai além da capacidade de ação da ATR ou ATM (Roos *et al.*, 2016).

1.1.2 Dano induzido por Temozolomida

Temozolomida (TMZ) é um antineoplásico, quimicamente classificado como uma imidazotetrazinona, usado como tratamento de primeira linha em pacientes com Glioblastoma (Filippi-Chiela *et al.*, 2013). Dentre os adutos gerados por TMZ no DNA, as metilações na posição O⁶ nos resíduos de guanina (O⁶-MeG), embora menos frequentes (aproximadamente 8%), são as mais citotóxicas e mutagênicas (Tisdale, 1987; Eich *et al.*, 2013).

Uma vez que não reparado pelo sistema de reparo BER, como nas metilações geradas nos átomos de nitrogênio (N⁷ dos resíduos de guanina, N¹ e N³ da adenina e N³ da citosina), o mal pareamento de O⁶-MeG é reconhecido pelas proteínas do sistema de reparo MMR (Mojas *et al.*, 2007). Assim, ciclos fúteis de excisão e reinserção, nas posições danificadas, resultam em quebras persistentes do DNA causadas por lesões secundárias que bloqueiam a replicação no segundo ciclo celular, produzindo DSBs. Dessa forma, há uma transição entre a ativação da proteína cinase ATR na forquilha de replicação e ATM diante a formação de DSBs (Eich *et al.*, 2013).

Por fim, é importante destacar que ATR e ATM encontram-se ativas nas células em situações de estresse oncogênico. Assim, essa via contribui para as células poderem sobreviver em condições de instabilidade genômica. Por isso, o desenvolvimento de inibidores específicos para componentes dessa via se mostram bastante promissores, podendo aumentar a sensibilidade de células tumorais à terapia (Maréchal & Zou, 2013).

1.2 Autofagia

Autofagia (do Grego, “autodigestão”) é um processo de degradação e reciclagem de componentes celulares pela via lisossomal, altamente conservado entre os eucariotos. Esse mecanismo, pode ser considerado uma estratégia de adaptação, uma vez que a célula passa a degradar seu próprio conteúdo para se manter viva, pode ser ativado em diferentes situações de estresse, como privação de nutrientes, estresse oxidativo e injúria ao DNA (Filippi-Chiela *et al.*, 2013).

A ativação da autofagia como estratégia de sobrevivência celular é melhor caracterizada na ausência de nutrientes, onde membranas lipídicas e proteínas degradadas geram energia suficiente para que a célula mantenha um balanço energético (Levine & Yuan, 2005). Em condições fisiológicas, a autofagia acontece em níveis basais. Em outras situações, possui papel fundamental, como no período intra-parto, em que o aporte de nutrientes via placenta é momentaneamente interrompido, até que seja reestabelecido através do aleitamento, bem como em situações diárias de privação de nutriente, fornecendo energia através do catabolismo, assim mantendo as funções metabólicas da célula (Kuma *et al.*, 2004).

No entanto, a autofagia tem papel duplo na citoproteção ou toxicidade. Em níveis basais, presente como um mecanismo de sobrevivência, a autofagia promove o balanço energético da célula. Quando insuficiente ou acima do limiar, pode levar à morte celular (Nishida *et al.*, 2008).

Em células de mamíferos existem 3 tipos de autofagia: Microautofagia, Autofagia mediada por chaperonas (CMA) e Macroautofagia. As três, ainda que morfologicamente distintas, resultam na degradação e reciclagem do conteúdo via lisossomal (Fig.3).

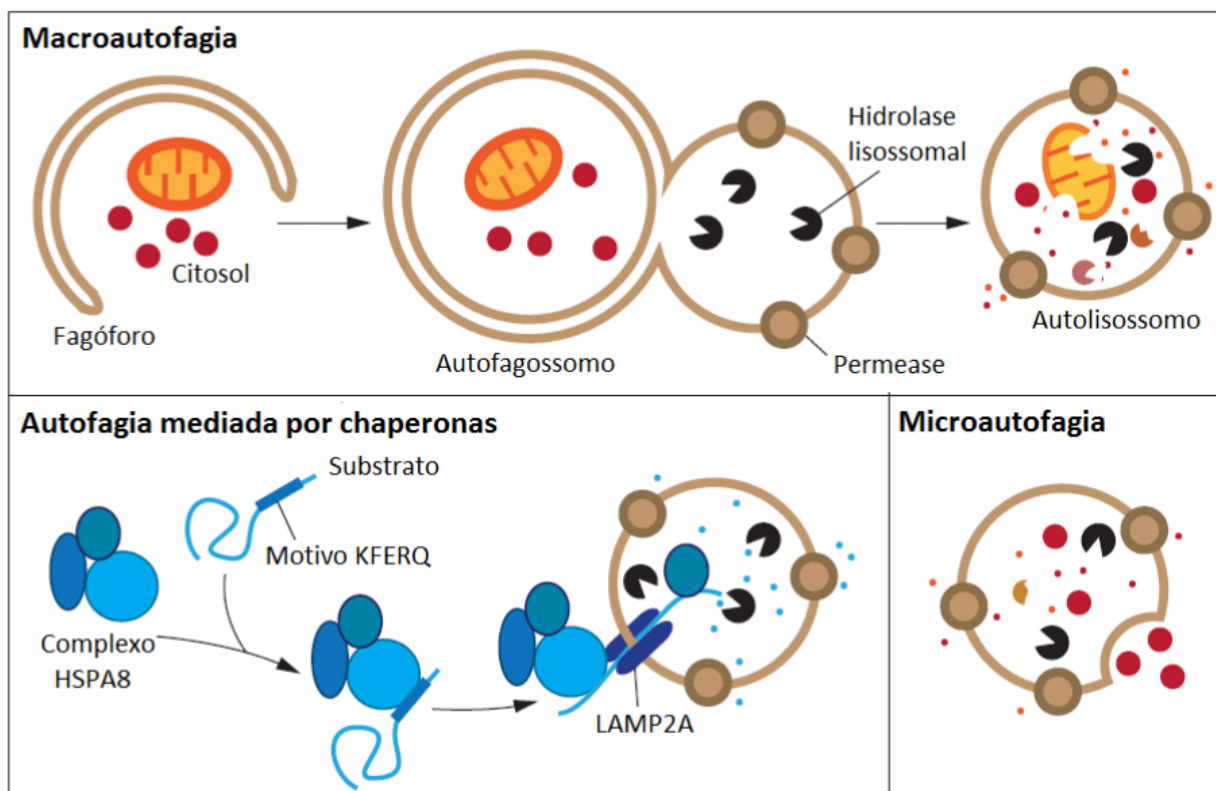


Figura 3 - Três tipos de autofagia. Macroautofagia depende da formação de uma vesícula de dupla membrana que isola o conteúdo a ser degradado. Autofagia mediada por chaperonas onde ocorre o transporte de proteínas individuais diretamente através da membrana do lisossomo. Microautofagia envolve a captação direta do conteúdo através da invaginação da membrana. Adaptada de (Parzych & Klionsky, 2014)

1.2.1 Tipos de Autofagia

1.2.1.1 Microautofagia

A Microautofagia ocorre pela invaginação e deformação da membrana do lisossomo onde o conteúdo a ser degradado entra no lisossomo através dessas protrusões (Parzych & Klionsky, 2014). Esse processo pode acontecer de forma seletiva pela degradação de mitocôndrias (micromitofagia), material nuclear (micronucleofagia) e peroxissomos (micropexofagia) ou de forma não seletiva, com a degradação de porções aleatórias do citoplasma e organelas. A microautofagia é pouco descrita devido à limitação de ferramentas de análise e sabe-se pouco sobre seu mecanismo, regulação e significância fisiológica (Mijaljica *et al.*, 2014).

1.2.1.2 Autofagia mediada por chaperonas

Na Autofagia Mediada por Chaperonas (CMA), onde são degradados substratos como fatores de transcrição, enzimas glicolíticas, subunidades do proteossoma e proteínas envolvidas no tráfego de vesículas, proteínas a serem degradadas são desdobradas pela ação de chaperonas citosólicas e diretamente translocadas do citoplasma para o lisossomo, sem o uso de qualquer estrutura membranosa (Parzych & Klionsky, 2014).

Para que um substrato (proteína) sofra CMA, uma vez que é um processo altamente específico, é necessary que este tenha um motivo pentapeptídeo KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln). Esse motivo é reconhecido por um complexo, cujo principal componente é a proteína de choque térmico 8 (HSPA8/HSC70), que transporta o substrato até a membrana do lisossomo e se liga a monômeros do receptor da proteína associada à membrana do lisossomo 2A (LAMP2A), formando um complexo translocador pela ligação substrato-receptor (Parzych & Klionsky, 2014).

1.2.1.3 Macroautofagia

Em contraste com a microautofagia e CMA, na macroautofagia (a partir daqui referida apenas como Autofagia), o cargo é isolado fora do lisossomo. Nesse processo há a formação de uma vesícula de membrana dupla denominada autofagossomo, onde o conteúdo é englobado para posteriormente ser degradado no autolisossomo (Yang & Klionsky, 2010).

1.2.2 Progressão Morfológica e Maquinaria

A autofagia é um processo dinâmico, cuja característica morfológica que o diferencia dos demais baseia-se na formação de uma vesícula de membrana dupla, denominada autofagossomo. Esse processo pode ser dividido em 5 etapas principais: (1) Início e nucleação do isolamento da membrana; (2) expansão da membrana dupla para formação do autofagossomo; (3) fechamento do autofagossomo; (4) fusão do lisossomo para formar o autolisossomo, onde ocorre

a última etapa e (5) degradação do conteúdo celular (Goldsmith *et al.*, 2014) (Fig. 4).

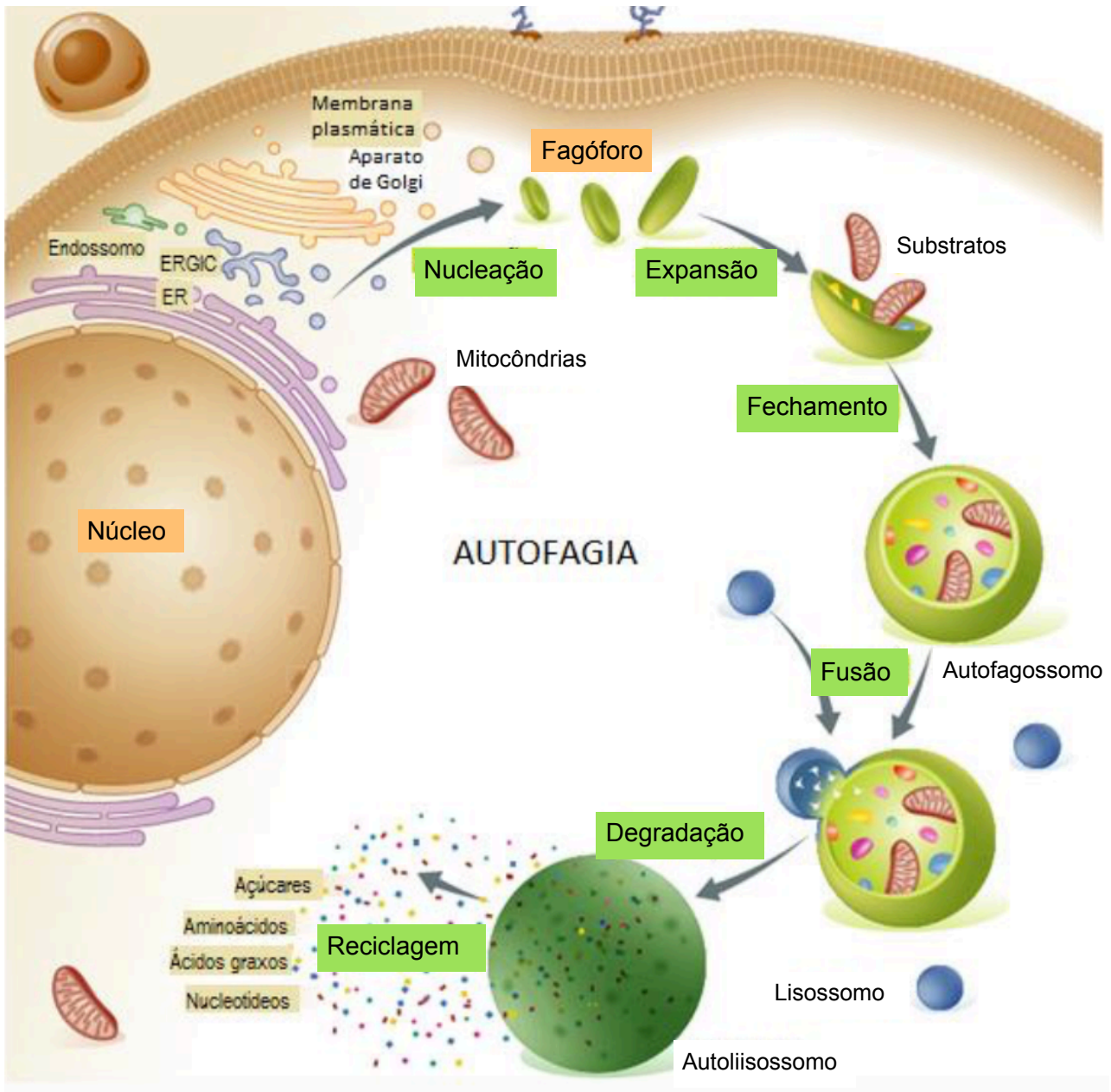


Figure 4 - Organização geral do processo da Autofagia. Autofagia se inicia pela formação de uma estrutura de membrana dupla chamada fagóforo (ou membranas de isolamento) onde o material do citoplasma é capturado para futura degradação. Com o fechamento do fagóforo, essa estrutura passa a ser chamada de autofagossomo que se funde ao lisossomo onde com a ação de hidrolases lisossomais permite que esse material seja degradado e os produtos transportados para o citosol para serem reutilizados. Adaptado de (Galluzzi *et al.*, 2015).

