

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA ENZIMA DE REPARO DE DNA,
ALQUILADENINA DNA GLICOSILASE (AAG), NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA
AO ESTRESSE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

LARISSA MILANO DE SOUZA

PORTO ALEGRE, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA ENZIMA DE REPARO DE DNA,
ALQUILADENINA DNA GLICOSILASE (AAG), NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA
AO ESTRESSE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

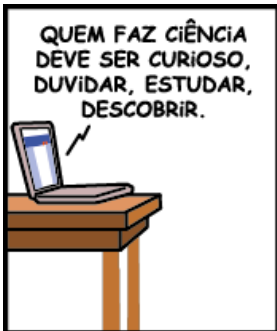
LARISSA MILANO DE SOUZA

Orientadores: Dr. Guido Lenz e Dr. João Antônio Henriques

Co-orientadora: Dra. Lisiane Meira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

PORTO ALEGRE, 2018



Assembleia UFSC - Alexandre Beck 2901/18

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que em algum momento me ajudaram no decorrer deste projeto.

Aos meus orientadores, **Dr. João Henriques** e **Dr. Guido Lenz**, pela confiança depositada no meu trabalho. Ao **Henriques** por ter assumido a minha supervisão já em meados do doutorado e ter concordado com a minha participação no PVE/SwB Na University of Surrey. Ao **Guido**, por ter me dado suporte e orientação durante toda a minha formação acadêmica na UFRGS e sempre estar disponível para discussões sinceras.

A minha co-orientadora na University of Surrey, **Dr. Lisiane Meira**, que me recebeu de braços abertos e com muito carinho em Guildford, tanto na sua casa como no laboratório. Agradeço por todo o apoio científico e psicológico. Por ter acreditado no meu potencial, pelo incentivo, sempre permitindo e estimulando a minha autonomia acadêmica. Tornou-se um exemplo de pesquisadora, de ética e de pessoa para mim. Muito obrigada por todo o reconhecimento e confiança, e por estar sempre disponível! You rock!

Ao **Dr. Axel Northuff** pelas discussões científicas (mesmo durante as férias) e pela contribuição indispensável no Capítulo II desta tese. Obrigada também, por junto com a Lisi, ter sempre a casa aberta para receber!

A **Dr. Jenifer Saffi**, minha primeira orientadora desde o segundo semestre da graduação. Obrigada, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Reparação de DNA, pela confiança e pelos mais de 7 anos de orientação. Este período foi de grande importância para construção da minha maturidade e independência científica.

A minha comissão de acompanhamento, os professores **Diego Bonatto** e **a Nusha**, pelas críticas e sugestões no decorrer do trabalho. A **Nusha** também pelo apoio no laboratório, por todo estímulo e também pela parceria acadêmica e não acadêmica.

Agradeço ao **PPGBCM**, e principalmente a **Silvia Centeno**, por todo o suporte, pela eficiência e pela prestatividade.

A todos os meus colegas e ex-colegas do Laboratório Reparação de DNA de Eucariontes, pela paciência e companhia ao longo da graduação, do mestrado e do doutorado.

As meninas, **Michele** Lima e Victoria **Garcia**, pela amizade e por me aturarem dentro e fora do laboratório. Por todos esses anos de convívio, de sinceridade e por aguentarem firme todas as tempestades.

As minhas alunas de iniciação científica, **Caroline Vieira** e **Rafaela Andreguetti**. A Carol que me acompanhou durante este trabalho na UFRGS e pela participação significativa no Capítulo III desta tese. E a **Rafa** que foi peça fundamental no início do projeto na University of Surrey, pelo comprometimento, pela amizade e pela alegria contagiante.

A todos os meus colegas do 04AY04 na Surrey que foram sempre muito receptivos: Abdulah, Fahad, Amy, Natalie, Nikoleta, Andria e a Tshedi. Também a todos os professores que me aceitaram como assistente em quase todos os módulos, e estimularam o meu gosto pelo ensino.

Em especial, agradeço as minhas amigas brasileiras, que pra minha sorte já estavam trabalhando com a Lisi, **Dr. Diana Bordin e Dr. Clara Charlier**. A **Clara**, pela amizade desde a biofísica na UFRGS, por compartilhar desde o café até os dias mais mal-humorados. A **Diana**, pela parceria em qualquer hora, pela amizade, pelos desabafos nos períodos mais difíceis, e por todas as garrafas de vinho compartilhadas. A **Sandra**, que chegou de paraquedas na minha vida e na Surrey nos meus últimos meses em Guildford, mas que com certeza fez este período muito mais leve e divertido, apesar de árduo.

To my lovely husband, **Jeffrey Smale**, without whom this thesis would have been completed one year earlier (hehe). For giving me all the support, for holding on even in the hardest times, for following me wherever I have to go. Also, for the help in some figures when I didn't have more patience to deal with it. You make me a better person.

Agradeço a minha mãe e ao meu irmão, **Lila Milano e Jonathas Milano** pelo apoio, pelo incentivo e pela confiança, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Agradeço especialmente a minha mãe por todas as oportunidades proporcionadas, mesmo com as dificuldades financeiras, cada passo foi fundamental para que o caminho acadêmico fosse trilhado.

APRESENTAÇÃO

Esta tese foi desenvolvida parcialmente no Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos, situado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte das atividades foram realizadas durante estágio-sanduíche na *Faculty of Health and Medical Sciences (FHMS)* da *University of Surrey* (Guildford, Reino Unido). Este trabalho foi subsidiado pelo CNPq, o qual concedeu a bolsa de doutorado no país (141724/2014-5), e pelo projeto de Pesquisador Visitante Especial do programa Ciências sem Fronteiras (PVE -207503/2015-0), que custeou o projeto e a bolsa de doutorado sanduíche no Reino Unido (207503/2015-0).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO	13
ESTRUTURA DA TESE	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Dano e reparo de DNA.....	16
1.1.1. Reparo por excisões de bases (<i>base excision repair, BER</i>).....	18
1.1.2. Lesões reconhecidas pelo BER.....	19
1.1.3. Reparo de lesões alquilantes no DNA.....	21
1.1.4. DNA glicosilases	24
1.1.5. Alquiladenina DNA Glicosilase/Metilpurina DNA Glicosilase (AAG/MPG).....	25
1.1.6. Fenótipos associados à AAG e ao desequilíbrio do BER.....	27
1.2. Estresse do reticulo endoplasmático.....	31
1.2.1. IRE1 α	35
1.2.2. PERK	36
1.2.3. ATF6	38
1.2.4. ERAD (<i>Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation</i>)	38
1.2.5. Estresse de RE e autofagia.....	42
1.2.6. O UPR no câncer	44
1.3. Glioblastoma multiforme (GBM).....	49
1.3.1. Tratamento.....	50
2. OBJETIVO GERAL	56
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3. CAPÍTULO I – Desenvolvimento e caracterização das linhagens celulares moduladas para AAG	57
4. CAPÍTULO II – “A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress”.	69
5. CAPÍTULO III – “Enhancement of temozolomide cytotoxicity by pharmacological induction of endoplasmic reticulum stress occurs in an AAG-dependent manner”.	106
6. CAPÍTULO IV — “Avaliação do perfil transcricional de marcadores/alvos da resposta de estresse ao retículo endoplasmático combinados ao reparo de DNA e seu impacto na sobrevivência de pacientes com glioblastoma”.	135
7. DISCUSSÃO INTEGRADA	149
8. CONCLUSÃO GERAL	170
8.1. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	170
9. PERSPECTIVAS	172
10. BIBLIOGRAFIA	173

11. ANEXO I - RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	198
12. ANEXO II - CURRÍCULO LATTES.....	201

LISTA DE ABREVIATURAS

AAG - alquil-adenina DNA glicosilases (*alkyladenine DNA glycosylase*)
AP - sítio apurínico ou apirimidínico
APE1 - endonuclease AP humana 1
ARE - *antioxidant response element*
ASK1 - *apoptosis signal-regulating kinase 1*
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATF4 - Fator de ativação transcricional 4 (*activating transcription factor 4*)
ATF6 - Fator de ativação transcricional 6 (*activating transcription factor 6*)
ATF6f - f de fragmento, domínio citosólico de ATF6
BCNU - Carmustina
BER - Reparo por excisão de bases (*Base excision repair*)
BIM - *Bcl2-Interacting Mediator of cell death*
BiP- *Binding Immunoglobulin Protein*
C/EBP α - *CCAAT/enhancer binding protein alpha*
CCNU - Lomustina
CHOP - *C/EBP-homologous protein*
CREB3L3 - *cAMP responsive element-binding protein 3 like 3*
DDR - Resposta a danos ao DNA (*DNA damage response*)
DR - *Direct reversal*
DSB - Quebras de fita dupla (*Double Strand Break*)
EDEM - *ER degradation- enhancing α -mannosidase-like lectin*
EGFR - *epidermal growth factor receptor*
ER - *Endoplasmic reticulum*
ERAD - *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*
ERO - Espécies reativas de oxigênio
ERSE - *ER-stress Responsive Element*
FEN1 - Flap endonuclease 1
GADD153 - *growth arrest and DNA damage inducible gene 153*
GADD34 - *growth arrest and DNA-damage- inducible 34*
GBM - Glioblastoma
GRP78 - *glucose regulated protein 78*
HERPUD - *Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1*
HIF-1 - *hypoxia inducible factor 1*

HR - *Homologous recombination*
Hsc-70 - *heat shock cognate 70*
HSP - *heat shock protein*
ICL - *Interstrand DNA crosslinks*
IDH1 - *isocitrate dehydrogenase 1*
IRE1 α - *Inositol-Requiring Enzyme α*
ISR - *Integrated Stress Response*
JNK - *c-JUN N-terminal kinase*
KEAP1 - *Kelch-like-ECH- associated protein 1*
LAMP-2A - *proteína de membrana associada ao lisossomo 2A (lysosome- associated membrane protein 2A)*
LAMP3 - *proteína de membrana associada ao lisossomo 3 (lysosome- associated membrane protein 3)*
LP-BER - *Long-patch Base Excision Repair*
MEF - *Mouse embryonic fibroblast*
MGMT- *metilguanina-metiltransferase*
MAPLC3 - *Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)*
MMR – *Mismatch repair*
MMS – *Metil-Metanossulfonato (methyl methanesulfonate)*
MNNG - *1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina*
MNU - *N-metil-N-nitrosourea*
NER - *Nucleotide excision repair*
NF- κ B - *fator nuclear kappa B*
NHEJ - *Nonhomologous end-joining*
NRF2 - *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
eIF2 α - *eukaryotic translation initiator factor-2*
p62/SQSTM1 - *Sequestosome 1*
PAR - *Poly(ADP-ribose)*
PARP - *Poly(ADP-ribose) polymerase*
PBS – *Tampão salino fosfato (Phosphate buffer saline)*
PERK - *Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase*
Pol β - *DNA polymerase β*
PTEN - *phosphate and tensin homologue*
PUMA - *p53 Upregulated Mediator of Apoptosis*