O estudo molecular da autofagia foi baseado na descoberta de genes relacionados a autofagia (Atg) em leveduras e posteriormente em eucariotos superiores. Dentre as proteínas ATG que participam da maquinaria molecular central da autofagia, pode-se dividir em 4 subgrupos: o complexo ULK, dois sistemas de conjugação, o complexo PI3K e as proteínas transmembrana. O sítio onde ocorre a formação do autofagossomo e o recrutamento da maioria das proteínas ATG, é o sítio de montagem do fagóforo (PAS; *Phagophore Assembly Site*) (Yang & Klionsky, 2010).

Em mamíferos, o início do processo da autofagia para a formação do autofagossomo requer a presença do complexo ULK (ULK1/2), formado pela proteína cinase ULK (Atg1) associada a ATG13, FIP200 e ATG101. A fosforilação de FIP200, bem como ATG13, sinaliza a iniciação e ativa o segundo complexo (complexo PI3K) que requer atividade da proteína VPS34 (uma PI3K classe III) e é essencial para a nucleação do fagóforo. VPS34 forma um complexo com Beclina 1 (Atg6), VPS15, ATG14L e é crucial para a geração de fosfatidilinositol 3-fosfato, permitindo o recrutamento de outras proteínas ATG (Goldsmith *et al.*, 2014).

Já na fase de expansão participam dois sistemas de conjugação '*ubiquitin-like*', no primeiro, ATG7 e ATG10 catalisam a conjugação de ATG12 a ATG5. Esse complexo se liga a ATG16L1 formando um complexo multimérico que permite a expansão do fagóforo, ATG16L. O segundo envolve a clivagem da molécula LC3 (Atg8) pela ATG4, gerando a forma I da proteína LC3, que dirige o fechamento do fagóforo para formação do autofagossomo. Por fim, LC3 é conjugada ao lipídeo de membrana fosfatidiletanolamina (PE) via ATG7 e ATG3, formando a LC3-II, a qual é subsequentemente recrutada para o lado interno e externo da membrana do autofagossomo (Goldsmith *et al.*, 2014). A proteína LC3 é mediadora na seleção do conteúdo para degradação por autofagia e bastante usada para monitorar atividade autofágica (Thomé *et al.*, 2016). A LC3 também interage diretamente com a SQSTM1, que marca os componentes que devem ser destinados à degradação.

Uma vez que esse processo foi concluído e o autofagossomo formado, há a fusão do autofagossomo com o lisossomo, formando a estrutura final, o autolisossomo (Fig.5).

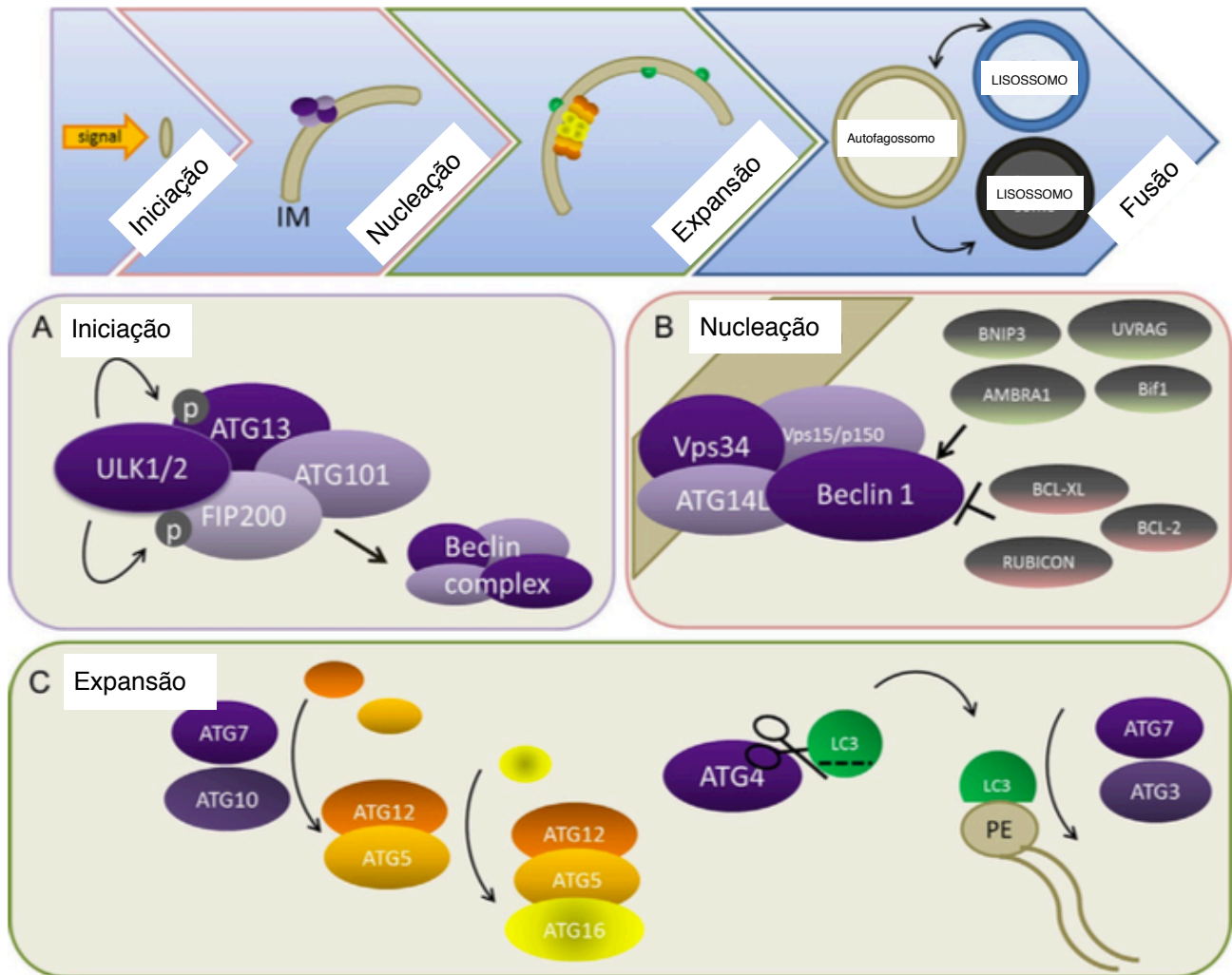


Figura 5 - Modelo da maquinaria da autofagia nos diferentes estágios do processo. A autofagia pode ser dividida em 4 etapas principais: (1) iniciação; (2) nucleação; (3) expansão; e (4) fusão. (A) A iniciação é mediada pelo complexo ULK. A ativação de ULK leva a fosforilação de FIP200 e ATG13 iniciando a nucleação via interação com complexo de Beclina 1. (B) O complexo Beclina 1/VPS34/Atg14L/VPS15 interage com proteínas reguladoras resultando na nucleação do fagóforo. (C) O processo de expansão acontece na presença de dois sistemas de conjugação 'ubiquitin-like' que forma o complexo ATG12-ATG5/ATG16 e conjugação de LC3 à PE. Adaptada de (Goldsmith *et al.*, 2014).

1.2.3 Autofagia e Câncer

O papel da autofagia durante a transformação dos cânceres é duplo e estágio-dependente. O processo pode tanto suprimir o crescimento tumoral quanto promover a progressão do tumor (Lorin *et al.*, 2013). A autofagia quando desregulada está relacionada a diversos tipos de patologias humanas. De fato, a deleção de Atgs em ratos revelou que alterações nesse processo podem desencadear, ou estão ligadas, a doenças neurodegenerativas, autoimunes e cânceres como mama, próstata, melanoma e glioma (Jiang & Mizushima, 2014).

Em condições fisiológicas, a autofagia, que é ativada em diferentes situações de estresse, pode suprimir a transformação maligna por diferentes mecanismos. As primeiras evidências do papel da autofagia como supressora tumoral foram descobertas em casos de câncer esporádico de próstata, mama e ovário, onde em 40-75% dos casos um alelo de Beclina 1 estava deletado. Além da Beclina 1, outras proteínas também foram relacionadas a supressão tumoral, tais como ATG 5, ATG7 e ATG4 (Goldsmith, 2014).

A autofagia também previne o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela eliminação de organelas disfuncionais. O aumento de ERO pode ser ocasionado pelo acúmulo da SQSTM1, proteína associada à autofagia e degradada ao final no processo (Galluzzi *et al.*, 2015). De fato, a SQSTM1 possui papel bastante importante na supressão tumoral. Quando acumulada, ativa o fator regulatório nuclear (Nrf2) e o fator de transcrição kappa B (NF-kB), que estimulam respostas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas. Em casos onde o suporte energético sustentado por esse processo, gera uma adaptação das células ao estresse metabólico e hipóxia, a autofagia inibe a progressão tumoral, pela inibição da necrose em um processo inicial. (Goldsmith, 2014).

Por outro lado, em condições de progressão tumoral já existente e mais tardia, a autofagia possui papel citoprotetor, disponibilizando os substratos energéticos para células em estresse metabólico ou hipóxia (Lorin *et al.*, 2013).

Na verdade, células da parte interior do tumor exibem altos níveis de autofagia se comparados com a margem. Outro papel da autofagia na progressão do tumoral é pelo favorecimento da transição epitélio-mesenquima e metástase, principal causa de morte em câncer. O desprendimento das células tumorais do estroma tumoral induz a autofagia, evitando *anoikis* (morte celular induzida pelo desprendimento da célula da matriz extracelular) e permitindo o estabelecimento de metástases (Chen & Debnath, 2010).

Tumores deficientes em autofagia são, na grande maioria, mais sensíveis a diversos quimioterápicos e a radiação, por isso, diversos testes clínicos utilizam terapias moduladoras de autofagia. A inibição farmacológica desse processo com Cloroquina (inibidor da fase final), Bafilomicina A1 (inibidor da fase final) e 3 metiladenina (inibidor da fase inicial) impede a geração dos produtos benéficos resultantes desse processo (Chen & Debnath, 2010). Nesse contexto, o efeito dessa inibição em combinação com quimioterápicos impede o crescimento exacerbado dessas células malignas em transformação.

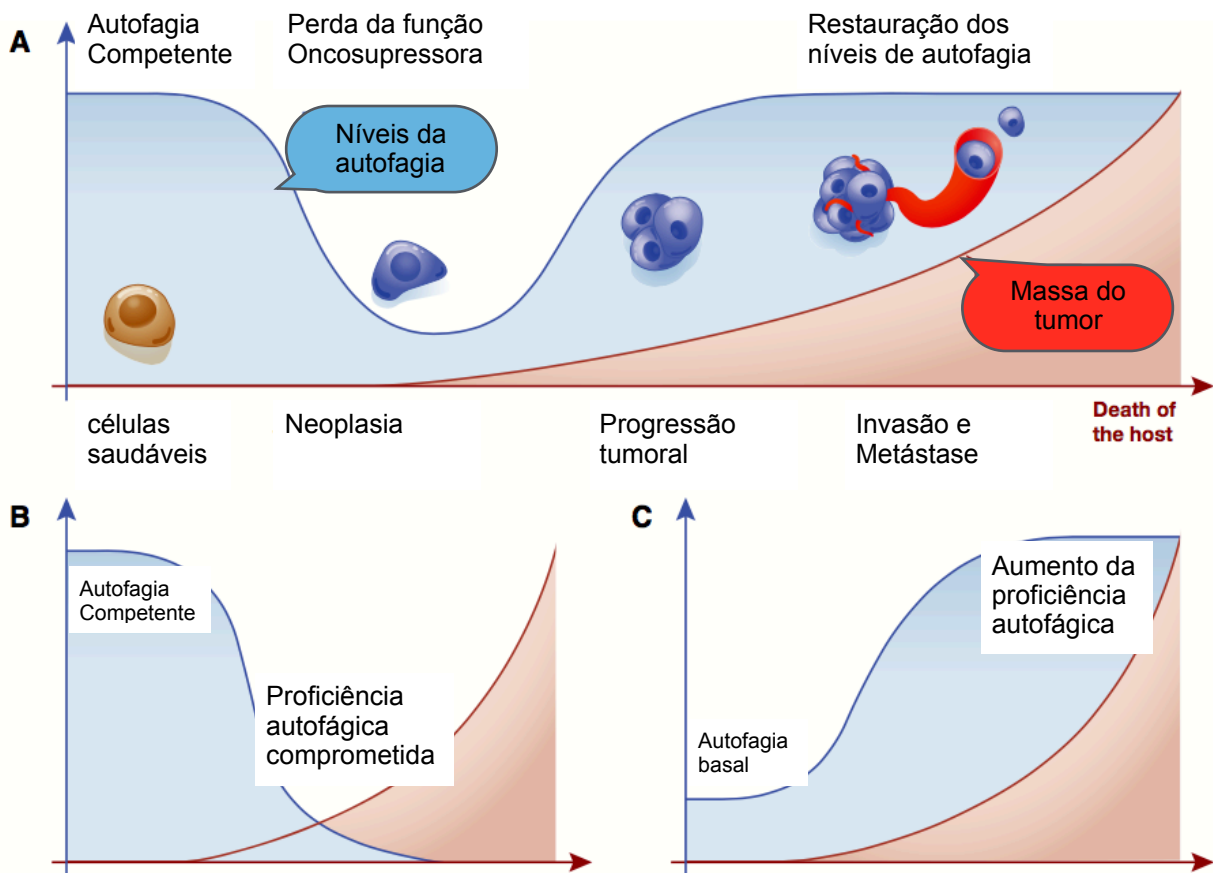


Figure 6 - Autofagia na progressão tumoral. (A) Células saudáveis parecem ser poupadas de transformação maligna quando os níveis de autofagia são normais. Em contraste, autofagia promove progressão tumoral e resistência a quimioterapia. A transição de uma célula saudável para uma metastática e resistente pode envolver a queda dos níveis de autofagia. O mecanismo de restauração dos níveis ainda são pouco conhecidos. (B,C) Oncogênese e progressão tumoral pode depender da perda permanente (B) ou ganho (C) dos níveis da autofagia

1.2.4 Autofagia e DDR

Sabe-se que no processo de resposta ao dano no DNA há o recrutamento das cinases ATR e ATM e consequente ativação de Chk1, Chk2 e p53. A proteína supressora tumoral p53 é acumulada nas células em resposta ao dano no DNA bem como pela ativação de oncogenes. Em condições de estresse genotóxico a ativação de p53 pode induzir a autofagia, podendo tanto contribuir como prevenir a morte celular (Yang & Klionsky, 2010).

A p53 pode induzir o processo da autofagia de duas maneiras: Quando a sua sub-localização é nuclear, como um fator de transcrição, a p53 participa da autofagia via indução de transcrição de genes pró-autofágicos como *DRAM*, *ULK1/2* e *SESTRIN1/2*. Os alvos *DRAM* e *ULK1/2* podem regular esse processo diretamente pela interação com Atg13 e FIP200 ou indiretamente via *SESTRIN 1* e *2*, que ativam AMPK, que leva a inativação de mTOR e consequente disparo da autofagia (Vessoni & Filippi-Chiela *et al.*, 2013). Em contraste, quando sua sub-localização é citoplasmática, a p53 possui um efeito negativo na regulação da autofagia sendo assim capaz de reprimir esse processo. Contudo, a deleção ou inibição farmacológica da p53 citoplasmática pode induzir a autofagia podendo favorecer as células que estão sobre condição de hipóxia e depleção de nutrientes. O processo que liga a DDR a autofagia, não é sempre dependente de p53. ATM também pode disparar esse processo pela ativação da cinase LKB1, que ativa AMPK de maneira independente à p53 e pela fosforilação da p63 que modula indiretamente a expressão dos níveis de algumas ATGs e Beclina 1 (Wu *et al.*, 2012; Eliopoulos *et al.*, 2016)

Por fim, dado o papel duplo que a autofagia apresenta na contribuição para sobrevivência ou para morte celular, é importante destacar que a inibição farmacológica desse processo em células tratadas com indutores de dano levam a um aumento da morte celular (Vessoni & Filippi-Chiela *et al.*, 2013).

1.3 Senescência

Senescência celular, processo primeiramente descrito por por *Hayflick & Moorhead* em 1961, é caracterizada pela parada irreversível da proliferação celular. Essa parada é acompanhada de mudanças na estrutura celular, organização da cromatina e expressão de genes (Vargas *et al.*, 2012). Décadas atrás, soube-se que o fenômeno observado pelos autores e descrito como 'processo de proliferação limitada' reflete o tipo de senescência desencadeada pela perda dos telômeros pós extensa proliferação, hoje denominada senescência replicativa (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Nesse contexto, a senescência é disparada para manter o balanço entre a divisão e a morte celular, e possui papel fundamental no envelhecimento celular e supressão tumoral, agindo como uma barreira contra a imortalização celular (Vargas *et al.*, 2012).

A senescência pode, também, ser induzida em resposta a estresses intracelulares e extracelulares. Dessa forma, previne que quaisquer que sejam os danos passem para a próxima geração de células. Entre os diferentes tipos de estresse que desencadeiam esse processo, estão: deterioração mitocondrial, estresse oxidativo, dano extenso ou irreparável no DNA e expressão de alguns oncogenes. No entanto, assim como a autofagia, a senescência também possui papel duplo, podendo facilitar a tumorigênese (Coppé *et al.*, 2010; Rodier & Campisi, 2011).

Células senescentes, mesmo que não proliferativas, são metabolicamente ativas. Essas células, possuem habilidade de secretar citocinas, fatores de crescimento e proteases, favorecendo a transformação de células vizinhas e alterando o microambiente a favor da tumorigênese, através do Fenótipo Secretório Associado à Senescência (SASP). Entre os diversos componentes que fazem parte do SASP, estão presentes alguns fatores inflamatórios, como as IL-1 e IL-6 bem como fatores de crescimento como VEGF e EGF (Ghosh & Capell, 2016; Coppé *et al.*, 2010).

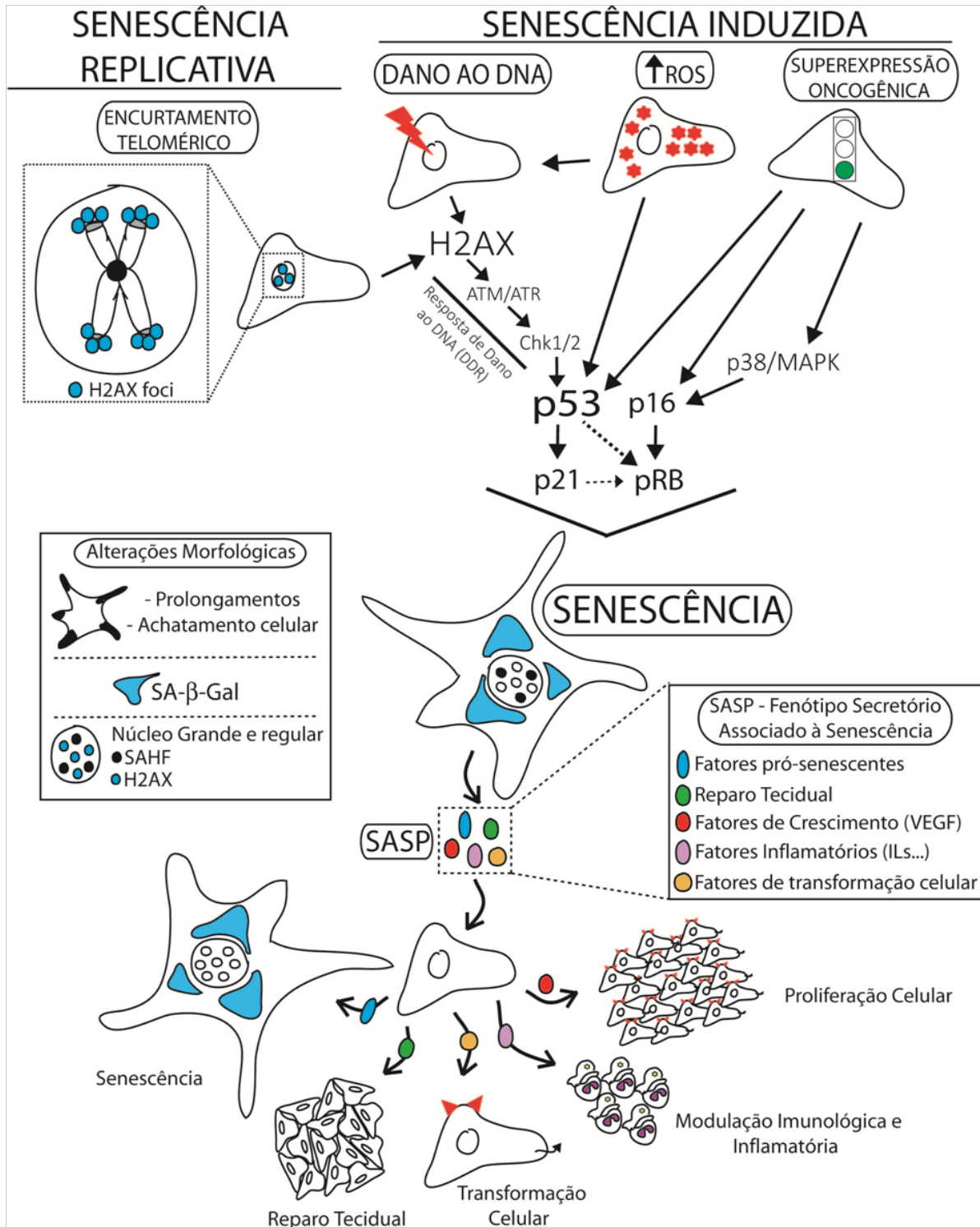


Figura 7- Mecanismos da senescência. A senescência, que é morfologicamente caracterizada pelo achatamento celular bem como pelo aumento do tamanho do núcleo, pode ser induzida por dano no DNA, espécies reativas de oxigênio e superexpressão oncogênica. Uma vez que induzida, sinaliza para a ativação de vias para a parada irreversível da proliferação celular e possui habilidade de secretar citocinas, fatores de crescimento e proteases, favorecendo a transformação de células vizinhas e alterando o microambiente a favor da tumorigênese, através do Fenótipo Secretório Associado à Senescência (SASP).

É importante destacar que células senescentes se diferenciam de células não proliferativas, por diferentes marcadores e mudanças morfológicas. As alterações morfológicas que marcam células senescentes são principalmente o achatamento celular e núcleo grande e regular. Células não proliferativas, denominadas quiescentes, podem retomar seu estado proliferativo como resposta a sinais. Portanto, células quiescentes são células em um estado de parada proliferativa reversível, cuja parada na proliferação (efeito citostático) tem papel citoprotetor, com objetivo central de possibilitar que a célula realize a reparação do DNA e conseqüentemente, o processo de divisão celular possa prosseguir (Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Campisi & Fagagna, 2007).

1.3.1 Mecanismos moleculares na Senescência

Os estímulos que podem induzir a senescência são bastante variados. Todavia, a sinalização como resposta a esses estímulos é comum entre a maioria dos tipos de senescência e envolve proteínas mediadoras e efetoras, que regulam o ciclo celular e são envolvidas na progressão tumoral (Collado & Serrano, 2006; Vargas *et al.*, 2012).

Em células proliferativas, a presença de dano no DNA, acúmulo de ERO e encurtamento dos telômeros sinalizam uma resposta via DDR, envolvendo principalmente a proteína supressora tumoral p53 e a modulação de vias de proliferação e morte celular via Akt e p38MAPK. A p53 possui papel bastante importante na inibição da atividade de complexos de ciclina-CDK. Uma vez ativa, a p53 inibe a atividade de CDKs via p21, p16, p15 e p27. Essa inibição resulta na parada da proliferação celular. É importante destacar que todos os complexos ciclina-CDK são dependentes do ciclo celular e modulam a proteína Retinoblastoma (Rb), que leva a ativação do ponto de checagem e conseqüente parada no ciclo. No entanto, a supressão desses complexos por diferentes fatores de transcrição é coerente com o fato de que a senescência também pode ser induzida independentemente da fase do ciclo celular (Collado & Serrano, 2006; Vargas *et al.*, 2012). A Figura 7 resume os processos de indução da senescência, alterações morfológicas, participação dos componentes do SASP e conseqüências desse processo.

1.3.2 Tipos de Senescência

A senescência celular pode ser dividida em dois grupos: senescência replicativa e senescência induzida. A **tabela 1** resume os diferentes tipos de senescência.

Tabela 1. Diferentes tipos de Senescência

Tipo de Senescencia	Abreviação	Mecanismo
Senescência Replicativa (<i>Replicative senescence</i>)	RS	Senescência dependente do encurtamento dos telômeros
Senescência Prematura induzida por estresse (<i>Stress-induced premature senescence</i>)	SIPS	Senescencia induzida por dano ao DNA. Estresse oxidativo e até mesmo condições de cultura.
Senescência induzida por Oncogenes (<i>Oncogene-induced senescence</i>)	OIS	Senescencia induzida por oncogenes como: Ras, cMYC ou BRaf. Envolve vias de sinalização como p38MAPK e vias de resposta ao dano.
Senescência induzida pela perda de PTEN (<i>PTEN loss-induced cellular senescence</i>)	PICS	Divide características com a OIS, mas pode também ser induzida por mecanismos que não envolvem DDR ou p53.

1.3.2.1 Senescência Replicativa

Células eucariotas somáticas apresentam um limite do número de divisões. Esse limite da capacidade replicativa é associado ao encurtamento dos telômeros causado por sucessivas divisões celulares (Muñoz-Espín and Serrano, 2014). Os telômeros funcionam como relógios moleculares que recordam o histórico de replicação. São sequências (entre 1500 e 2000 em células germinativas) não codificantes nas extremidades dos cromossomos e são encurtados a cada divisão celular pela ineficiência da maquinaria de replicação do DNA de reproduzir plenamente uma cadeia atrasada durante a síntese do DNA (Shay *et al.*, 2007).