RE – Retículo endoplasmático
RIDD - *Regulated Ire1 Dependent Decay*
RONS - Reactive Oxygen and Nitrogen Species
SP1 - *Site-1 Protease*
SP2 - *Site-2 Protease*
SP-BER - *Short-Patch Base Excision Repair*
SSB - Quebras de fita simples (*Single-Strand Break*)
TG - Tapsigargina
TCGA - *The Cancer Genome Atlas*
TLS – *Translesion synthesis*
TMZ - Temozolomida
TRAF2 - *tumour necrosis factor receptor-associated factor 2*
TN - Tunicamicina
uORFs - *upstream open reading frame*
UPR - *Unfolded Protein Response*
UDG - uracila DNA glicosilase
UV – Luz ultravioleta
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
WHO – Organização mundial da Saúde (*World Health Organization*)
XBP-1 - *X-box binding protein 1*
XBP1s - *X-box binding protein 1 spliced form*
XBP1u - *X-box binding protein 1 unspliced form*
XRCC1 - *X-ray repair cross-complementing protein 1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais lesões ao DNA e vias de reparo utilizadas pela célula para mitigar os efeitos deletérios destas lesões	18
Figura 2. Visão esquemática do reparo por excisão de bases (BER)	23
Figura 3. Estrutura de cristalização da AAG complexada a DNA contendo uma base ϵ -adenine.....	27
Figura 4. Representação esquemática do UPR	34
Figura 5. Enovelamento proteico e ERAD no RE.....	40
Figura 6. Estresse de RE e marcadores tumorais	46
Figura 7. Mecanismos de reparo envolvidos no mecanismo de ação da TMZ: BER, MMR e MGMT.....	54
Figura 8. Hipótese de ativação do UPR reparo dependente.....	155
Figura 9. Níveis de Gpx7 são elevados pelo tratamento com MMS na ausência de AAG.....	158
Figura 10. Modelo de ativação do UPR na determinação do destino celular na presença de estresse no RE.....	161
Figura 11. Modelo esquemático da participação de AAG na sobrevivência.....	163
Figura 12. Modelo representativo da participação de AAG na ativação do UPR em resposta ao estresse no RE.....	169

RESUMO

O genoma é um repositório dinâmico de informações genéticas e está constantemente exposto a agentes endógenos e exógenos. Para manter a fidelidade das informações armazenadas, várias vias de reparo evoluíram, como por exemplo o reparo por excisão de bases (BER), evoluíram. A principal glicosilase do BER, responsável por reparar danos no DNA oriundos de agentes alquilantes, é a alquiladenina DNA glicosilase (AAG). O reparo iniciado pela AAG pode levar ao acúmulo de intermediários citotóxicos. Para investigar os desfechos celulares frente ao dano alquilante, comparou-se a expressão gênica em camundongos deficientes ou proficientes em *Aag*, em resposta ao tratamento com o agente alquilante metil metano sulfonato (MMS). Na análise de redes transcricionais associadas à exposição MMS, identificou-se a expressão dependente de *Aag* de transcritos relacionados a resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*, UPR). Neste trabalho, relatamos o envolvimento da AAG na elicitação do UPR, um mecanismo desencadeado no retículo endoplasmático (RE) para restaurar a proteostase celular, cuja disfunção está implicada em doenças como diabetes, Alzheimer e câncer. A AAG também inicia o BER para danos induzidos por temozolomida (TMZ), sendo fundamental para as respostas celulares à alquilação que afetam a sobrevivência dos pacientes com glioblastoma (GBM). Para explorar o mecanismo subjacente à ativação de UPR induzida por dano alquilante, foram utilizadas linhagens celulares de GBM expressando diferentes níveis de AAG. Observou-se que MMS ativa o UPR em células de GBM, e esta resposta é diminuída na ausência de AAG. AAG é necessária para a ativação de UPR em múltiplos ramos, como evidenciado pela indução da expressão da chaperona BiP pelo agente alquilante e pela ativação do fator de transcrição XBP1, ambas suprimidas em células silenciadas para AAG. Além disso, o UPR mediado por AAG influencia a sobrevivência celular após dano alquilante e indução farmacológica de estresse no RE. O tratamento combinado de salinomicina (SLN), um indutor de estresse de RE, com TMZ resultou na ativação de UPR e citotoxicidade elevada em células proficientes em AAG, enquanto as células deficientes em AAG apresentaram resistência e ativação de UPR reduzida, nas mesmas condições. Para investigar o impacto da modulação dos níveis de AAG e UPR em pacientes com GBM, também realizou-se uma análise de sobrevivência através de gráficos de Kaplan-Meier e do modelo de regressão de Cox. Pacientes com alta expressão de AAG e UPR, apresentaram pior sobrevivência após tratamento com agente alquilante. Embora mais experimentos sejam necessários para caracterizar a natureza da contribuição da AAG para o UPR, demonstrou-se a existência de uma intercomunicação entre a resposta de reparo de DNA e as vias de resposta ao estresse do RE, que pode ser potencialmente relevante em um cenário clínico. É importante ressaltar que estes resultados sugerem uma justificativa para uma nova estratégia terapêutica no tratamento do câncer, combinando agentes alquilantes aos ativadores farmacológicos da UPR. Em conjunto, esses achados revelam um novo papel para o AAG coordenando as respostas celulares aos danos induzidos por agentes alquilantes.

ABSTRACT

The genome is a dynamic store of genetic information and is constantly threatened by endogenous and exogenous agents. To maintain fidelity of the information stored, several repair pathways, such as the Base Excision Repair (BER), have evolved. The main BER glycosylase responsible for repairing alkylation DNA damage is the alkyladenine DNA glycosylase (AAG). Repair initiated by AAG can lead to accumulation of cytotoxic intermediates. To investigate cellular outcomes to alkylation damage, gene expression was compared in mice deficient or proficient in Aag, in response to treatment with the alkylating agent methyl methane sulfonate (MMS). Analysis of transcriptional networks associated with MMS exposure identified an Aag-dependent expression of unfolded protein response (UPR). In this work, we report the involvement of AAG in the elicitation of the UPR, a mechanism triggered in the endoplasmic reticulum (ER) to restore proteostasis in the cell whose dysfunction is implicated in diseases like diabetes, Alzheimer's disease and cancer. AAG initiates BER for temozolomide (TMZ)-induced base damage and is pivotal to the cellular responses of alkylation affecting glioblastoma (GBM) patients overall survival. In order to explore the mechanism underpinning alkylation-induced UPR activation, GBM cell lines expressing different AAG levels were used. MMS triggers the UPR in GBM cells, that is greatly diminished in the absence of AAG. AAG is required for UPR activation on multiple branches as evidenced by the fact that alkylation-induced expression of the chaperone BiP and activation of the transcription factor XBP1, both suppressed in AAG knock down cells. In addition, AAG-mediated UPR influences cell survival upon alkylation and ER stress pharmacological induction. Combination of salinomycin (SLN), an ER stress inducer, and TMZ treatment resulted in UPR activation and increased cytotoxicity in AAG proficient cells, while AAG-deficient cells were resistant and showed impaired UPR activation in the same conditions. To investigate the impact of AAG modulation of UPR in glioblastoma patients we also conducted a survival analyses through Kaplan-Meier plots and Cox regression model. Patients bearing high expression of AAG and UPR genes had a significant worse survival after treatment with alkylating agent. Whereas more experiments are required to characterize the nature of AAG's contribution to the UPR, we demonstrate the existence of crosstalk between the DNA repair response and the ER stress response pathways, that is potentially relevant in a clinical setting. Importantly, our results suggest a rationale for a novel cancer therapeutic strategy combining alkylating agents to pharmacological activators of the UPR. Taken together, these findings uncover a new role for AAG coordinating cellular responses to alkylation-induced damage.

ESTRUTURA DA TESE

A presente tese de doutorado é composta por: uma **Introdução** que apresenta os principais conceitos abordados na parte experimental sendo eles o reparo por excisão de bases, o estresse de retículo endoplasmático e o glioblastoma. Em seguida, são apresentados os seguintes capítulos:

CAPÍTULO I – Desenvolvimento e caracterização das linhagens celulares moduladas para alquil-adenina DNA glicosilase (AAG). Descreve a construção das linhagens de glioblastoma silenciadas e superexpressoras de AAG.

CAPÍTULO II- Artigo original (submetido ao periódico *PNAS*) - *A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress.* Artigo original que caracteriza o envolvimento da AAG na indução da resposta de estresse do retículo endoplasmático frente o tratamento com agente alquilante.

CAPÍTULO III- Artigo original (a ser submetido ao periódico *Oncology Reports*) - *Enhancement of temozolomide cytotoxicity by pharmacological induction of endoplasmic reticulum stress occurs in an AAG-dependent manner.* Explora o papel da AAG na citotoxicidade induzida pela combinação de agentes alquilantes com indutores de estresse de retículo.

CAPÍTULO IV- Avaliação do perfil transcricional de marcadores/alvos da resposta de estresse ao retículo endoplasmático combinados ao reparo de DNA e seu impacto na sobrevivência de pacientes com glioblastoma. Busca integrar o conhecimento dos capítulos anteriores e sua influência no desfecho clínico de pacientes de glioblastoma.

Ao final, uma discussão integrada dos dados obtidos é apresentada, seguida da conclusões e perspectivas geradas a partir dos resultados deste trabalho.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dano e reparo de DNA

A molécula de DNA é responsável pelo armazenamento do conteúdo informacional biológico necessário para a síntese dos demais polímeros celulares (RNA, proteínas, polissacarídeos etc.) e conseqüentemente por determinar as respostas celulares ao ambiente no qual se encontram. Por ser o único polímero celular que não é degradado ou reciclado, torna-se indispensável à célula (MARTEIJN; HOEIJMAKERS; VERMEULEN, 2015; MITCHELL; HOEIJMAKERS; NIEDERNHOFER, 2003).