Molecularmente, a indução da senescência pela perda dos telômeros é “sentida” pelas células como um tipo de dano ao DNA, ativando vias da DDR. Essa sinalização, é caracterizada pela ativação dos mediadores da DDR ATR/ATM- Chk1/Chk2 e fosforilação da histona H2AX (γ H2AX), que sinalizam para a fosforilação e ativam diferentes proteínas, tais como p53 e proteínas de controle

do ciclo celular. A p53 sinaliza para a expressão da p21, que se liga e inibe complexos de ciclina-CDK, impedindo a progressão do ciclo celular. Dessa forma, induz a parada irreversível da proliferação celular via senescência replicativa (Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Lawless *et al.*, 2010)

1.3.2.2 Senescencia Induzida

A parada irreversível na proliferação não é restrita à senescência replicativa. Esse mecanismo também pode ser disparado de forma prematura, antes mesmo do estágio em que é induzido pelo encurtamento dos telômeros. Esta, é dividida em 3 grupos: SIPS, OIS e PICS.

Senescência induzida por estresse (SIPS): Dentro do grupo de SIPS que também pode ser resultante de condições de cultura inadequadas, destacam-se dois diferentes tipos de indução prematura: a indução mediada por ERO e a indução como resposta ao dano no DNA (Kuilman *et al.*, 2010).

A relação do papel do estresse oxidativo e da senescência foi primeiramente estabelecida pelo uso de antioxidantes como tratamento. Estes, podem interferir nesse processo de maneira relevante, atrasando ou até mesmo prevenindo a senescência (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Sabe-se que há um aumento de ERO como consequência aos diferentes tipos de estresse, tais como quimioterápicos, perdas das funções desempenhadas pelos telômeros, dano ao DNA e ativação de oncogenes. Nesse contexto, a indução da senescência também é mediada pela indução do dano ao DNA, com contribuição da p21. Contudo, essa ativação é mediada via p38 MAPK, que controla a ativação da p16 bem como a p53 e, conseqüentemente, a expressão da p21. Ainda, a ativação de p53 pode ocorrer por modulação de outras vias reguladoras da senescência (Kuilman *et al.*, 2010).

Assim como na senescência replicativa, a senescência induzida por dano ao DNA também é dependente de p53. A sinalização disparada por diferentes agentes indutores, principalmente aqueles que induzem a quebra dupla da fita,

envolve principalmente o eixo ATM-p53-p21 da via da DDR (Childs *et al.*, 2016). De fato, p53 tem papel central na decisão do desfecho celular a partir de dano ao DNA, afetando diretamente a duração da parada no ciclo celular e a entrada ou não em senescência celular. Além destes, há também a sinalização para a ativação da p16, a qual inibe o complexo ciclina-CDK de fase G1 e, conseqüentemente, a fosforilação da proteína Rb. Dessa forma, a via p16-pRb serve como uma segunda barreira na prevenção do crescimento dessas células que estão danificadas (Campisi & Fagagna, 2007; Hirose *et al.*, 2001).

Senescência induzida por oncogenes (OIS): Esse fenômeno foi primeiramente observado quando o oncogene RAS estava expresso em fibroblastos humanos e é caracterizado pela indução de senescência através da superexpressão oncogênica. Essa característica não é exclusiva de RAS. Outros membros da via de sinalização de RAS (RAF, MEK, MOS e BRAF), também possuem capacidade de induzir a senescência quando superexpressas ou expressas de forma oncogênica (Campisi & Fagagna, 2007). Parece bastante surpreendente o fato de que OIS desempenha uma função de supressão tumoral, uma vez que esses são genes que promovem a proliferação celular. No entanto, a superexpressão oncogênica induz a sinalização da DDR, justamente como consequência ao estresse gerado pela replicação aberrante do DNA e ROS (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). OIS ocorre durante o estágio inicial do desenvolvimento do câncer, é restrito às células oncogênicas estressadas e mantém o tumor num estado pré-maligno não agressivo (Collado & Serrano, 2006).

Senescência induzida pela perda de PTEN (PICS): A perda de PTEN, gene supressor tumoral, leva a um aumento de PIP3 e conseqüente ativação de Akt e outras proteínas. PICS difere-se de OIS basicamente pelo fato de ocorrer mesmo na presença de inibidores de ATM ou bloqueadores da fase S do ciclo celular e, portanto, não envolve a via da DDR (Vargas *et al.*, 2012).

1.3.3 Senescência e Câncer

A senescência além de ser um mecanismo normal do desenvolvimento também está associada a diversos processos patológicos incluindo câncer. O efeito da senescência em diferentes patologias pode ser benéfico, como no caso da maioria das fibroses, aterosclerose e hipertensão pulmonar, porém, pode também apresentar um perfil prejudicial, como descrito em casos de fibrose pulmonar, diabetes do tipo II, sarcopenia, entre outros (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

No câncer, os efeitos da senescência são considerados benéficos em um contexto geral, uma vez que a célula tumor é induzida a parar irreversivelmente sua proliferação; entretanto, é importante destacar que a senescência, quando induzida, participa de 4 diferentes processos: Supressão tumoral, progressão tumoral, reparo tecidual e envelhecimento. Como descrito anteriormente, o aumento de células senescentes no estágio inicial do desenvolvimento do câncer mantém as células num estado pré-maligno não agressivo, estabelecendo uma função de supressão tumoral (Collado & Serrano, 2006). Células que senescem pós indução de dano podem ser removidas por células do sistema imune, parte pelo reconhecimento direto de células senescentes por células T helper, mas também pelo recrutamento de células fagocíticas inflamatórias atraídas pelos fatores do SASP. Entretanto, a senescência disparada por indutores de dano ao DNA em um regime de quimioterapia cíclico, pode também promover a doença pelos componentes do próprio SASP, que inclui fatores de crescimento, fatores indutores da transformação celular, moderadores do sistema imunológico no sentido de suprimir as defesas anti-tumorais, entre outros (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Por fim, esse papel da senescência em suprimir o avanço de celular pré-malignas levou a idéia de que terapias pró-senescentes poderiam ser uma alternativa ou até mesmo um complemento a alguns tratamentos anti-câncer. De fato, embora não sejam consideradas terapias que induzem diretamente a senescência, compostos considerados “pró-senescentes”, como inibidores de

CDKs e ativadores da p53 já mostraram resultados bastante promissores (Acosta & Gil, 2014).

2 Objetivo

2.1 Geral:

Avaliar a participação da proteína ATR na autofagia e senescência em células de Glioblastoma em resposta a Temozolomida.

2.2 Específicos:

Avaliar, em células de glioblastoma U87-WT tratadas com inibidor farmacológico de ATR e células U87 silenciadas para a proteína ATR (shATR):

- O perfil do ciclo celular;
- A indução de autofagia e fluxo autofágico;
- A indução de Senescência e alterações na morfologia nuclear.

3 Artigo Científico

Nesse capítulo será apresentado o artigo científico resultante do trabalho “Evaluation of the role of ATR protein in the induction of autophagy and senescence by Temozolomide in Glioblastoma cells” desenvolvido durante o período do mestrado. Esse artigo será submetido ao periódico “Plos One” e a discussão será feita com base nas figuras aqui apresentadas.

Evaluation of the role of ATR protein in the induction of autophagy and senescence by Temozolomide in Glioblastoma cells

Alexandra Souza Vigna¹; Eduardo Cremonese Filippi- Chiela²; Giovana Ravizzoni Onzi¹; Marcos Paulo Thomé¹; Michele de Souza Lima¹; Guido Lenz^{1,3,*}

¹Biophysics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Medicine, UFRGS

³Biotechnology Centre (CBiot), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*Corresponding author E-mail: lenz@ufrgs.br

Department of Biophysics, Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43431- Lab. 115

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

Autophagy is a catabolic process whereby dysfunctional proteins and organelles are engulfed and targeted to lysosomes for degradation and recycled back to the cell while Senescence is the process by which cells stop dividing and enter a state of growth arrest. Both processes, autophagy and senescence, can be induced by DNA damage including Temozolomide (TMZ), an alkylating agent, used as the therapy of choice in glioblastoma that drives DNA damage. Lesions produced by TMZ activate the DNA damage response (DDR), which can induce both autophagy and senescence besides cell death. Given the importance of these mechanisms in cell therapy and resistance, this work aims to evaluate the role of Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) kinase, a key regulator of the DDR on the response of glioblastoma cells to TMZ, focusing on the mechanisms of autophagy and senescence. More specifically, we aim to analyse whether the ATR signalling plays a role in the activation of both autophagy and senescence in response to TMZ as well as to evaluate whether the cell cycle distribution or cellular growth is altered in the absence of the ATR kinase. We inhibited ATR both pharmacologically (using VE-821) and genetically by stable gene knockdown using lentiviral vectors in U87 glioblastoma cells. Wild type cells treated with VE-821 in combination with TMZ did not alter the autophagic or senescence status in comparison with the cells treated with TMZ alone. Similarly, the knockDown of ATR also did not alter these mechanisms. However, we found an accumulation of the SQSTM1/p62 protein, a selective autophagy substrate, in both ATR shRNA cells and VE-821 treated cells. In conclusion, ATR doesn't seem to play a direct role in the Autophagy and Senescence induced by TMZ.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive tumor of the Central Nervous System and is usually treated by surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with Temozolomide (TMZ). TMZ is an imidazotetrazin-class alkylating agent whose cytotoxicity leads to the formation of O⁶-methylguanine (O⁶MeG) in DNA which mismatches with thymine during replication (1). These events trigger futile cycles of the mismatch repair system, resulting in DNA double strand breaks (DSBs) that are produced from the lesions formed during the erroneous repair process (2). This was described as leading to several cellular outcomes including apoptosis, senescence, autophagy and mitotic catastrophe. While GBM is known to be intrinsically resistant to apoptosis, both senescence and autophagy can be induced by treatment with TMZ and can play either cytoprotective or cytotoxic functions (3,4).

Autophagy is a catabolic process that is hallmarked by the production of a double membrane vesicle, the autophagosome, that engulf dysfunctional cellular components for degradation through the lysosomal machinery (5). Under stressful situations autophagy is upregulated in order to provide cells an appropriate environment by maintaining its homeostasis and ensuring cell growth. In this sense, constitutive autophagy can act as a housekeeper mechanism protecting cells from malignant transformation by contributing to the quality control of cellular components. However, in established tumours, autophagy may function as a pro survival pathway in response to a variety of stresses such as hypoxia, nutrient deprivation and chemotherapy (6). In GBM cell lines, autophagy-induced by TMZ has been reported to provide treatment resistance, therefore, playing a cytoprotective function by suppressing the antitumor effect of TMZ (7). In addition, high levels of autophagy may allow cells to enter in senescence in response to TMZ, while cells with low levels of autophagy have a higher chance of dying from apoptosis (8).

Cellular senescence (CS) is characterised by a state of irreversible growth arrest on cells. CS can occur physiologically due to cellular ageing, by the telomere shortening, as the so called replicative senescence (9). However, unlike normal cells, cancer cells possess an indefinite capacity to proliferate and so, inducing senescence may contribute against cancer progression. In fact, senescence can be induced prematurely by a variety of stressors, including chemotherapy with TMZ (7).

Both processes, autophagy and senescence, may be driven by a mechanism of response to DNA damage, the so called DNA damage response (DDR). Actually, beyond the fact that DDR plays a key role in inducing most types of induced senescence, its been already described that TMZ produces cell cycle arrest at G2/M through activation of the key DDR regulators (3). This response underlies the organismal ability to sense and signal problems in its DNA, to arrest cell cycle progression, activate appropriate DNA repair mechanisms and eliminate cells with unreparable genomes (10, 11). Within this pathway and upon DNA damage, ATM (ataxia-telangiectasia mutated) and ATR (ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related) are the most upstream kinases and signal for the activation of downstream Chk1/Chk2-p53, which ultimately lead to the inhibition of cyclin-CDK complexes in both G1 or G2 checkpoints. The cell cycle arrest allow cells to recover from the damage and avoid cellular senescence and other cellular outcomes acting as a pro survival mechanism (10, 11).

Given the importance of the DDR, senescence and autophagy crosstalk within cancer, the present study was conducted to determine the role of ATR in GBM cells in response to treatment with TMZ, focusing in the induction of autophagy and senescence.

Results

1. Cell cycle arrest at G2/M induced by TMZ is not altered by ATR activity

Previous studies from our group showed that TMZ induces the activation of DDR pathways and cell cycle arrest at G2/M in GBM cells (3,8). In order to evaluate the role of ATR in the cell cycle distribution along with TMZ treatment, we inhibited ATR pharmacologically and also knocked down ATR in U87 glioma cells (Figure 1A). To this, cells were treated with TMZ 100 μ M for 3h, then kept in TMZ-free medium (Figure 1B) or TMZ-free medium with VE-821 (Figure 1C). As expected, TMZ lead to a robust accumulation of cells in G2/M after 3 days. The inhibition of ATR using VE-821 did not alter the cell cycle distribution in response to TMZ (Figure 1D). shATR cells treated with TMZ induced an arrest at G2/M but not in greater extent than the shCTR ones (Figure 1E). Altogether these results suggest that ATR doesn't play role in inducing cell cycle arrest after DNA damaged cause by TMZ at given concentrations.

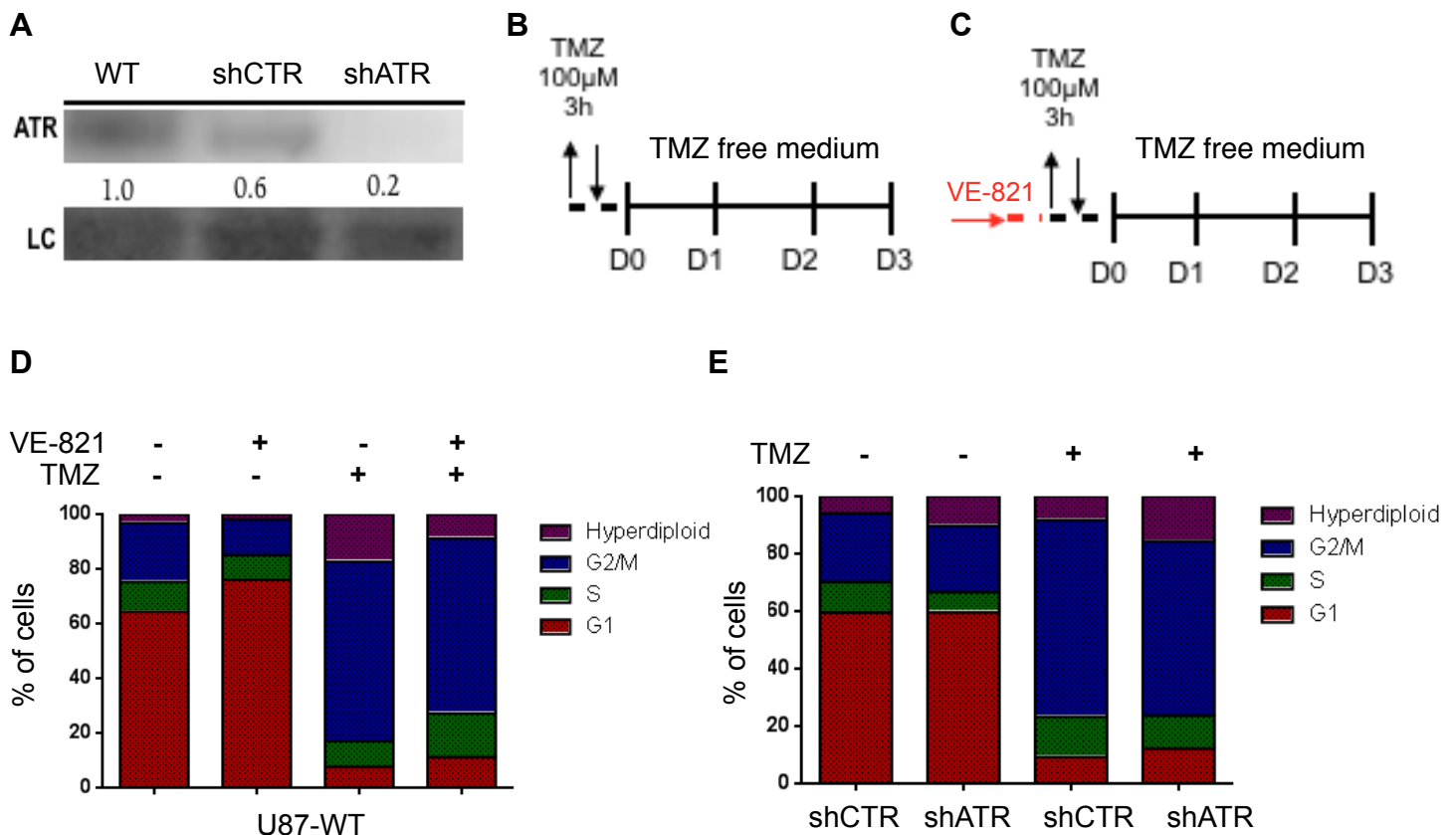


Figure 1: Cell cycle arrest at G2/M induced by TMZ is not altered by ATR activity. (A) Western Blot of ATR in U87-WT cells, scrambled shRNA control (shCTR) and shRNA of ATR. Numbers indicate the band intensity in relation to control. LC- Loading Control; (B) Schematics of the experimental design of shATR cells treated with TMZ [100µM]; (C) Schematics of the experimental design of U87-WT cells exposed to the ATR inhibitor VE-821 at [260nM] prior to TMZ [100µM] treatment; (D) Cell cycle distribution of U87-WT cells treated with TMZ [100µM] and VE-821 [260nM] followed by 3 days in TMZ- free medium; (E) Cell cycle distribution of shATR cells treated with TMZ [100µM] followed by 3 days in TMZ-free medium.

2. TMZ-induced senescence is not affected by the pharmacological or genetic suppression of ATR

As senescent cells are morphologically characterised by a drastic increase in nuclear size, we used the Nuclear Morphometric Analysis (NMA) tool to screen cells for senescence induction (12). Through NMA, nuclei were separated into four categories: Normal (N), Large and Regular (LR), Large and Irregular (LI) and Irregular (I). Senescence induction on U87 cells was assessed by the percentage of LR nuclei 3, 5 and 7 days after treatment. TMZ increased the percentage of U87-WT cells with LR nuclei to around 60% on the three time points in relation to untreated cells, in which we found around 10% of cells with LR nuclei. However, the inhibition of ATR using VE-821 did not alter this percentage, suggesting that ATR is not directly involved in the induction of senescence by TMZ (Figure 2A). To corroborate these data, we next tested induction of senescence in U87 shATR cells exposed to TMZ and the results obtained in this model corroborate with the ones obtained using the pharmacological inhibition of ATR (Figure 2B). Next, to assess the role of ATR in the response to TMZ considering the proliferation capacity of the population of cells, we performed a Cumulative Population Doubling assay (CPD). As expected, we found that TMZ suppressed cell growth from day 3 onward. However, the pharmacological inhibition of ATR using VE-821 did not alter this scenario (Figure 2C) nor did shATR cells (Figure 2D).

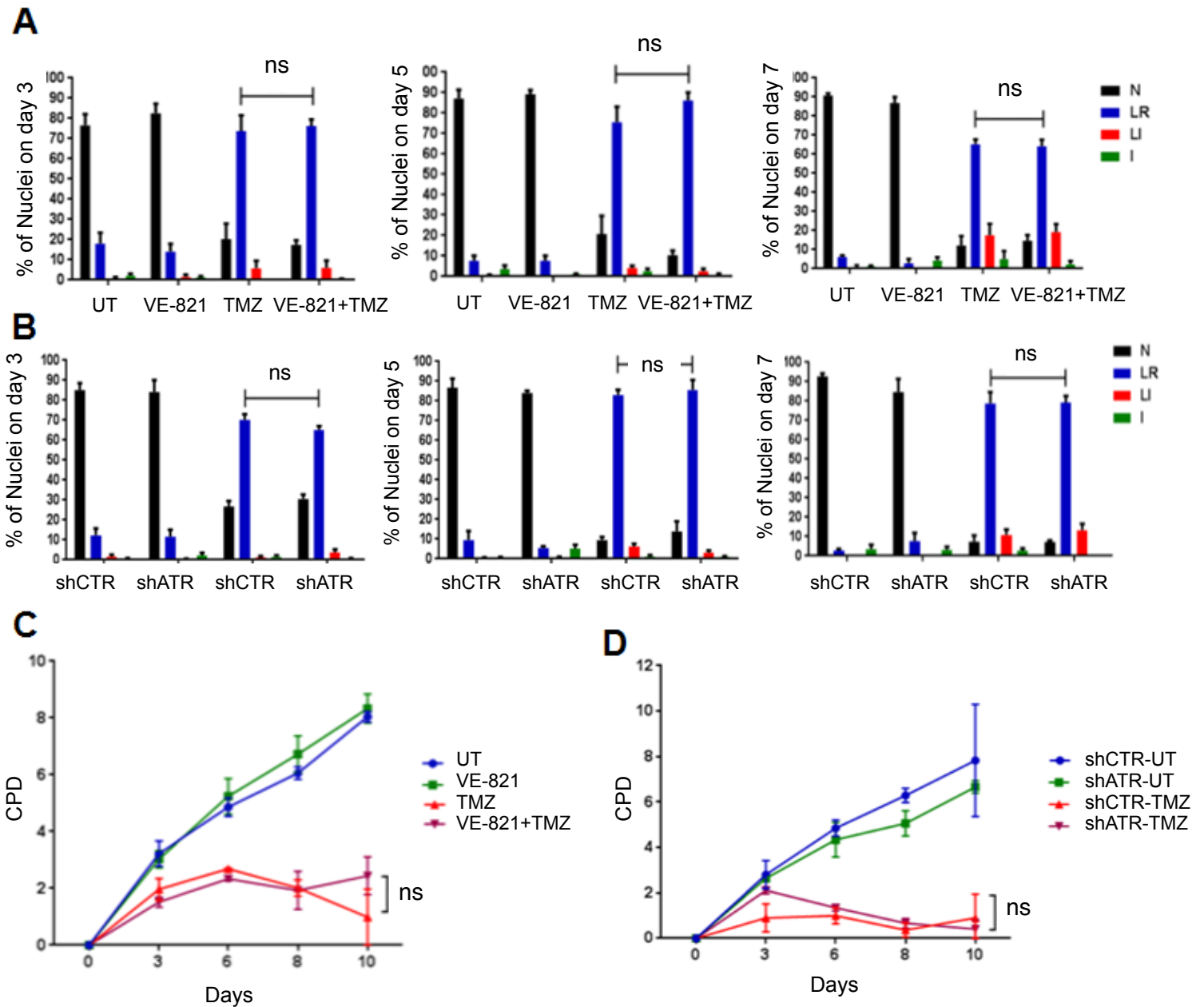


Figure 2: ATR is not involved in the suppression of cell growth and senescence induction by TMZ . U87 WT cells were treated with VE-821 at [260nM] 1h prior to treatment with TMZ at [100 μ M] for 3h. TMZ was removed and cells were kept in medium with VE-821 while shATR cells were treated with TMZ only. DAPI-stained nuclei were analysed for area regularity (through the Nuclear Irregularity Index, NII) using the NMA tool at given time points. (N) represents normal nuclei; (LR) large and regular nuclei; (LI) large and irregular nuclei and (I) irregular nuclei. LR nuclei resemble to senescence induction; **(A)** Percentage of each nuclear type at given time points acquired from the NMA results from U87-WT; UT-Untreated; **(B)** Percentage of each nuclear type at given time points acquired from the NMA results from shATR cells. First two sets of each day are representative of untreated cells while the last two are TMZ treated cells; **(C)** Cumulative Population Doubling (CPD) of U87-WT cells that were exposed to treatment with TMZ, VE-821 or co-treatment. UT- Untreated; **(D)** Cumulative Population Doubling (CPD) of shATR cells that were exposed to treatment with TMZ. Statistical analysis was performed using 2-way ANOVA followed by Tukey's test and bars are representative of mean \pm s.e.m.

3. TMZ increases levels of autophagy and VE-821 treatment leads to an accumulation of SQSTM1 protein

Since TMZ induces autophagy in GBM cells and this mechanism may be central to define the cell fate (8), we next tested for the role of ATR in TMZ-induced autophagy. In order to do that, we used Acridine Orange (AO), a dye that fluoresces in two ranges, green and red. AO fluoresces green in the cytosol and nucleus; it becomes protonated when in acidic compartments (such as the lysosomes or autolysosomes) and emits in the red range (13). We measured autophagy by analysing the red-to-green fluorescence intensity ratio (R/G_{fl}) in U87-WT cells at given time points (Figure 3A). TMZ induced autophagy peaking from day 5 ahead, which was confirmed by western blot for LC3-I/II and the inhibition of ATR did not alter the increase of AO induced by TMZ (Figure 3B). However, the inhibition of ATR decreased the intensity of LC3-II and increased SQSTM1, suggesting a suppression of TMZ-induced autophagy (Figure 3C). We also analysed the role of ATR in TMZ-induced autophagy through U87 cells KnockDown (KD) for ATR. Corroborating with the data obtained by the pharmacological inhibition, the KD of ATR also did not alter the increase of AO staining induced by TMZ (Figure 3D). Altogether, these results indicate that ATR is not directly involved in the autophagy induced by TMZ in GBM cells.