Numa fração de tempo menor que 30 segundos, irão ocorrer cerca de 10 trilhões de lesões no DNA de um indivíduo (NAGEL; CHAIM; SAMSON, 2014). Tais lesões, diferem de um indivíduo para outro pois resultam da exposição a diferentes fatores exógenos e endógenos. Exemplos de fontes endógenas de danos ao DNA são reações metabólicas que geram espécies reativas de oxigênio (ERO), modificações químicas espontâneas e erros replicativos (MEIRA; BURGIS; SAMSON, 2005; NIEDERNHOFER et al., 2018). Por outro lado, no meio ambiente, fatores como exposição a luz ultravioleta (UV), radiações ionizantes, quimioterapia e agentes químicos como os decorrentes da exposição à poluição do ar e fumaça do cigarro podem agir sobre a estrutura do DNA (DIDERICH; ALANAZI; HOEIJMAKERS, 2011).

A exposição aos fatores acima citados torna o DNA suscetível a modificações em sua sequência e composição química. Embora estas alterações sejam vantajosas no processo adaptativo do ponto de vista evolutivo, estas também apresentam risco potencial quando acontecem de forma descontrolada e em excesso, servindo como ponto de partida para diferentes patologias, incluindo o processo tumorigênico (CAMPBELL; MARTINOCORENA; CAMPBELL, 2015; MEIRA; BURGIS; SAMSON, 2005). Dada a necessidade de manter a estabilidade genômica para transmissão da informação genética, durante o processo evolutivo diversos mecanismos foram desenvolvidos para corrigir estas lesões, permitindo-nos conviver com esses insultos e

prosseguir com a vida no ambiente (BAUER; CORBETT; DOETSCH, 2015; EISEN; HANAWALT, 1999).

A DDR (*DNA damage response*) é composta por um conjunto de proteínas e processos que tem como objetivo a detecção, sinalização e o reparo dos danos no DNA, a regulação do ciclo celular e ativação de vias de morte ou senescência celular, permitindo a manutenção da integridade genômica e impedindo que o DNA danificado seja propagado para as células filhas (MALAQUIN et al., 2015).

O processo de reparo do DNA comporta uma gama de vias que incluem mecanismos altamente regulados. Nestas vias proteínas que atuam sozinhas ou em conjunto, frequentemente sobrepostas e interconectadas a outros processos celulares, garantem que diferentes tipos de lesões sejam corrigidas (ERASIMUS et al., 2016; KROKAN; KAVLI; SLUPPHAUG, 2004).

Além de mecanismos de reparo reversão direta (*direct reversal, DR*) como por exemplo o reparo de lesões O^6 -metilguanina pela O^6 -metilguanina DNA metiltransferase (MGMT), pelo menos seis principais vias de reparo de DNA atuam em mamíferos para manter a estabilidade genômica (Figura 1). O reparo de bases mal emparelhadas (*mismatch repair, MMR*) resolve, além das bases mal emparelhadas, a inserção e deleção errônea de nucleotídeos. O reparo por excisão de bases (*base excision repair, BER*) repara lesões que alteram bases discretamente e algumas vezes quebras de fita simples, enquanto o reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair, NER*) atua removendo lesões que distorcem a dupla fita de DNA, como os fotoprodutos gerados por luz UV. Para resolução de quebras duplas, dois mecanismos podem ser empregados: o reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination, HR*) realiza o reparo de quebras duplas durante a replicação e a junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end-joining, NHEJ*) que resolve lesões de quebra dupla na ausência de uma fita molde como em G1. O mecanismo de tolerância de danos via translesão (*Translesion Synthesis, TLS*) utiliza DNA polimerases de baixa fidelidade e permite a replicação sobre fitas moldes

danificadas. Por fim, a via de Fanconi (*Fanconi Anemia Pathway*) que atua na sinalização e reparo de danos, principalmente nos danos tipo pontes intercadeias no DNA (ICLs) (ABBOTTS; THOMPSON; MADHUSUDAN, 2014; HOEIJMAKERS, 2009; NAGEL; CHAIM; SAMSON, 2014).

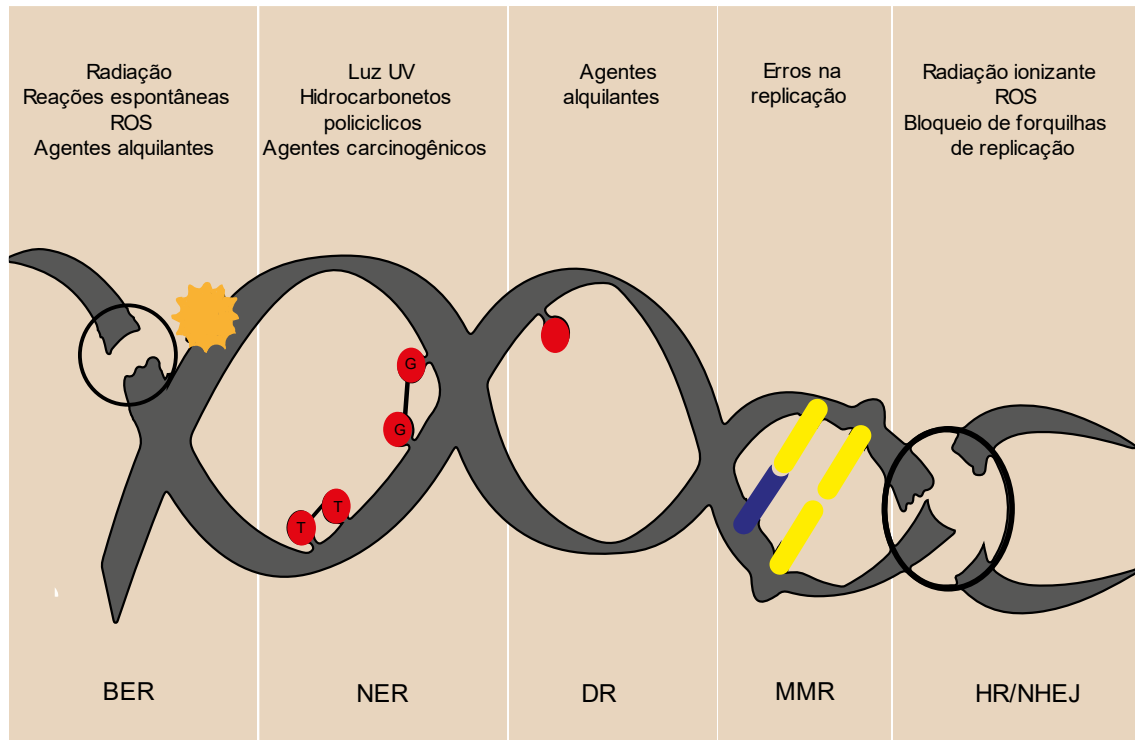


Figura 1. Principais lesões ao DNA e vias de reparo utilizadas pela célula para mitigar os efeitos destas lesões. BER, base excision repair; DR, direct repair; GG-NER; HR, homologous recombination; MMR, mismatch repair; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, non-homologous end joining; UV, luz ultravioleta; ROS, Reactive oxygen species. Adaptado de (POSTEL-VINAY et al., 2012)

1.1.1. Reparo por excisões de bases (*base excision repair, BER*)

O reparo por excisão de bases (BER) é o principal mecanismo atuante no reparo de bases danificadas que não distorcem a dupla hélice do DNA e que podem ser originadas por reações de oxidação, desaminação e alquilação (KROKAN; BJØRÅS, 2013). Esta via, altamente conservada de bactérias a humanos, tem início com o reconhecimento da base modificada por uma DNA glicosilase específica que cliva a ligação N-glicosídica entre a base e a deoxirribose, gerando um sítio abásico (DIZDAROGLU; COSKUN; JARUGA, 2017). Este sítio abásico será então processado permitindo a síntese e a ligação do DNA. Pelo menos 11 glicosilases humanas já

foram descritas, estas apresentam uma ampla especificidade de substrato que podem se sobrepor tornando o BER redundante e, pela variedade de lesões reconhecidas, uma via extremamente útil (MAYNARD et al., 2008; MENONI et al., 2017).

1.1.2. Lesões reconhecidas pelo BER

1.1.2.1. Lesões oxidativas

Originadas tanto pelo metabolismo fisiológico e patológico, em processos de fosforilação oxidativa e inflamação, como por fontes externas como radiação e agentes radiomiméticos, as espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (RONS) são uma das maiores promotoras de dano ao DNA (SEDELNIKOVA et al., 2010; WANG, 2008).

Destacam-se entre as espécies reativas os radicais de superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^{\cdot}) (KEHRER; KLOTZ, 2015). Exemplos de produtos oxidativos mutagênicos e citotóxicos são 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoG), formamido pirimidinas e timina-glicóis (MIRIAM SALVADOR, 2005; ROSZKOWSKI, 2014). Além das modificações de bases, o estresse oxidativo pode levar à eventos recombinacionais e a letalidade através da formação de quebras simples e duplas no DNA (MEIRA; BURGIS; SAMSON, 2005; SEDELNIKOVA et al., 2010).

1.1.2.2. Bases desaminadas

Das quatro bases do DNA, três podem sofrer a perda de um grupamento amina exocíclico ou intraciclo num processo denominado desaminação espontânea. Com a perda da molécula de amina, hipoxantina é originada da adenina, uracila da citosina e xantina e oxanina da guanina (BAUER; CORBETT; DOETSCH, 2015; FRIEDBERG et al., 2006). 5-metilcitosina, derivado natural da citocina pode gerar timina levando ao pareamento errôneo T:G. Consideradas uma das maiores fontes de lesões mutagênicas, a desaminação resulta em transições A:T para G:C no pareamento de hipoxantina com citosina e C:G para T:A quando uracila pareia com adenina (KIM; WILSON, 2012).