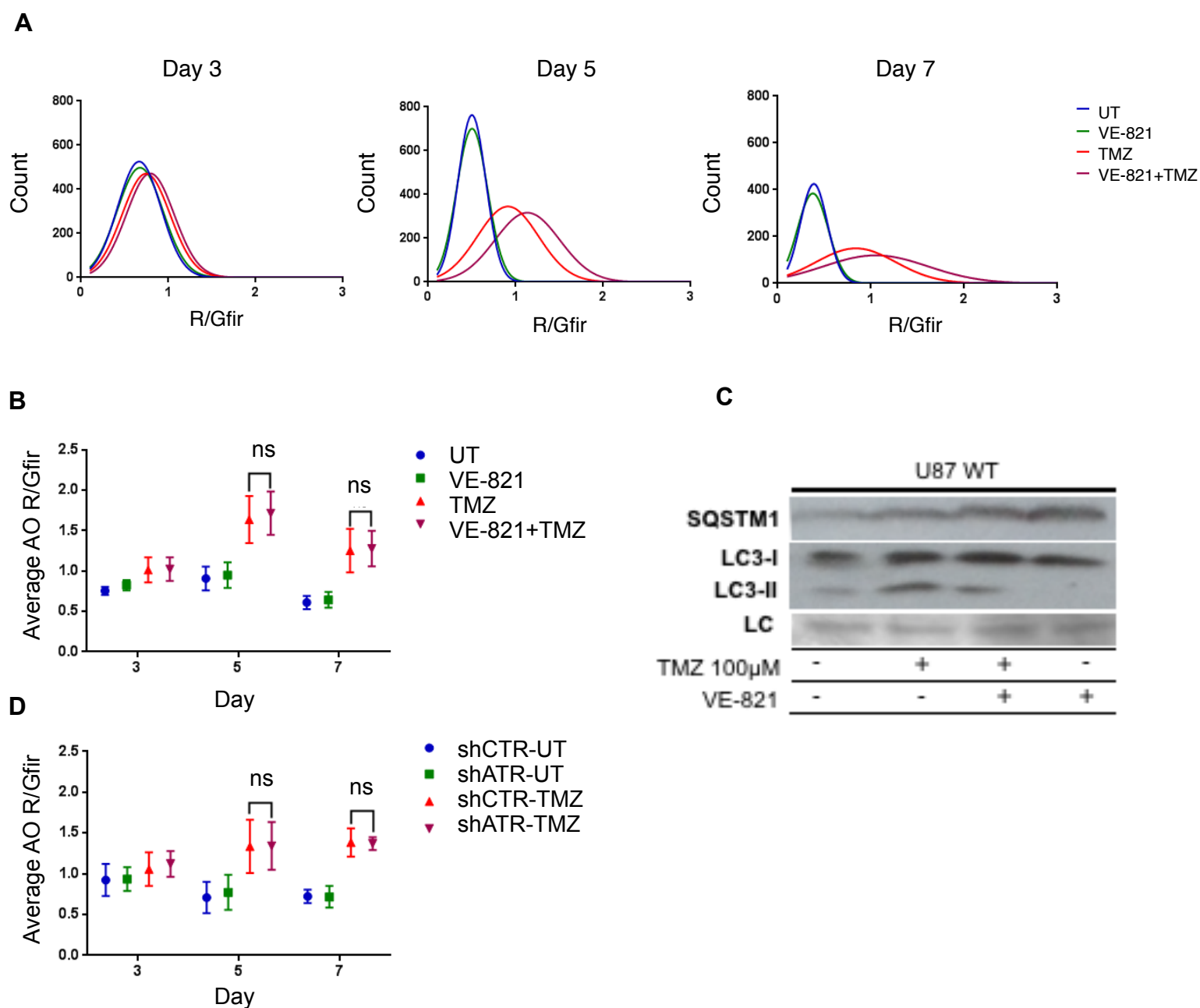
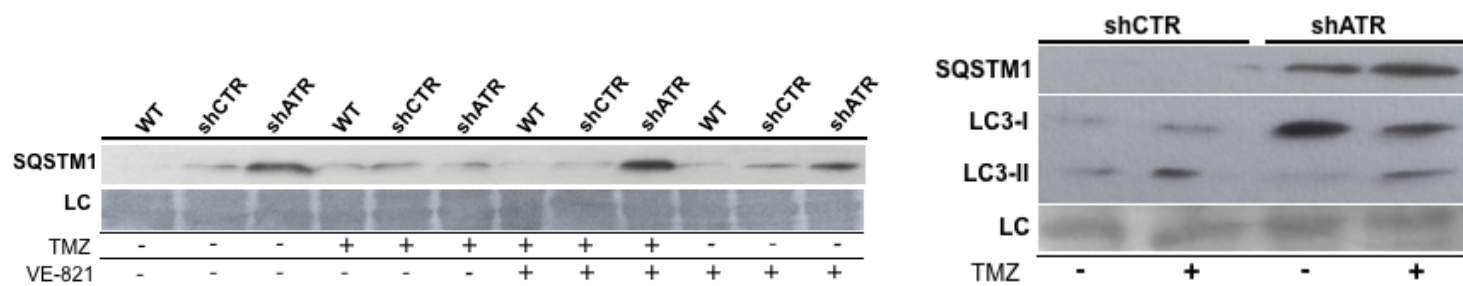


Figure 3: TMZ increases levels of autophagy and VE-821 treatment leads to an accumulation of SQSTM1 protein. U87-WT cells were treated with VE-821 at [260nM] one hour prior to treatment with TMZ at [100µM] for 3hours while U87-shATR cells were treated with TMZ only. **(A)** Autophagy levels measured in U87-WT cells by Red-to-Green Fluorescence intensity Ratio (R/Gfir) at given time points. UT- Untreated; **(B)** Average of all R/Gfir events on days 3,5 and 7 of U87-WT cells; **(C)** Western Blots of SQSTM1 and LC3-I/II in U87-WT cells 3 days after the indicated treatment. LC - Loading Control; **(D)** Average of all R/Gfir events on days 3,5 and 7 of U87-shATR cells. Statistical analysis was performed using 2-way ANOVA followed by Tukey's test and bars are representative of mean \pm s.e.m.

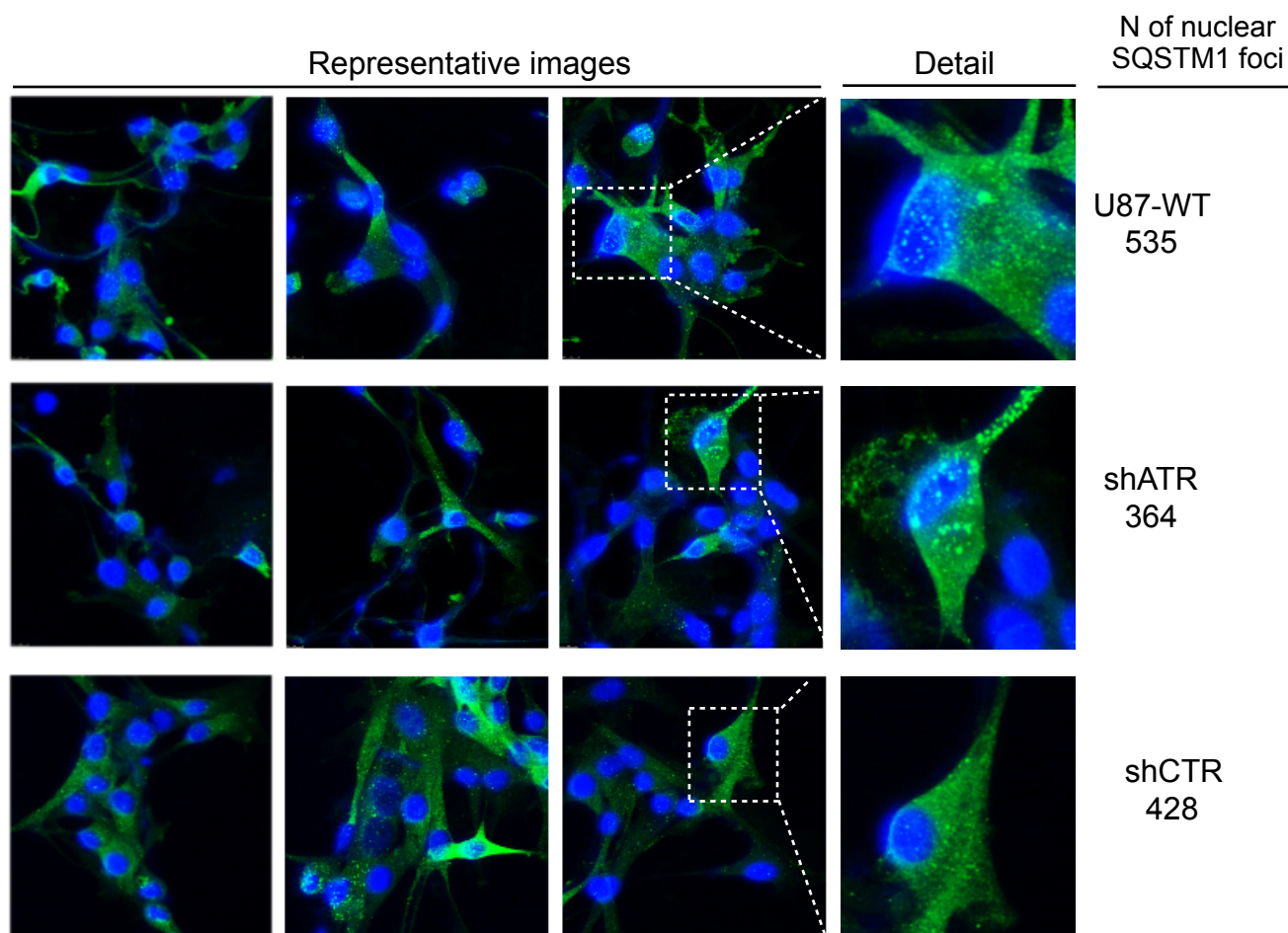
4. SQSTM1 nucleocytoplasmic shuttling is not dependent of ATR activity

Despite not altering TMZ-induced autophagy we interestingly found that the pharmacological inhibition of ATR as well as its KD increased levels of SQSTM1 (Figure 4A). Then, we hypothesised that it's accumulation was a result of ATR not been able to mediate the SQSTM1 shuttling from the nucleus to the cytoplasm. Indeed, SQSTM1 localisation is predominantly cytosolic (14). Since we proposed that SQSTM1 could be accumulated in the nucleus by the lack of ATR activity, we performed immunocytochemical analysis against SQSTM1 on U87-shATR, shCTR and WT cells that have not been subjected to any treatment (Figure 4B). Through the analysis of 100 cells from each group by confocal microscopy, the number of nuclear foci was counted. We also counted the number of cells that had no nuclear foci formation and U87-shATR cells had twice as many cells without any foci formation if compared with U87-WT cells (Figure 4C).

A



B



C

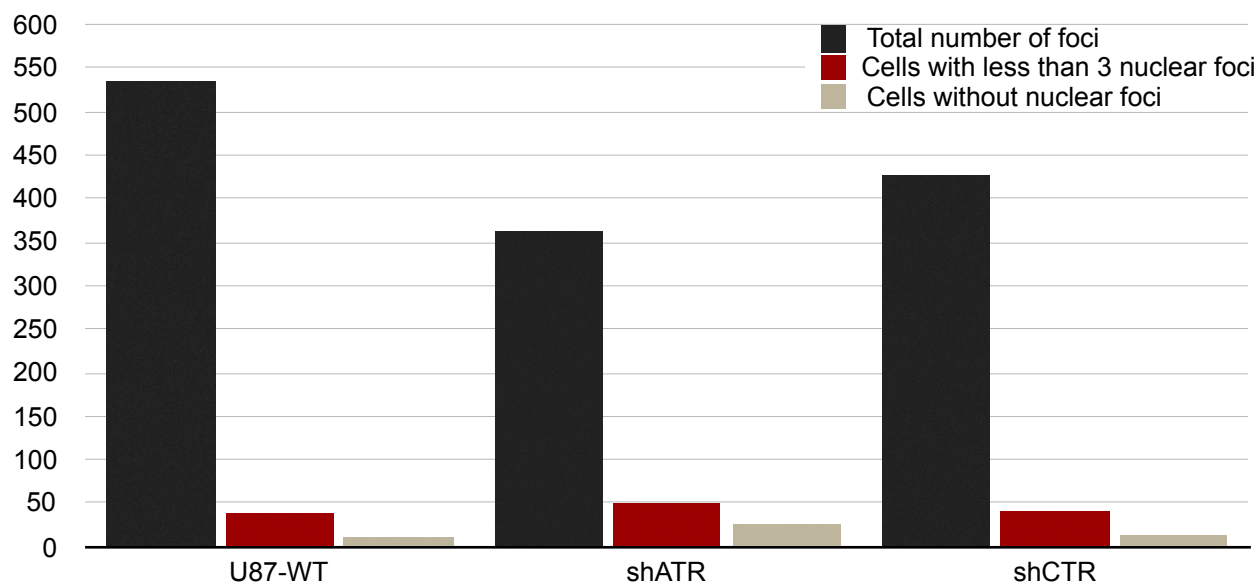


Figure4: SQSTM1 nucleocytoplasmic shuttling is not dependent of ATR activity. (A) U87-WT cells were treated with VE-821 at [260nM] one hour prior to treatment with TMZ at [100µM] for 3 hours while U87-shATR and shCTR cells were treated with TMZ only. Western Blot analysis for SQSTM1 and LC3-I/II was performed 3 days after treatment. LC- Loading Control; **(B)** Confocal microscopy of U87-WT, shATR and shCTR non-treated cells. Cells were grown in coverslips, permeabilised with Triton X-100, fixed and immunofluorescently stained for SQSTM1 (green) and nuclei (blue). All pictures are representative of distinct areas; **(C)** Counts for foci formation of U87-WT, shATR and shCTR cells. The number of foci were counted using Image J software through Z stack.

Discussion

Temozolomide (TMZ) is the most common drug to treat patients with glioblastoma. It is well known that its anticancer activity relies on the formation of DNA adducts that trigger apoptosis, senescence and autophagy. Indeed, TMZ has been shown to induce the DNA damage response (DDR), which rests on the activation of key DDR protein kinases and its downstream targets which in turn signal for the activation of such processes (3). However, active DDR signalling is known to contribute to the resistance of GBM cells to treatment with TMZ (15).

Here, we addressed the question of the contribution of the ATR kinase activity in the response to TMZ, as well as its impact on cellular fate. First, we observed that acute DNA damage, induced by TMZ, leads to cell cycle arrest at G2/M phase followed by senescence induction from day 3 onward. These results corroborated with the ones previously reported by our own group (8). The pharmacological inhibition of ATR with VE-821 didn't seem to sensitise cells to treatment with TMZ nor interfered in the cell cycle arrest. Also, given that DDR signalling plays an important role in induced senescence, we supposed that inhibiting ATR would alter the senescence scenario, however, the inhibition of ATR with VE-821 didn't seem to change the senescence status. These data was supported by the results obtained from cells KD for ATR. In contrast to the link between DDR and senescence, the role of DDR in autophagy relies mostly in information of the ATM and p53 activity, and so, we set to evaluate if the signal from DDR passes through ATR to activate autophagy. TMZ increased levels of autophagy peaking from day 5 onwards, however, co-treating cells with TMZ and VE-821 did not alter the autophagic status in relation to TMZ alone. Within this context, our most surprising finding was the accumulation of SQSTM1 in any case where cells were treated with VE-821 as well as in non-treated shATR cells. SQSTM1 is a selective autophagy substrate commonly used as an autophagy marker, degraded by the end of the process and generally considered to be a cytosolic protein (14). Inhibition of autophagy correlates with increased levels of SQSTM1 while decrease levels are associated with autophagy activation (16). Given that SQSTM1 levels should be lower rather than increased, as it was shown in our

data, we hypothesised that its accumulation was due to ATR, when inhibited or absent, not been able to mediate its shuttling from the nucleus to the cytoplasm. In fact, nothing has been previously reported on the possible link between ATR and SQSTM1. Following its accumulation upon VE-821 treatment as well as in shATR cells, we immunofluorescently stained SQSTM1 and evaluated SQSTM1 nuclear foci formation in non-treated shATR, shCTR and U87-WT cells. Surprisingly, SQSTM1 nuclear foci formation was more abundant in U87-WT cells. Thus, even though SQSTM1 accumulation seem to be due the lack of ATR activity, its been shown that is not due to its accumulation within the nuclei.

Altogether, these data suggest that ATR alone is not essential for the activation of senescence or autophagy induced by TMZ, nor has the power to interfere within the cell cycle arrest. However, TMZ is an alkylating agent that modifies DNA bases and does not induce DSBs directly (15). Thus, ATR may be the primary kinase activated by O6-MeG adduct while ATM is activated afterwards without being required for the initial recognition of stalled replication forks, which arise after initiation of O6-MeG-induced futile MMR cycles. Given that autophagy and senescence are both induced from the third day of TMZ treatment, the activation of ATR kinase, may be happening before the induction of such processes.

Previous studies have reported that ATR plays a role in sensitising cells not only to TMZ but other drugs like cisplatin, and the use of pharmacological inhibitors such as VE-821 could benefit patients to therapy. However, the concentrations in which the pharmacological inhibitor was used alone or combined to other drugs was too high, ranging from 0.1 to 5 μ M, and showing cytotoxic effects when the concentration was kept higher than 1 μ M (17,18). Given that DDR signalling is made of a complex of hundreds of proteins, using such high concentrations of the ATR inhibitor could be inhibiting not only ATR but other kinases which may function to interfere on cellular fate.

In conclusion, our study showed that inhibiting ATR with VE-821 or silencing ATR in GBM cells doesn't have an impact on autophagy, senescence or cell cycle distribution. Our most intriguing finding is that ATR interferes in the levels of

SQSTM1 protein, which was until now, directly related to autophagy. However, the reason for this accumulation is still to be clarified.

Materials and Methods

Antibodies and Reagents

Anti-LC3 (3868) and anti-SQSTM1/p62 (5114) were purchased from Cell signalling Technology and anti-ATR (sc-1887) was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Temozolomide (TMZ) and the fluorescent dye Acridine Orange (AO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and VE-821 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). TMZ and VE-821 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Acros Organics, NJ, USA) and AO was dissolved in water. All culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

Cell culture and treatments

U87 cell line was obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC). Cells were cultured in DMEM low glucose medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained incubated at 37°C and 5% CO₂. Cells were treated with TMZ [100µM] for 3h and VE-821 [130nM] was added to medium an hour prior to TMZ and kept within the medium along the treatment. After treatment, cells were cultured in TMZ-free medium. Analysis of autophagy and senescence was performed 3,5 and 7 days after the treatment and cell cycle distribution and western blot analysis were performed 3 days after treatment.

Generation of stable cell line

ATR gene was KD by transduction of U87 cells with lentiviral vectors produced with shRNA bacterial glycerol SHCLNG-NM_001184, from the Mission RNAi library from Sigma-Aldrich. Non-target (pLKO.1-puro) sequence was used as control. Cells were selected with puromycin (4µg/ml) to generate stable pools of cells.

Cell Cycle

For cell cycle distribution analysis, cells were plated at 3×10^4 cells per well in a 12-wells plate, followed by treatments as indicated. Cells were kept in medium, harvested and fixed in ice-cold ethanol 70%, 3 days after treatment for 2 hours. Fixed cells were washed with PBS and marked with Propidium Iodide (50 μ g/ml), 0.1% Triton X-100 and 50 μ g/ml RNase for 20 min, in the dark, at room temperature. Data acquisition and analysis were performed through flow cytometry using GUAVA EasyCyte (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Western blot

Analysis of protein expression was performed on day 3 after treatment. Cells were lysed, protein concentration was taken by QuantiPro BCA assay Kit. 20 μ g of protein extracts were separated on SDS-PAGE, followed by electrotransfer to a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010). Membranes were blocked with dry milk and incubated overnight, at 4°C, with indicated primary antibodies in 1:1000 dilution. Primary antibody were detected by secondary antibody (Cell Signalling, 7074), 1:2000 dilution for 2h, followed by ECL and X-ray films exposition (Kodak-Xmat). When quantified, optical density of the bands was obtained through ImageJ Software.

Cumulative Population Doublings (CPD)

For cumulative population doublings (CPD), cells were plated at 2×10^4 cells per well in a 24-wells plate. Cells were left to attach and treated with indicated treatments. The cell number was determined on D3, D6, D8 and D10 and the CPD was calculated through the equation $PD = [\log N(t) - \log(t_0)] / \log 2$, where $N(t)$ is the number of cells per well at the time of count and $N(t_0)$ is the initial number of cells. The sum of PDs was then plotted versus time in culture.

Nuclear Morphometric Analysis (NMA)

These analysis were performed using the NMA tool. Cells were plated at 2×10^4 for analysis on day 3, 1.5×10^4 for analysis on day 5 and 1×10^4 for analysis on day 7. Treatments were performed as indicated and at given days cells were fixed with 3% paraformaldehyde (v/v in PBS) for 20 min at room temperature, and kept in PBS. Fixed cells were marked with a solution containing 300nM DAPI and 0.1% Triton X-100 (v/v in PBS) for 30 min at room temperature, followed by quantification of the images obtained with DAPI staining using the software image Pro Plus 6.0. Data is presented as a plot of area versus Nuclear Irregularity Index (NII), which separates nuclei by its morphometric phenotype. The percentage of Normal, Irregular, Large and regular and Large and Irregular nuclei were determined as described.

Autophagy detection by Acridine Orange (AO)

Cells were plated as described previously in NMA. Briefly, cells were trypsinized, collected and stained with AO $2.7\mu\text{M}$ ($1\mu\text{g/ml}$) for 15 min at room temperature, in the dark. Cells were then analysed on a GUAVA EasyCyte flow cytometer using InCyte 2.6 software. We analysed the Red/Green Fluorescence Intensity Ratio (R/Gfir) to assess levels of autophagy on days 3, 5 and 7 after TMZ treatment.

Statistical Analysis

Four independent experiments were performed for each analysis except for Cell cycle distribution analysis and immunofluorescence which was performed only once and CPD, performed twice. Differences between controls and cells treated with TMZ, VE-821 or combined treatment were analysed using ANOVA followed by Tukey's test using Prism 6 (GraphPad Software). Bars are representative of mean \pm s.e.m.

References

1. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016;35:23.
2. Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M, et al. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One*. 2013;8(1):e55665.
3. Filippi-Chiela, EC; Thomé, MP; Bueno e Silva, MM; Pelegrini, AL; Ledur, PF; Garicochea, B; Zamin, LL; Lenz, G. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* 2013; 13: 147-160.
4. Gewirtz DA. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy*. 2013;9(5):808-12.
5. Wu WK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FK, et al. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene*. 2012;31(8):939-53.
6. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis*. 2013;4:e838.
7. Jawhari S, Ratinaud MH, Verdier M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'menage-a-trois'. *Cell Death Dis*. 2016;7(10):e2434.
8. Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy*. 2015;11(7):1099-113.
9. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(9):729-40.
10. Marechal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(9).
11. Ito M, Ohba S, Gaensler K, Ronen SM, Mukherjee J, Pieper RO. Early Chk1 phosphorylation is driven by temozolomide-induced, DNA double strand break- and mismatch repair-independent DNA damage. *PLoS One*. 2013;8(5):e62351.

12. Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Lenz G. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One*. 2012;7(8):e42522.
13. Thomé PM, Filippi-Chiela EC, Villodre SE, Migliavaca BC, Onzi RG, Felipe BK, Lenz G. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci* 2016; 129: 4622-4632.
14. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem*. 2010;285(8):5941-53.
15. Eich M, Roos WP, Nikolova T, Kaina B. Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(11):2529-40.
16. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
17. Middleton FK, Patterson MJ, Elstob CJ, Fordham S, Herriott A, Wade MA, et al., Common cancer-associated imbalances in the DNA damage response confer sensitivity to single agent ATR inhibition. *Oncotarget*. 2015: 32396-32409.
18. Lima M, Bouzid H, Soares DG, Selle F, Morel C, Galmarini CM, Henriques JA, Larsen AK, Escargueil AE. Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. *Oncotarget*. 2016 May 3;7(18):25885-901.

4 Discussão

Temozolomida (TMZ) é a droga mais comum usada para tratar pacientes com Glioblastoma (GBM) e, sabe-se que seu potencial anti-câncer está relacionado à capacidade da droga em formar adutos no DNA que, conseqüentemente, disparam mecanismos como apoptose, senescence e autofagia. Na verdade, TMZ induz uma resposta ao dano no DNA (DDR), que ativa as cinases ATR e ATM e seus alvos *downstream* que, por essa via, podem também interferir nesses processos. Contudo, a sinalização da DDR pode contribuir para a resistência de células de GBM ao tratamento de TMZ (Filippi-Chiela *et al.*, 2013; Eich *et al.*, 2013).

Nesse estudo, nós avaliamos a participação da cinase ATR na ativação dos processos da autofagia e senescência, bem como sua interferência na distribuição do ciclo celular e crescimento populacional nas células de GBM.

Foi observado que dano no DNA, como consequência ao tratamento agudo com TMZ, induz uma parada no ciclo celular na fase G2/M, bem como senescência a partir do terceiro dia, após o tratamento. Esse resultado, além de esperado, corrobora com resultados prévios do nosso grupo (Filippi-Chiela *et al.*, 2015). No entanto, os resultados obtidos por CPD e *status* do ciclo celular apontam que a inibição farmacológica da ATR, cinase central da DDR, com VE-821, não sensibilizou células ao tratamento com TMZ, tampouco alterou a distribuição do ciclo. Além disso, sabendo que a sinalização da DDR participa do processo de indução de senescência, foi hipotetizado que a inibição da ATR alteraria o cenário desse processo, no entanto, a inibição de ATR não interferiu no estado da senescência. Como suporte à esses resultados, nas células cujo gene da ATR foi silenciado, a ocorrência de senescência não sofreu alteração.

Em contraste ao papel direto que a DDR possui sobre o processo de senescência, dados da ligação da DDR e autofagia ainda são bastante escassos e direcionados ao papel da atividade da cinase ATM e proteína p53. Dessa forma, avaliamos o impacto da ausência da ATR diante desse processo. Foi observado que o tratamento com TMZ aumentou os níveis de autofagia a partir do quinto dia

após o tratamento, todavia, o co-tratamento de TMZ e VE-821, ou o tratamento dessas células somente com VE-821 não interferiu no status autofágico se comparado ao tratamento de TMZ. Dentro desse contexto, nossa observação mais surpreendente foi que a proteína SQSTM1 apresentou níveis aumentados em todas as situações em que VE-821 foi usado como tratamento, bem como em células não tratadas cujo gene da ATR foi silenciado. É importante destacar que SQSTM1 é um substrato da autofagia, comumente utilizado como marcador desse processo e geralmente considerada uma proteína citosólica (Panvik *et al.*, 2010). Assim, a inibição da autofagia correlaciona com o aumento dos níveis da SQSTM1 e, baixos níveis dessa proteínas, são associados à ativação desse processo (Klionsky *et al.*, 2016).

Uma vez que nossos resultados indicaram níveis da SQSTM1 aumentados na inibição ou silenciamento da ATR, foi formulada a hipótese de que esses níveis poderiam ser a consequência do acúmulo da proteína SQSTM1 dentro do núcleo. Nesse sentido, a proteína ATR apresentaria alguma função sobre o transporte dessa proteína do núcleo para o citoplasma. De fato, nada foi previamente registrado sobre a relação entre as proteínas ATR e SQSTM1. Para testar nossa hipótese, a SQSTM1 foi marcada por imunofluorescência e foi analisada a formação de foci nuclear em células selvagens não tratadas, bem como em células silenciadas para ATR e controle (U87-WT, U87-shATR e U87-shCTR respectivamente). Curiosamente, a formação de foci nuclear foi mais abundante em células U87-WT que em shATR. Assim, nossa hipótese de que o acúmulo de SQSTM1 fosse consequência da falta de atividade da ATR em mediar o transporte dessa proteína do núcleo para o citoplasma foi negada, e estudos adicionais são necessários para entender esse novo mecanismo de interação entre essas duas proteínas.