1.1.2.3. Lesões alquilantes

A alquilação é definida como o mecanismo pelo qual compostos químicos transferem grupamentos alquil (metil e etil) à moléculas biológicas como DNA, RNA e proteínas, alterando a estrutura e potencialmente a função destas macromoléculas (FU; CALVO; SAMSON, 2012). A exposição aos agentes alquilantes é inevitável, uma vez que estes estão amplamente presentes no ambiente em que vivemos. Exemplos de algumas fontes externas destes agentes são: aditivos alimentares, poluentes como fumaça do cigarro e produtos de combustão; enquanto internamente subprodutos de danos oxidativos, ou de reações metabólicas como S-adenosil metionina, além do processo inflamatório podem produzir danos alquilantes (DRABLØS et al., 2004; KLAPACZ et al., 2016).

As lesões causadas pelos agentes alquilantes podem bloquear a DNA polimerase, sendo citotóxicos ou ainda causam mal emparelhamento durante a replicação sendo considerados mutagênicos. Justamente a toxicidade desta classe de compostos, colocou-os entre os primeiros agentes anti-tumorais utilizadas, sendo empregados na quimioterapia em diferentes tipos de câncer até os dias atuais (BORDIN et al., 2013; HURLEY, 2002; KLAPACZ et al., 2016).

Os principais alvos dos agentes alquilantes são posições N⁷ e O⁶ da guanina, outros sítios também sofrem metilação dependendo do mecanismo de ação do agente alquilante. Agentes alquilantes do tipo S_N1, como por exemplo MNNG (N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina) e MNU (1-Metil-1-Nitrosourea), atacam anéis de nitrogênio e grupos extracíclicos de oxigênio, enquanto agentes S_N2, como MMS (Metil metano sulfonato), atacam majoritariamente o nitrogênio (BORDIN et al., 2013; FU; CALVO; SAMSON, 2012). Estes compostos também podem ser classificados como mono- ou bifuncionais, caso possuam, um ou dois grupos químicos reativos que modificam o DNA em um único sítio ou podem ligar dois sítios fitas formando ligações inter- e intracadeias (BORDIN et al., 2013).

Apesar de cerca de 70% das lesões alquilantes no DNA serem na N⁷-metilguanina (7meG), estas não representam potencial citotóxico ou mutagênico. No entanto, quando sofrem depurinação espontânea ou processamento por uma DNA glicosilase formam sítios apurínicos/apirimidínicos que são tóxicos e mutagênicos. N³-metil-adenina (3meA) representa de 10-20% das lesões alquilantes, ao contrário da primeira, esta lesão é altamente citotóxica uma vez que é capaz de inibir a síntese de DNA por sua habilidade de bloquear DNA polimerases (DRABLØS et al., 2004; FU; CALVO; SAMSON, 2012). Bem menos frequente que as anteriores, O⁶-metilguanina (O⁶meG) provoca a maior parte dos efeitos citotóxicos e mutagênicos dos agentes alquilantes por permitir o emparelhamento errôneo com a timina durante a replicação celular (FU; CALVO; SAMSON, 2012).

1.1.3. Reparo de lesões alquilantes no DNA

As três principais vias para o reparo do DNA alquilado são: BER, demetilação direta por O⁶-metilguanina DNA metil transferase (MGMT) e pelos membros da família AlkB (Revisto em SOLL; SOBOL; MOSAMMAPARAST, 2017).

O BER envolve uma sequência de reações enzimáticas altamente coordenadas (FU; CALVO; SAMSON, 2012; SOLL; SOBOL; MOSAMMAPARAST, 2017), onde após o reconhecimento inicial e a retirada da base modificada por uma DNA glicosilase monofuncional, ocorre a formação de um sítio AP e então o recrutamento de uma AP endonuclease para resolver este sítio. AP endonucleases, como APE1, clivam o esqueleto fosfodiéster na posição 5' do sítio AP gerando uma quebra simples flanqueada por um 3' hidroxil-nucleotido (3'-OH) e um terminal 5' fosfato deoxiribose (5'-dRP), substratos adequados para ação da polimerase β (Pol β) (KIM; WILSON, 2012; WALLACE, 2014).

No caso de uma DNA glicosilase bifuncional, a atividade AP-liase destas gera os resíduos α,β -aldeído insaturado (PUA) e 3'P. Após a β -eliminação, APE1 remove o

α,β -aldeído insaturado deixando um grupamento 3'OH, enquanto o 3'P da $\beta\delta$ -eliminação, é removido pela atividade de fosfatase da PNKP (*polynucleotide kinase phosphatase*). Após ação da APE1, o resíduo 5'dRP que bloqueia a replicação e a transcrição é removido pela atividade de liase da Pol β . Esta polimerase também substitui o nucleotídeo danificado removido pela APE1 através da síntese do DNA adicionando uma base intacta. Em seguida, a ligase I ou o complexo formado pela XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) e a DNA ligase III selam a lacuna completando o reparo (Revisado em WHITAKER et al., 2017).

O BER pode acontecer por duas subvias diferentes, SP-BER (*short-patch BER*) ou o LP-BER (*long-patch BER*), como representado na figura 2. No modelo da via curta (SP-BER), o mais comum, a Pol β usa o 3'P como um substrato para incorporar o nucleotídeo correto na lacuna deixada pela APE1 usando a outra fita como molde, e sucessivamente uma DNA ligase realiza a integração as fitas. Já na via longa, cerca de 2 a 12 nucleotídeos são sintetizados pela polimerase, o que cria uma aba (*flap*) de fita simples pelo deslocamento da fita não molde e que requer a ação de uma endonuclease específica, a FEN1 (*flap endonuclease 1*), para resolução e posterior ação de uma DNA ligase. A via LP-BER é dependente de PCNA, que pode acompanhar tanto Pol β como as polimerases replicativas Pol ϵ/δ para o alongamento da extremidade 3'OH (DIANOV; HÜBSCHER, 2013; PARSONS; DIANOV, 2013).

O reparo iniciado por glicosilases monofuncionais pode continuar tanto por SP-BER como LP-BER, enquanto a ação de glicosilases bifuncionais geralmente ocorre por SP-BER (DOGLIOTTI et al., 2001, KIM; WILSON, 2012). No entanto, a forma precisa pela qual uma via é escolhida em detrimento da outra ainda não foi completamente elucidada. Alguns estudos sugerem que a presença prolongada da ligase no DNA ao encontrar alguma dificuldade em selar o primeiro nucleotídeo incorporado pode estimular o início do LP-BER, tanto com auxílio de XRCC1 como pela troca pelas polimerases δ/ϵ (PETERMANN; KEIL; OEI, 2006; KIM; WILSON,

2012). Outros fatores como a o estado energético e proliferativo da célula, a disponibilidade enzimática e o tipo de lesão também parecem estar relacionados à determinação do mecanismo escolhido (BRENERMAN et al., 2014; KROKAN; BJØRÅS, 2013).

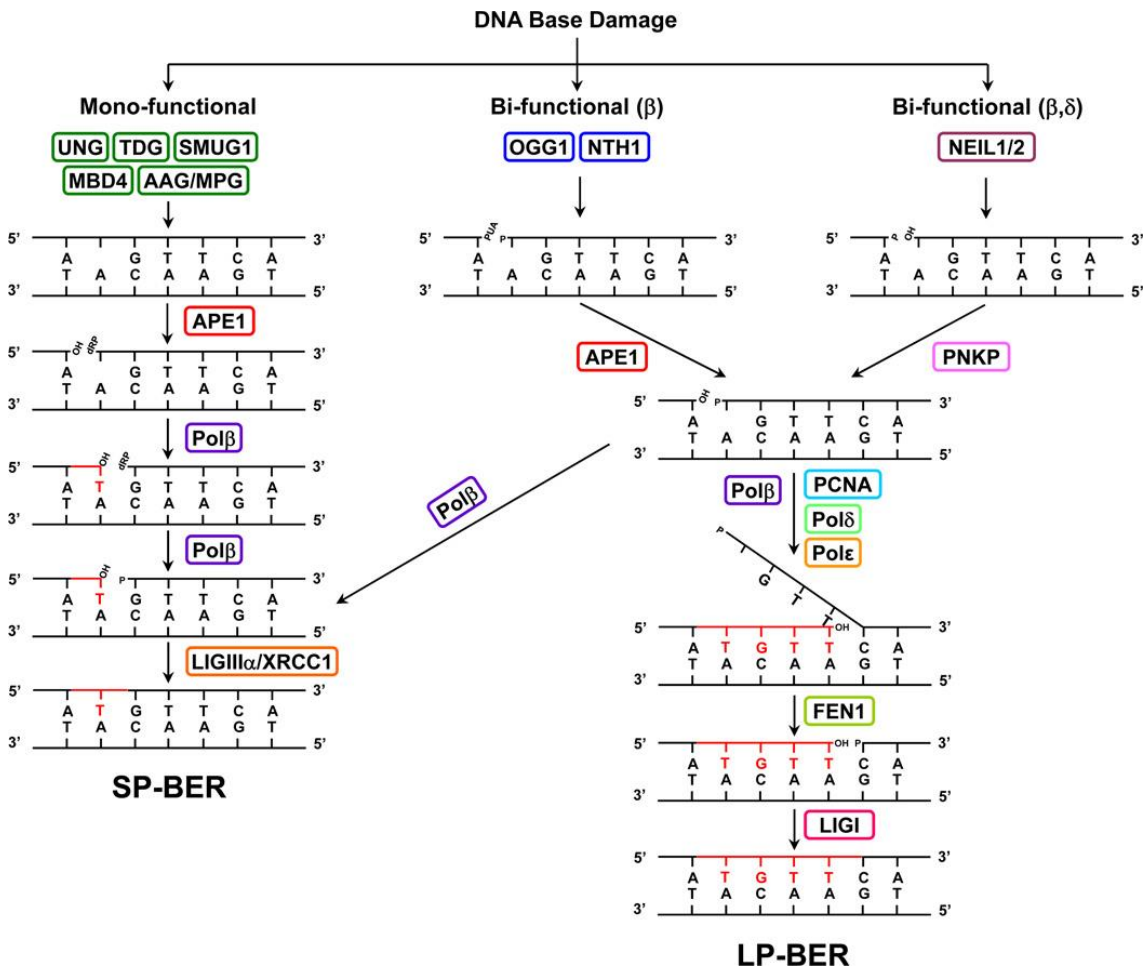


Figura 2. Visão esquemática do reparo por excisão de bases (BER). DNA glicosilases reconhecem a base danificada e produzem um sítio sem base (AP). Após este passo enzimático, uma AP endonuclease incide o sítio AP em 5' e a síntese de DNA substitui um único nucleotídeo (short patch) ou diversos nucleotídeos (long patch). O grupamento 5'-dRP pode ser processado pelo sítio liase no SP-BER ou pela ação da FEN1 no LP-BER. A ligação ocorre através da ação de uma DNA ligase que completa o BER (KIM; WILSON, 2012).

XRCC1 e PARP1 (*Poly (ADP-ribose) Polymerase 1*), são duas proteínas acessórias conhecidas pelo seu papel auxiliar/importante no BER. Apesar de não apresentar papel enzimático identificado, XRCC1 funciona como um arcabouço molecular direcionando a estruturação de vários fatores enzimáticos necessários ao BER. Além de ligar-se ao DNA incisado através do seu domínio N-terminal, XRCC1

interage fisicamente com várias proteínas do BER como: diferentes DNA glicosilases, DNA polimerase β , APE1, ligase III e PNPK (CALDECOTT, 2008; WHITAKER et al., 2017). Outro alvo de interação física com XRCC1 é PARP1, uma proteína nuclear sensora de quebras no DNA. Através do processo de parilação, PARP1 catalisa a partir de NAD⁺ a formação de polímeros poli (ADP-ribosil) (PAR) que permitem o recrutamento de outras proteínas de reparo incluindo XRCC1 e DNA Pol β para o local de quebra do DNA, e pela carga negativa dos polímeros PARP1 é liberado do DNA (JUBIN et al., 2016).

1.1.4. DNA glicosilases

Considerando o grande espectro de lesões reconhecidas pelo BER, é apropriado assumir que diferentes enzimas de reparo realizam o processamento destas lesões. De fato, as 11 diferentes DNA glicosilases identificadas em mamíferos atuam removendo uma variedade de lesões no DNA, sendo classificadas em 4 superfamílias: uracila DNA glicosilases (UDGs), *helix-hairpin-helix* (HhH) glicosilases, alquil-adenina DNA glicosilase (MPG/AAG), e *endonuclease VIII-like* (NEIL) (JACOBS; SCHÄR, 2012). Cada uma destas enzimas reconhece um substrato específico, mas podem reconhecer mais de um tipo de dano, da mesma forma que mais de uma glicosilase é capaz de reconhecer o mesmo tipo de dano.

Embora apresentem diversidade estrutural, um mecanismo comum a todas as DNA glicosilases, denominado inversão de base (*base flipping*), desloca a base danificada parcialmente para uma posição extra helical antes da sua remoção completa (YANG; GARCIA; HE, 2009). Desta forma, a enzima dobra a estrutura do DNA na posição da base danificada, achatando e alargando o sulco menor do DNA até que a base danificada seja liberada da dupla hélice e entre no sítio de ligação da enzima formando o complexo proteína-substrato quando o substrato adequado é reconhecido (KIM; WILSON, 2012). Como resultado do reconhecimento de uma base

danificada, ocorre a clivagem da ligação N-glicosídica e a produção de um sítio AP (DODSON; LLOYD, 2002).

DNA glicosilases podem ser classificadas em mono- e bifuncionais de acordo com duas atividades específicas. As monofuncionais, como AAG (alquil-adenina DNA glicosilase) e UDG (uracil DNA glicosilases), hidrolisam a ligação glicosídica resultando em um sítio AP, já as bifuncionais, como NTH1 (*nth endonuclease III-like*), OGG1 (oxoguanina DNA glicosilase) e NEIL (*endonuclease VIII-like*), possuem atividade de liase associada (Figura 2). As glicosilases bifuncionais incidem no sítio AP para gerar uma quebra simples por dois mecanismos: o primeiro por β -eliminação gerando um α,β -aldeído insaturado (PUA), e o segundo por $\beta\delta$ -eliminação formando um grupamento fosfato associado a região 3' da quebra (PO_4). Ambos requerem um processamento para posterior ação da polimerase (PARSONS; DIANOV, 2013; WALLACE, 2014).

Ao contrário de outras vias de reparo de DNA, até o momento deficiências no BER não foram associadas a nenhuma síndrome em humanos. Apesar da ausência de fenótipo específico relacionado a disrupção de DNA glicosilases, a deficiência destas enzimas leva a altas taxas de mutagenicidade e suscetibilidade ao câncer (LARSEN et al., 2007). A importância do BER pode ser vista no aumento da sensibilidade à agentes alquilantes observada na deficiência de elementos a jusante às glicosilases (FU; CALVO; SAMSON, 2012).

1.1.5. Alquiladenina DNA Glicosilase/Metilpurina DNA Glicosilase (AAG/MPG)

Uma das exceções de conservação durante o processo evolutivo das DNA glicosilases é a alquil-adenina DNA glicosilase (AAG), também conhecida como metil-purina DNA glicosilase (MPG) ou ainda alquil-purina DNA glicosilase (ANPG), presente em mamíferos e que não apresenta homólogo procaríoto. Em humanos, esta é a única

DNA glicosilase que realiza a remoção de lesões de bases alquiladas, apresentando uma ampla especificidade de substrato e sendo capaz de reconhecer e excisar lesões como: 3-MeA, 7-MeA, 3MeG, 7-MeG, 3-MeG, N⁶-metiladenina (m⁶A), e 1,N⁶-etenoadenina (KIM; WILSON, 2012).

A estrutura da AAG apresenta um único domínio e é composta por sete α -hélices e oito folhas β (Figura 3) (HOLLIS; LAU; ELLENBERGER, 2000; LAU et al., 1998; SETSER et al., 2012). Uma folha β -antiparalela forma o núcleo com um β *hairpin* que se insere na volta menor, enquanto as α -hélices e as alças conectoras completam a interface de ligação ao DNA. A base metilada é então excisada pelo mecanismo de “*flip out*”, no qual a base danificada é direcionada para dentro do sítio ativo da enzima (KROKAN; BJØRÅS, 2013; SLUPPHAUG et al., 1996).

O modelo de reconhecimento da lesão parece empregar um método processivo, no qual uma conformação de baixa afinidade permite o translocamento da AAG através de deslizamento e rotação ao longo do eixo do DNA, e até mesmo saltos entre as fitas a fim de evitar proteínas fortemente ligadas ao DNA (HEDGLIN; O'BRIEN, 2008, 2010). O substrato deslocado para fora do eixo é empilhado entre as Tyr127, His136 e Tyr159 da AAG, formando uma protusão contendo a Tyr162 que ocupa a posição vazia entre as bases 3' e 5'. Evidências sugerem que a clivagem da ligação glicosídica pela AAG requer um aminoácido ácido para protonar as bases neutras que então são excisadas, após a ativação de uma molécula de água que age como um nucleófilo e um segundo resíduo de aminoácido básico (HOLLIS; LAU; ELLENBERGER, 2000).

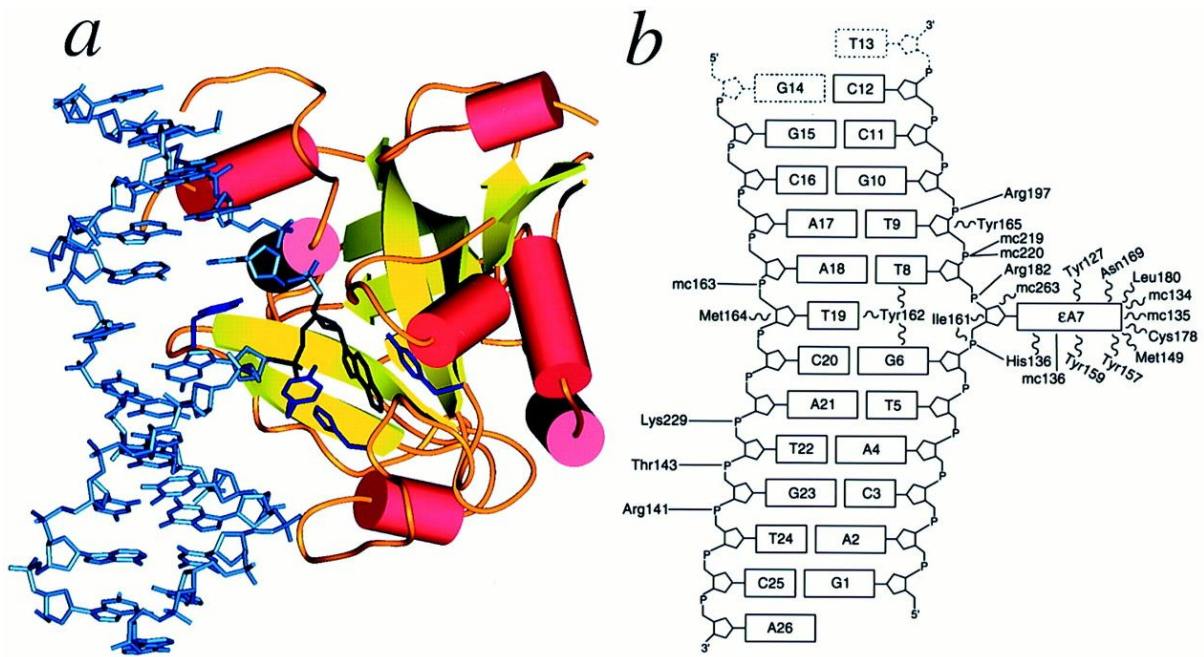


Figura 3. Estrutura de cristalização da AAG complexada a DNA contendo uma base ϵ -adenina. a) A base modificada ϵ A (preto) é girada/torcida para fora da dupla fita de DNA em direção ao sítio ativo da enzima. Uma molécula de água ataca a ligação N-glicosídica no sítio ativo para liberar a base. b) Diagrama dos contatos entre AAG e ϵ A-DNA. A base modificada (ϵ A7) participa em diferentes interações com o sítio ativo da enzima (LAU et al., 1998)(HOLLIS; LAU; ELLENBERGER, 2000).

Pelo menos três filtros de especificidade são associados a ação de reconhecimento da AAG. O primeiro é a etapa de girar o nucleotídeo para fora da fita, quanto maior a distorção que base danificada causa na estrutura do DNA menor a barreira cinética para sua externalização (WOLFE; O'BRIEN, 2009). Outro mecanismo ocorre pela catálise ácida que permite a excisão apenas de purinas, pela ausência de interações estáveis com as pirimidinas (BISWAS et al., 2002). Ainda, A e G quando não danificadas colidem no sítio catalítico prevenindo a sua remoção inadequada (CONNOR; WYATT, 2002). Por último, as ligações glicosídicas de bases N3 e N7 alquiladas são enfraquecidas necessitando menos energia de ativação (HEDGLIN; O'BRIEN, 2008).