Esses dados em conjunto sugerem que a participação da ATR não é essencial para a ativação da autofagia ou da senescência por TMZ. Além disso, aparentemente não interfere na distribuição do ciclo celular. No entanto, TMZ é um agente alquilante que não produz quebra dupla da fita do DNA diretamente (Eich *et al.*, 2103). Assim, a cinase ATR, ativada pela formação do aduto O⁶-MeG

por TMZ, pode estar sendo ativada rapidamente após indução de dano. Dessa forma, autofagia e senescência podem estar sendo induzidas mediante a ativação da cinase ATM que não é requerida para o reconhecimento inicial da parada da forquilha de replicação que surge logo após o início dos ciclos futeis induzidos por MMR em condições de formação do aduto O⁶-MeG.

Dados da literatura sugerem que a inibição da DDR, via ATR, sensibiliza células ao tratamento de TMZ e outras drogas como cisplatina, e que o uso de inibidores farmacológicos dessa via, pode beneficiar pacientes à terapia (Middleton *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2016). Contudo, as concentrações em que o inibidor VE-821 é usado sozinho ou em combinação com outras drogas são bastante altas, variando de 0.1µM - 5µM, e seu efeito citotóxico foi observado apenas em condições em que o inibidor foi usado acima da concentração de 1µM (Middleton *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2016). Nesse contexto, sabendo que a DDR é composta de um complexo grande de proteínas, o uso de concentrações elevadas desse inibidor pode estar inibindo não somente a ATR mas outras cinases que também podem interferir nos diferentes desfechos celulares pós dano. Da mesma forma, em virtude da complexidade da via é possível que as proteínas que compensem a função de ATR sejam ativadas em paralelo após a inibição ou silenciamento da mesma.

5 Conclusão

Os resultados do presente trabalho apontam que:

- O tratamento agudo com TMZ induz uma parada no ciclo celular na fase G2/M que é acompanhada pela indução do processo de senescência;
- O tratamento de células de GBM com TMZ apresentam um aumento dos níveis da autofagia;
- O uso do inibidor da cinase ATR, VE-821, não é capaz de interferir no efeito exercido pela TMZ sobre os mecanismos de autofagia, ciclo celular, senescência e proliferação celular;
- A inibição farmacológica da ATR assim como o silenciamento desse gene em células de GBM geram um acúmulo pra proteína SQSTM1;
- O acúmulo da SQSTM1 não é nuclear.

Em conjunto, esses dados demonstram que ATR não parece participar no processo de ativação da autofagia e senescência, em resposta ao tratamento com TMZ. No entanto, parece desempenhar alguma função conjunta com a proteína SQSTM1 uma vez que os dados mostram um acúmulo desta proteína. Contudo, a ligação entre ATR e SQSTM1 ainda há de ser descoberta.

Embora exista uma resistência conferida à resposta a terapia pelas vias da DDR, e a inibição desse processo é vista como potencial terapêutico promissor, os resultados apresentados nesse estudo podem ser indicativos da capacidade dinâmica das proteínas envolvidas nessa via. Nesse contexto, o papel desenvolvido por uma cinase específica pode ser compensado por outras, ou, podem também ser indicativos da falta de função da ATR diante à esses processos.

6 Referências

ACOSTA, J. C., & GIL, J. (2012). Senescence: a new weapon for cancer therapy. **Trends Cell Biol**, 22(4), 211-219.

BARTEK, J. & LUKAS, J. (2003) CHK1 AND CHK2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer cell**, 3, 421-429.

CAMPISI, J., & D'ADDA DI FAGAGNA, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8(9), 729-740.

CHEN, N., & DEBNATH, J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. **FEBS Lett**, 584(7), 1427-1435. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.034

CHILDS, B.G., DURIK. M., BAKER. D.J., & DEURSEN, J.M.V (2016) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. **Nat Med**, 21(12): 1424–1435

COLLADO, M. & SERRANO, M. (2006) The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. **Nat Rev**, 6, 472-476.

COPPE, J. P., DESPREZ, P. Y., KRTOLICA, A., & CAMPISI, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. **Annu Rev Pathol**, 5, 99-118.

DENARDO, D. G., JOHANSSON, M., & COUSSENS, L. M. (2008). Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 27, 11–18.

EICH, M., ROOS, W. P., NIKOLOVA, T., & KAINA, B. (2013). Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. **Mol Cancer Ther**, 12(11), 2529-2540.

ELIOPOULOS, A.G., HAVAKI, S., GORGOULIS, V.G. (2016). DNA Damage Response and Autophagy: A meaningful partnership. **Front. Genet**, 7:204

FILIPPI-CHIELA, E.C., VESSONI, A.T., MENCK, C.F., & LENZ, G. (2013). Autophagy and genomic integrity. **Cell Death Differ**, 20, 1444-1454.

FILIPPI-CHIELA, E.C., THOME, M.P., BUENO E SILVA, M.M., PELEGRINI, A.L., LEDUR, P.F., GARICOCHEA, B., ZAMIN, L.L., & LENZ, G. (2013). Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer** 13, 147.

- FILIPPI-CHIELA, E.C., BUENO E SILVA, M.M., THOMÉ, M.P., LENZ, G. (2015) Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, 11(7):1099-113.
- GALLUZZI, L., PIETROCOLA, F., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., AMARAVADI, R. K., BAEHRECKE, E. H., CECCONI, F., KROEMER, G. (2015). Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **EMBO J**, 34(7), 856-880.
- GHOSH, K. & CAPELL, B.C. (2016) The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. **Journal of Investigative Dermatology**, 136, 2133-2139.
- GOLDSMITH, J., LEVINE, B., & DEBNATH, J. (2014). Autophagy and cancer metabolism. **Methods Enzymol**, 542, 25-57.
- HAKEM, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **EMBO J**, 27.n4, 589-605.
- HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), 646-674.
- HIROSE, Y., BERGER, M.S. & PIEPER, R.O. (2001). p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of Temozolomide-treated human Glioblastoma cells. **Cancer Res.**, 61, 1957-1963
- JIANG, P., & MIZUSHIMA, N. (2014). Autophagy and human diseases. **Cell Res**, 24(1), 69-79.
- KINNER, A., WU, W., STAUDT, C., & ILIAKIS, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. **Nucleic Acids Res**, 36(17), 5678-5694.
- KLIONSKY, D. J., ABDELMOHSEN, K., ABE, A., ABEDIN, M. J., ABELIOVICH, H., ACEVEDO AROZENA, A., ZUGHAIER, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, 12(1), 1-222.
- KUILMAN, T., MICHALOGLOU, C., MOOI, W.J. & PEEPER, D.S. (2010). The essence of senescence. **Genes Dev**, 24, 2463-2479.
- KUMA, A., HATANO, M., MATSUI, M., YAMAMOTO, A., NAKAYA, H., YOSHIMORI, T., OHSUMI, Y., TOKUHISA, T., & MIZUSHIMA, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, 432, 1032-1036.
- LAWLESS, C., WANG, C., JURK, D., MERZ, A., ZGLINICKI, T., & PASSOS, J. F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. **Exp Gerontol**, 45(10), 772-778.

LEVINE, B., & YUAN, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? **J Clin Invest**, 115, 2679-2688.

LIMA, M., BOUZID, H., SOARES, D.G., SELLE, F., MOREL, C., GALMARINI, C.M, HENRIQUES, J.A., LARSEN, A.K., ESCARGUEIL, A.E. (2016) Dual inhibition of ATR and ATM potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. **Oncotarget**, 3;7(18):25885-901.

LORIN, S., HAMAI, A., MEHRPOUR, M., & CODOGNO, P. (2013). Autophagy regulation and its role in cancer. **Semin Cancer Biol**, 23(5), 361-379.

MARECHAL, A., & ZOU, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5(9).

MATHEW, R., KARP, C.M., BEAUDOIN, B., VUONG, N., CHEN, G., CHEN, H.Y., BRAY, K., REDDY, A., BHANOT, G., GELINAS, C., DIPOLA, R.S., KARANTZA-WADSWORTH, V. & WHITE, E. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. **Cell** 137, 1062-1075.

MIDDLETON, F.K., PATTERSON, M.J., ELSTOB, C.J., FORDHAM, S., HERRIOTT, A., WADE, M.A., ET, A.L. (2015). Common cancer-associated imbalances in the DNA damage response confer sensitivity to single agent ATR inhibition. **Oncotarget**, 32396-32409.

MIJALJICA, D., PRESCOTT, M., & DEVENISH, R. J. (2014). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. **Autophagy**, 7(7), 673-682.

MOJAS, N.; LOPES, M.; JIRICNY, J. (2007). Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. **Genes Dev**, 21 (24), 3342-55.

MUNOZ-ESPIN, D., & SERRANO, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15(7), 482-496.

NISHIDA, K., YAMAGUCHI, O., & OTSU, K. (2008). Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. **Circ Res**, 103(4), 343-351.

O'CONNOR, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Mol Cell**, 60(4), 547-560.

PANKIV, S., LAMARK, T., BRUUN, J.A., OVERVATN, A., BJORKOY, G., JOHANSEN, T. (2010) Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. **J Biol Chem**, 285(8):5941-53.

- PARZYCH, K. R., KLIONSKY, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n.3, 460-73.
- RODIER, F., & CAMPISI, J. (2011). Four faces of cellular senescence. **J Cell Biol**, 192(4), 547-556.
- ROOS, W. P., THOMAS, A. D., & KAINA, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. **Nat Rev Cancer**, 16(1), 20-33.
- SHAY, J. W., & WRIGHT, W. E. (2007). Hallmarks of telomeres in ageing research. **J Pathol**, 211(2), 114-123.
- THOMÉ, P.M., FILIPPI-CHIELA, E.C., VILLODRE, S.E., MIGLIAVACA, B.C., ONZI, R.G., FELIPE, B.K., LENZ, G. (2016). Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **J Cell Sci**, 129: 4622-4632.
- TISDALE, M. J. (1987). Antitumor imidazotetrazines--XV. Role of guanine O6 alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. **Biochem Pharmacol**, 36 (4), 457-62.
- VARGAS, J., FELTES, B.C., POLONI, J.D.E. F., LENZ, G. & BONATTO, D. (2012). Senescence; an endogenous anticancer mechanism. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 17, 2616-2643.
- WU, W. K., COFFELT, S. B., CHO, C. H., WANG, X. J., LEE, C. W., CHAN, F. K., SUNG, J. J. (2012). The autophagic paradox in cancer therapy. **Oncogene**, 31(8), 939-953.
- YANG, Z. & KLIONSKY, D.J. (2010). Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Curr Opin Cell Biol**, 22, 124-131.
- ZHANG, D., TANG, B., XIE, X., XIAO, Y. F., YANG, S. M., & ZHANG, J. W. (2015). The interplay between DNA repair and autophagy in cancer therapy. **Cancer Biol Ther**, 16(7), 1005-1013.
- ZHOU, B.S. & ELLEDGE, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nat Rev**, 408, 433-439.

Currículo



Alexandra Souza Vigna

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3588901808708096>
Última atualização do currículo em 30/03/2017

Bacharel em Biological Sciences, formada pela London Metropolitan University. Atualmente é bolsista de mestrado do CNPq pelo programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, desenvolvendo atividade de pesquisa na área de Resposta ao dano do DNA, autofagia e senescência. **(Texto informado pelo autor)**


Identificação

Nome Alexandra Souza Vigna 
Nome em citações bibliográficas VIGNA, A. S.

Endereço

Endereço Profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Campus do Vale
Agronomia
91509900 - Porto Alegre, RS - Brasil
Telefone: (51) 33087620

Formação acadêmica/titulação

2015 Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Avaliação do papel da proteína ATR na indução de autofagia e senescência por Temozolomida em células de Glioblastoma, Orientador:  Guido Lenz.
Coorientador: Eduardo Cremonese Filippi-Chiela.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2011 - 2014 Graduação em biological sciences.
London Metropolitan University, LMU, Inglaterra.

Formação Complementar

2016 - 2016 Extensão universitária em Bioestatística. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

2015 - 2015 Extensão universitária em Princípios da Oncologia. (Carga horária: 5h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

2014 - 2014 Extensão universitária em what's new in cancer research. (Carga horária: 7h).

2014 - 2014	University of Oxford, OX, Inglaterra. Extensão universitária em Fronteiras do conhecimento em Oncologia. (Carga horária: 11h). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.
2014 - 2014	Estudo da sinalização celular no câncer- Metodologias. (Carga horária: 15h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2005 - 2007	Curso de Inglês. (Carga horária: 180h). High Profile, HP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Projetos de pesquisa

2015 - Atual	Avaliação do papel da cinase ATR nos processos de autofagia e senescência Descrição: O objetivo desse projeto é avaliar a participação da cinase ATR nos processos de autofagia e senescência induzidos por Temozolomida em células de Glioblastoma. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Integrantes: Alexandra Souza Vigna - Coordenador / Eduardo Cremonese Filippi-Chiela - Integrante / Marcos Paulo Thomé - Integrante / Giovana Onzi - Integrante / Guido Lenz - Integrante / Michelle de souza lima - Integrante.
---------------------	---

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Eventos

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. LENZ, G. ; **VIGNA, A. S.** ; Filippi-Chiela, E.C ; THOME, M. P. ; ONZI, G. ; HUTTEN, M. ; KIPPER, F. ; VILLODRE, E. ; OLIVEIRA, A. . VI curso de sinalização no câncer. 2016. (Outro).
2. LENZ, G. ; **VIGNA, A. S.** ; Filippi-Chiela, E.C ; THOME, M. P. ; ONZI, G. ; VILLODRE, E. ; OLIVEIRA, A. ; KIPPER, F. . V curso de sinalização no câncer. 2015. (Outro).