1.1.6. Fenótipos associados à AAG e ao desequilíbrio do BER

Apesar de ter o mecanismo de ação e substratos conhecidos, não há um desfecho fenotípico definido resultante da deficiência no reparo mediado pela AAG. Em diferentes contextos e tipos celulares, a ausência de AAG teve o impacto de

sensibilizar ao dano alquilante (ELDER et al., 1998; ENGELWARD et al., 1997). Por outro lado, a atividade desta enzima também foi importante na proteção contra a carcinogênese colorretal em modelos animais (CALVO et al., 2012; MEIRA et al., 2008).

Como esperado para uma enzima atuante no reparo de DNA, a AAG apresenta importante efeito protetor, mitigando o efeito tóxico de agentes alquilantes *in vitro* e *in vivo* (BARBIN et al., 2003; ENGELWARD et al., 1996; HAM et al., 2004), combatendo a inflamação crônica (CALVO et al., 2012; MEIRA et al., 2008), e participando no reparo de lesões induzidas por psoraleno (MAOR-SHOSHANI et al., 2008).

No entanto, a proteção contra o dano alquilante proporcionada pela AAG parece ser contexto específico, uma vez que em alguns cenários a atividade desta enzima parece ter efeitos deletérios. Em ensaios utilizando células mielóides de animais *Aag*^{-/-}, estas foram mais resistentes ao tratamento com agentes alquilantes quando comparados as células dos animais proficientes, indicando pela primeira vez que a inicialização do BER pela *Aag* poderia ser mais letal à célula do que as bases danificadas não reparadas (ROTH; SAMSON, 2002). Adicionalmente, a ausência de *Aag* também parece proteger as células β -pancreáticas de animais expostos à estreptozotocina, um agente alquilante seletivo para células β que induz necrose e diabetes tipo 1 em animais proficientes no BER (BURNS; GOLD, 2006).

Um exemplo claro da particular ação de AAG é o estudo de MEIRA et al. (2009), utilizando camundongos com diferentes genótipos: *Aag* *WT* (*wild type*), *Aag*^{-/-}, *Aag*^{+/-} e *Aag* superexpressor transgênico. Neste trabalho, os autores observaram que a morte celular induzida pelo tratamento com MMS acompanhava o número de cópias e a expressão de *Aag*, e que especificamente células da camada externa nuclear da retina eram afetadas pelo processo degenerativo, enquanto as células adjacentes permaneciam intactas. Danos teciduais causados por agentes alquilantes também ocorreram de forma *Aag*-dependente em células granulares do cerebelo, timócitos,

esplenócitos, células β -pancreáticas e células da medula óssea, enquanto tal resposta foi suprimida em animais deficientes em *Aag* (CALVO et al., 2013). Além disso, tecidos como rim, fígado e cérebro também foram protegidos do dano tecidual e da morte celular causada por agentes alquilantes e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio derivadas de uma condição de isquemia e reperfusão (EBRAHIMKHANI et al., 2014).

Na presença de danos excessivos ao DNA, o acúmulo de intermediários tóxicos, como sítios AP, 5'-dRPs e SSBs não reparados pode resultar em citotoxicidade uma vez iniciado o BER. O acúmulo de SSBs resulta na hiperativação de *Parp1* (CALVO et al., 2013; EBRAHIMKHANI et al., 2014), que por sua vez causa um aumento dramático no consumo de NAD⁺ e ATP levando a falha energética que por fim culmina em morte celular por necrose programada, também conhecida como partanatos e que é mediada pelos polímeros PAR (DAVID et al., 2009; EBRAHIMKHANI et al., 2014; VANDENABEELE et al., 2010). Neste caso, a superativação do reparo de DNA resulta em um desequilíbrio entre o reconhecimento das bases danificadas e a finalização do reparo, tendo como desfecho final a morte celular. Esse envolvimento da *Parp1* na morte celular resultante da exposição a um agente alquilante, foi demonstrado pela proteção de células fotorreceptoras da retina deficientes em *Parp1* frente a toxicidade induzida pelo MMS e mediada pela *Aag* (CALVO et al., 2013). Este conceito de desequilíbrio no BER explica a resistência à agentes alquilantes observada em alguns tipos celulares deficientes em *Aag*, em decorrência da inabilidade destes de desencadear o BER evitando a citotoxicidade.

A desregulação de vias de reparo de DNA pode ser tanto um fator contribuinte para o desenvolvimento e progressão do processo tumorigênico, como pode conferir resistência aos tratamentos que visam a eliminação desta doença, como a quimio- e a radioterapia (NICKOLOFF et al., 2017). Neste cenário, a mediação de AAG na toxicidade dos agentes alquilantes surge como uma estratégia interessante para a sensibilização de células tumorais e redução do risco de mutagênese e toxicidade que podem acometer tecidos normais (PAIK et al., 2005).

Tendo como racional o desequilíbrio do BER pelo excesso de formação dos intermediários tóxicos (FU; CALVO; SAMSON, 2012; KLAPACZ et al., 2010; MEIRA et al., 2009), a superexpressão de AAG isolada ou associada a outras modulações foi capaz de sensibilizar células tumorais de mama, ovário e glioblastoma (GBM) (FISHEL et al., 2007; GOELLNER et al., 2011; RINNE et al., 2005; TANG et al., 2011).

Contudo, na ausência desta glicosilase também se observou o aumento de sensibilidade frente a agentes alquilantes em estudos envolvendo carcinoma de ovário e glioblastoma (AGNIHOTRI et al., 2012; IYER et al., 2013; PAIK et al., 2005), provavelmente pelo acúmulo de lesões não reparadas, como N3-meA, que resultam no bloqueio da replicação e morte celular. A atividade suprimida de AAG em diferentes linhagens de GBM aumentou a sensibilidade ao agente alquilante metil-lexitropsina (Me-Lex), que produz predominantemente 3-meA, contribuindo evidências para a letalidade desta lesão quando não reparada (BOBOLA et al., 2007).

No estudo de AGNIHOTRI et al. (2012), a expressão isolada de AAG foi capaz de aumentar a resistência de células de GBM à temozolomida (TMZ) acompanhada da redução das lesões 7-meG, enquanto o silenciamento da AAG endógena aumentou citotoxicidade frente ao MMS e a TMZ. Ainda, a expressão combinada de AAG e MGMT apresentou resistência mais elevada, sugerindo uma contribuição independente das duas enzimas a resistência. Sustentando o papel da AAG na resistência à TMZ, os mesmos autores foram capazes de associar a ausência de AAG, em xenoenxertos de GBM humano e em células A172 variantes implantadas em animais *nude*, com uma sobrevivência significativamente mais longa após tratamento com TMZ (AGNIHOTRI et al., 2012). Adicionalmente, o bloqueio da atividade de AAG foi capaz de aumentar a sensibilidade frente a radiação γ em células deficientes em MMR e deficientes ou não em MGMT (BOBOLA et al., 2010).

Além de servir como um alvo para o tratamento do câncer, alguns autores estabelecem uma associação entre os níveis de expressão de AAG e a agressividade do tumor, incluindo gliomas malignos (LIU et al., 2012; ZAÏR et al., 2013). A alta

expressão desta glicosilase já foi descrita em diferentes tipos tumorais como mama, pulmão, adenocarcinoma de ovário e gliomas (CERDA et al., 1998; LEITNER-DAGAN et al., 2012; LIU et al., 2012; ZÄIR et al., 2013). Esta elevação de AAG acompanha o processo de gliomagenese (KIM et al., 2003; LIU et al., 2012; TANG et al., 2011), onde os níveis desta enzima são maiores em relação ao tecido cerebral adjacente e a sua expressão é inversamente associada a sobrevivência dos pacientes de GBM tratados com TMZ e radioterapia concomitantemente (AGNIHOTRI et al., 2012; BOBOLA et al., 2012; STUPP et al., 2009).

Parte da variabilidade observada no desfecho da modulação de AAG pode ser respondida pelo estado proliferativo da célula, tipo específico de tecido, tipo de lesão além do compartimento celular onde ocorre o desequilíbrio do BER, uma vez que AAG também está presente na mitocôndria (FISHEL et al., 2003; HARRISON et al., 2007; VAN LOON; SAMSON, 2013).

Na tentativa de melhor caracterizar os diversos desfechos associados a modulação de AAG na resposta ao tratamento alquilante, comparou-se o perfil transcricional induzido por MMS em fígados de animais *Aag*^{-/-} e WT. Uma robusta resposta transcricional induzida por este agente alquilante e dependente do reparo de DNA iniciado pela *Aag* foi observada com pouca sobreposição entre os genótipos. A análise destes dados, discutidos no Capítulo II, sugere que a atividade de *Aag* parece ser necessária para a ativação transcricional de genes associados ao estresse de retículo endoplasmático (RE). O conjunto dessas observações nos levaram a hipotetizar a participação, até então desconhecida de *Aag*, nas vias de estresse do RE.

1.2. Estresse do reticulo endoplasmático

O reticulo endoplasmático (RE) é a organela com maior reservatório de cálcio celular, responsável por realizar modificações pós-traducionais, pela biogênese de

lipídeos, produção de membranas celulares e pelo enovelamento de 30% do proteoma eucariótico (HETZ, 2012).

No lúmen do RE as cadeias polipeptídicas de proteínas nascentes assumem sua forma nativa, conformação na qual apresentam estrutura tridimensional específica, num processo denominado enovelamento proteico. Nesta organela, o processamento proteico se desenvolve com a formação de pontes dissulfetos, a clivagem de sequências sinal, a glicosilação e a conjugação lipídica, tais modificações dependem do ambiente do RE para terem como resultado final o enovelamento adequado (MALHOTRA; KAUFMAN, 2007). Chaperonas como BiP (*binding immunoglobulin protein*) e Calnexina/Calreticulina, realizam a vigilância no RE inspecionando proteínas recém sintetizadas, permitindo que apenas aquelas com enovelamento correto deixem o RE (WANG et al., 2018).

Na ausência de um estímulo estressor, as proteínas sensoras do RE encontram-se em um estado inativo associadas à BiP, também conhecida como GRP78 (*glucose regulated protein 78*), a principal chaperona residente no RE que pertence à família das proteínas *heat-shock* (HSP; *heat shock protein*). Em situações de estresse do RE, no entanto, BiP no seu papel de chaperona é direcionada para auxiliar no enovelamento proteico, desligando-se das proteínas sinalizadoras do RE (BERTOLOTTI et al., 2000).

Na presença de estímulos que alterem a homeostasia do RE, como por exemplo alterações nos níveis de cálcio, privação de nutrientes, estresse oxidativo, hipóxia e infecção por patógenos (WANG; KAUFMAN, 2016), a capacidade de enovelamento proteico é comprometida levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas prejudiciais à função celular, gerando o processo caracterizado por estresse de RE (WANG; KAUFMAN, 2014).

Dada a exposição a estes diferentes insultos, uma complexa resposta para resolver e restaurar a homeostasia proteica evoluiu, na qual três proteínas sensoras denominadas IRE1 α (*Inositol requiring enzyme 1 α*), ATF6 (*Activating transcription factor 6*) e PERK (*Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase*), são ativadas num mecanismo conhecido como resposta a proteínas mal enoveladas ou UPR (*unfolded protein response*) (ALMANZA et al., 2018) (Figura 4). Em síntese, quando ativada, a UPR atua reduzindo a tradução proteica, aumentando a capacidade de enovelamento (*folding*) e ativando processos de degradação proteica, como por exemplo pela via proteossômica no mecanismo denominado ERAD (*ER-associated protein degradation*). Entretanto, na falha desses mecanismos adaptativos processos de morte celular são então ativados (RON; WALTER, 2007).

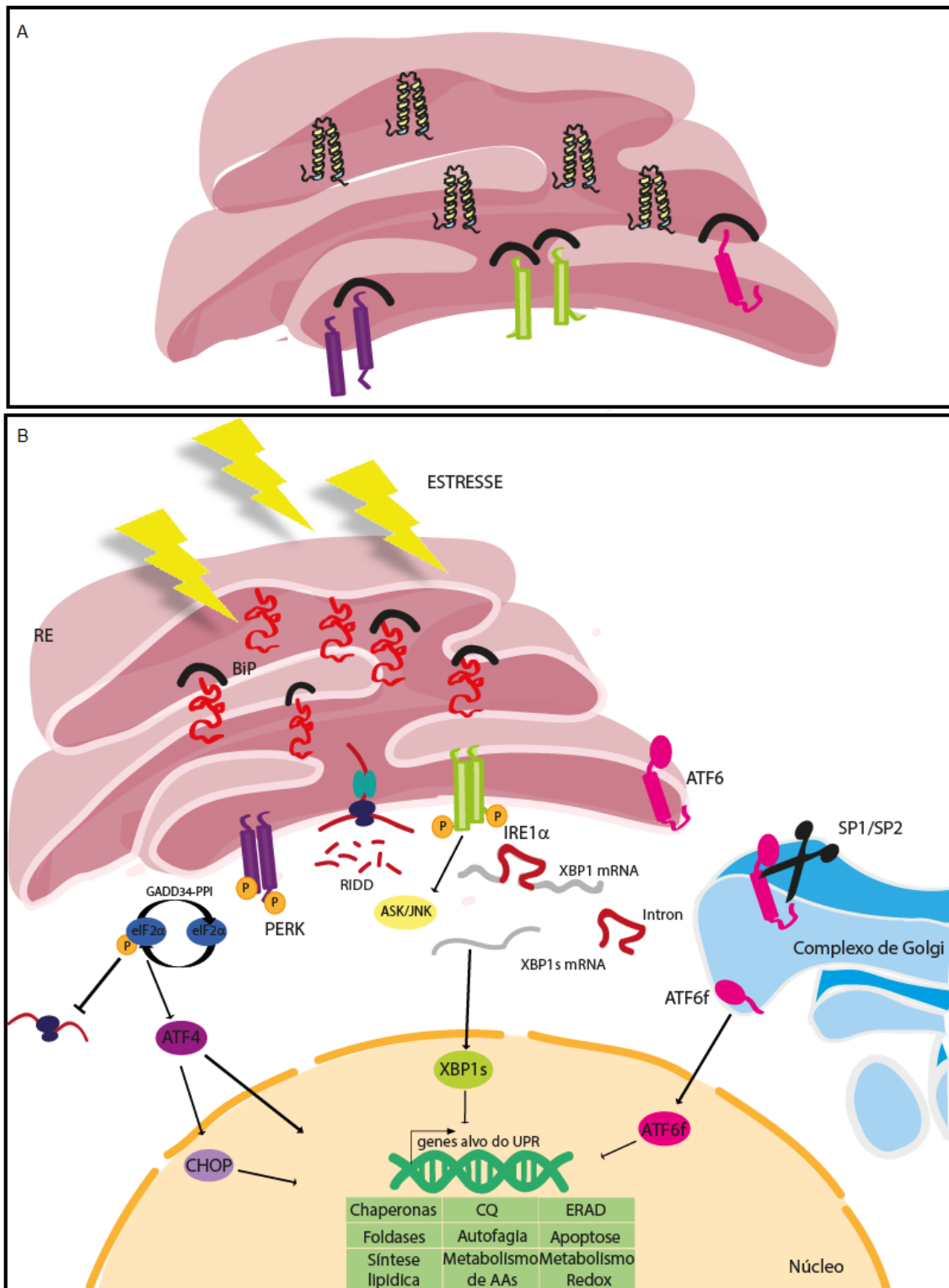


Figura 4. Representação esquemática do UPR. **A)** Em condições de homeostasia no RE, BiP está associado as proteínas sensoras PERK, IRE1 α e ATF6, inativando-as. **B)** Na presença de estresse no RE, a chaperona BiP desliga-se das proteínas sensoras para auxiliar no dobramento de proteínas mal enoveladas, permitindo a ativação de PERK, IRE1 α e ATF6 e a transdução de sinais do citoplasma para o núcleo para a restauração da capacidade de enovelamento por diferentes vias. A ativação de PERK atenua a síntese proteica de forma geral através da fosforilação de eIF2 α . eIF2 α fosforilado permite a tradução seletiva de ATF4 um fator de transcrição envolvido na expressão de genes da resposta antioxidante, no

metabolismo de aminoácidos (AAs), autofagia e apoptose. ATF4 controla a expressão do componente pro-apoptótico CHOP. GADD34 e PP1 atuam na desfosforilação de eIF2 α . A atividade de RNase da IRE1 α processa o mRNA que codifica de XBP1. Isto leva a expressão de fator de transcrição XBP1s que regula um conjunto de genes alvos do UPR relacionados ao envelhecimento proteico, ao ERAD, ao controle de qualidade (QC) e a biogênese de organelas. IRE1 α também degrada mRNA selecionados num processo denominado RIDD (IRE1-dependent decay). Ainda, IRE1 α ativa JNK/ASK1. ATF6 é localizada no RE em condições basais e codifica no seu domínio citosólico um fator de transcrição bZIP. Na presença de estresse no RE, ATF6 é translocado para o complexo de Golgi onde é processado por proteases S1P e S2P liberando seu domínio citosólico (ATF6f) que controla a regulação de genes alvos do UPR.

1.2.1. IRE1 α

IRE1 α é uma proteína transmembrana de tipo I que possui domínios de serina/treonina quinase e endoribonuclease (RNase). Uma vez desligada de Bip, IRE α oligomeriza-se e se autofosforila o que promove uma mudança conformacional e ativa sua função de endonuclease com o qual realizará um processamento (*splicing*) alternativo não convencional removendo 26nt do mRNA de XBP-1 (*X-box binding protein 1*). O processamento gera XBP1s (XBP1s, *spliced form*), um fator de transcrição ativo e estável, que atua regulando a expressão de genes relacionados ao envelhecimento proteico, ao controle de qualidade do envelhecimento e ao processo de ERAD (HETZ; PAPA, 2018). Além disso, XBP1 também atua na regulação de genes envolvidos no metabolismo celular, na síntese lipídica, no reparo de DNA e no controle da sobrevivência (ALMANZA et al., 2018). Apesar da forma não processada de XBP1 (XBP1u, *unspliced form*) não ter atividade na expressão gênica devido à ausência do domínio de transativação, alguns trabalhos reportam que XBP1u recruta seu próprio mRNA para a membrana do RE e pode regular negativamente a atividade transcricional de XBP1s (ALMANZA et al., 2018).

A fosforilação do domínio quinase da IRE1 α recruta TRAF2 (*tumour necrosis factor receptor-associated factor 2*) e ativa a sinalização de JNK (*c-JUN N-terminal kinase*) promovendo autofagia ou apoptose através da ativação de caspase 12 ou NF- κ B (CASTILLO et al., 2011; NGUYÊN et al., 2004).

Através do seu domínio de endonuclease e de forma independente de XBP1, IRE1 α é capaz de degradar RNAs associados ao RE, em um mecanismo denominado RIDD (*Regulated Ire1 Dependent Decay*) (HOLLIEN; WEISSMAN, 2006). Na indução do estresse do RE, o processo de RIDD é ativado para reduzir a carga proteica através clivagem de RNAs com uma sequência consenso (5'-CUGCAG-3') e estrutura de alça pela IRE1, e posterior degradação por exorribonucleases (HAN et al., 2009; OIKAWA et al., 2010). Além da atividade durante o estresse, recentemente demonstrou-se que RIDD apresenta-se ativo de forma moderada também em condições basais, tendo uma importante função na regulação dos processos metabólicos, apoptóticos e inflamatórios (MAUREL et al., 2014).

1.2.2. PERK

PERK (*PRKR-Like Endoplasmic Reticulum Kinase*), assim como IRE1 α , é uma proteína transmembrana de tipo I e também ativa sua função de quinase quando oligomerizada e autofosforilada após a liberação de BiP (BERTOLOTTI A, 2000). Depois de sua ativação, PERK fosforila e inibe o fator 2 de início de tradução, eIF2 α (*eukaryotic translation initiator factor-2*), o que resulta na repressão geral da síntese de proteínas, reduzindo o volume proteico que entra no RE da célula sob estresse (WALTER; RON, 2011). Especificamente, PERK permite a tradução do fator de transcrição ATF4 (*activating transcription factor 4*), cujo transcrito contém uma uORFs (*upstream open reading frame*) normalmente não traduzida de forma eficiente. A fosforilação de eIF2 α , modifica a eficiência de tradução do códon de iniciação AUG, resultando na síntese mais eficiente de ATF4 (RON; WALTER, 2007).

ATF4, por sua vez, é responsável pela regulação de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, na resposta antioxidante, na homeostase proteica e na macroautofagia (HARDING et al., 2000, 2003). No entanto, se a ativação de PERK for mantida na presença de um estresse constante, a ativação de ATF4 contribuirá para

uma resposta pró-morte celular através da ligação no promotor de CHOP/GADD153 (*C/EBP-homologous protein/ growth arrest and DNA damage inducible gene 153*) (HARDING et al., 2000). CHOP atua como uma proteína pró-apoptótica inibindo a expressão do gene codificante pro-sobrevivência de BCL-2 e aumentando a expressão de membros pro-apoptóticos da família BCL-2 como por exemplo BIM (*Bcl2-Interacting Mediator of cell death*) e PUMA (*p53 Upregulated Mediator of Apoptosis*) (URRA et al., 2013).

Outro alvo de ATF4 e CHOP, é GADD34 (*growth arrest and DNA-damage-inducible 34*), que atua desfosforilando eIF2 α , retomando a síntese proteica (HETZ, 2012). Contudo, apesar de representar um sinal para recuperação do estresse, tal mecanismo pode aumentar a proteotoxicidade pela formação de ERO decorrente do influxo de proteínas recém sintetizadas (URRA et al., 2013). Desta forma, pela ação de GADD34, ATF4 e CHOP em mecanismos de morte celular, parada do ciclo celular e senescência, a fosforilação de eIF2 α parece exercer o equilíbrio entre os mecanismos de morte e sobrevivência celular (ALMANZA et al., 2018).

O fator de transcrição NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) é um segundo alvo de fosforilação de PERK em condições de estresse, em que sua fosforilação provoca a dissociação de KEAP1 (*Kelch-like-ECH-associated protein 1*) e permite que NRF2 acumule e seja translocado para o núcleo para ativar genes que possuem um elemento de resposta antioxidante (*antioxidant response element, ARE*) (DIGALEH; KIAEI; KHODAGHOLI, 2013). Entre os alvos de NRF2 estão genes que aumentam a capacidade antioxidante e detoxificante celular como por exemplo: tireodoxinas (TXNRD1), sulfiredoxina (SRXN1), hemoxigenase-1 (HMOX1), NAD(P)H quinona oxi-doredutase 1 (NQO1), glutamato cisteína ligase subunidades catalítica/modificadora (GCLC/GCLM), e glutationa-S-transferases (GSTs) (JARAMILLO; ZHANG, 2013).

1.2.3. ATF6

ATF6, é também uma proteína transmembrana que possui em seu domínio citosólico um fator de transcrição pertencente à família bZIP. Sua ativação, após o desligamento de BiP, se dá através de seu deslocamento para o complexo de Golgi, onde é clivada pelas proteases SP1 (*Site-1 Protease*) e SP2 (*Site-2 Protease*) liberando o domínio citosólico de ATF6 (ATF6f, *de fragment*) (HETZ, 2012; WANG; KAUFMAN, 2014). ATF6f é então, translocado para o núcleo onde atua como fator de transcrição ativando a transcrição de XBP1, BiP, HERPUD (*Homocysteine Inducible ER Protein With Ubiquitin Like Domain 1*- homólogo de Mif1 *S. cerevisiae*), uma proteína relacionada ao ERAD e a homeostase do cálcio, além de outras proteínas associadas ao processo de degradação ERAD (KOKAME; KATO; MIYATA, 2001; VAN LAAR et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2007; YOSHIDA et al., 2001).

Adicionalmente, o papel de ATF6 no controle da expressão gênica também acontece pela associação de ATF6 com outros membros bZIP, como por exemplo, CREB (*cAMP responsive element-binding protein*), CREB3L3 (*cAMP responsive element-binding protein 3 like 3*), XBP1, entre outros (ALMANZA et al., 2018).

1.2.4. ERAD (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*)

Em um processo de controle de qualidade, o RE retém proteínas com enovelamento inadequado até que estas adquiram a conformação correta para serem secretadas à sua localização designada. Se a conformação apropriada não for atingida, proteínas mal enoveladas serão encaminhadas para o processo de degradação proteossomal (ERAD, Figura 4) (VEMBAR; BRODSKY, 2008).

Através de translocons, proteínas recém-sintetizadas são dirigidas para o lúmen do RE para enovelamento proteico com auxílio da associação de uma chaperona como BiP (MCCAFFREY; BRAAKMAN, 2016). A cadeia polipeptídica nascente recebe então um oligossacarídeo precursor (GlcNAc₂-Man₉-Glc₃) e resíduos

de glicose são removidos através de glicosidasas do RE, permitindo que as chaperonas calnexina e calreticulina realizem o reconhecimento (GUTIÉRREZ; SIMMEN, 2018). Uma vez que os resíduos de glicose são removidos, estas duas chaperonas são desligadas e a proteína nativa com enovelamento adequado é liberada do RE para prosseguir a via secretória (ELLGAARD; HELENIUS, 2003; MCCAFFREY; BRAAKMAN, 2016). As proteínas parcialmente enoveladas por sua vez, podem sofrer re-glicosilação através da UDP-glicose glicotransferase, em um ciclo que é repetido até que a forma nativa seja alcançada ou proteínas lecitinas do processo ERAD as reconheçam como mal enoveladas irreversíveis (MCCAFFREY; BRAAKMAN, 2016). Manosidasas do RE atuam removendo de 3 a 4 resíduos de manoses marcando/identificando estas proteínas mal enoveladas para o processo de degradação via ERAD (VEMBAR; BRODSKY, 2008).

Desta forma, com o reconhecimento pelas chaperonas das proteínas mal enoveladas sinalizadas pela manosidase I inicia-se o ERAD, onde estas proteínas serão direcionadas para regiões específicas da membrana do RE e transportadas pela membrana, do lúmen para o citoplasma. O substrato a ser degradado recebe polímeros de ubiquitina catalisados pelas ubiquitinas ligase E3 que se encontram na membrana do RE (WANG et al., 2018), permitindo que a ATPase citosólica p97 associada à co-fatores, remova-o da membrana do RE e direcione o substrato para degradação no proteassoma 26S (MCCAFFREY; BRAAKMAN, 2016; VEMBAR; BRODSKY, 2008).

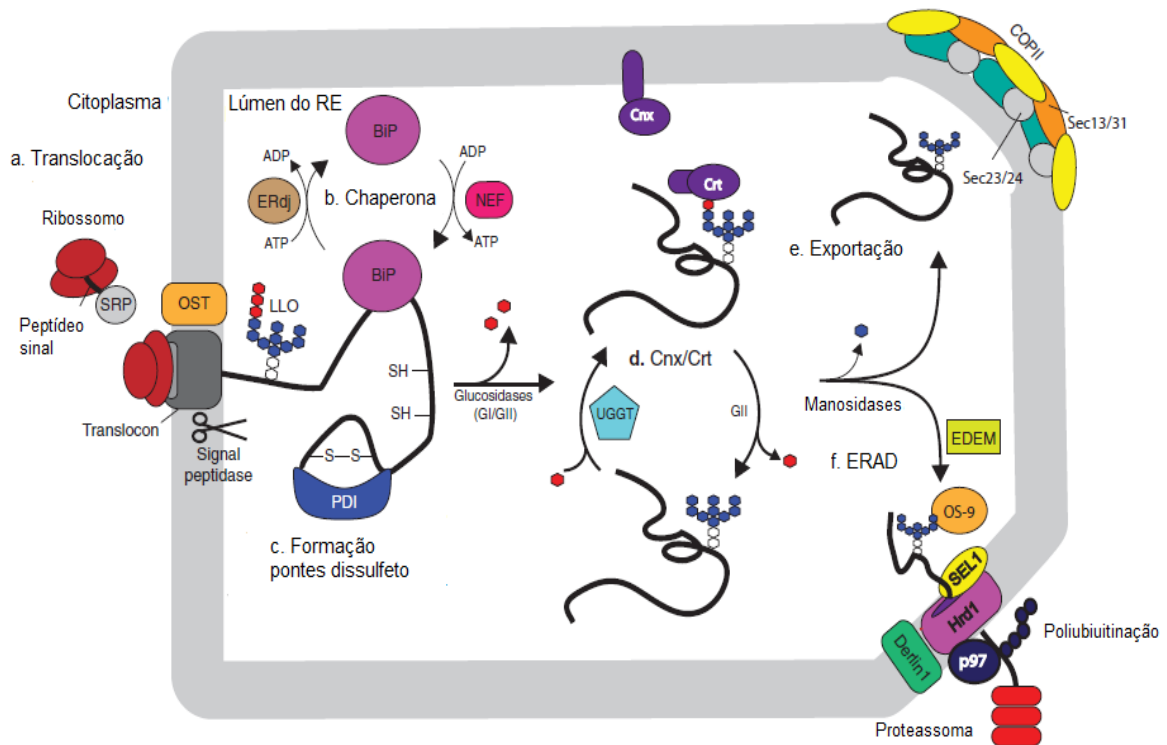


Figura 5. Enovelamento proteico e ERAD no RE. a) Translocação. Proteínas que precisam ser direcionadas ao RE possuem sequências de sinalização que serão reconhecidas por uma SRP (signal recognition particle), que as direciona para o translocon do RE na saída do ribossomo. O peptídeo nascente ao deixar o translocon recebe a adição de LLO (*lipid-linked oligosaccharide*), contendo N-acetilglicosamina (GlcNAc2; branco), manose (Man9; azul) e glicose (Glc3; vermelho), catalisada pela OST (*oligosaccharyltransferase*). b) Chaperonas. BiP liga-se as cadeias nascentes de forma ATP-dependente e auxiliada por ERdjs (*ER-residentDNAJ protein*) e NEFs (*nucleotide-exchange factors*). c) Formação de pontes dissulfeto. PDI (*protein disulfide-isomerase*) catalisa a formação das pontes dissulfetos essencial para o enovelamento de várias proteínas. d) Cnx/Crt. Resíduos de glicose são removidos pelas glicosidases I e II (GI e GII), resultando no substrato para as chaperonas calnexina (Cnx) e calreticulina (Crt). A remoção do resíduo de glicose terminal desliga o peptídeo do ciclo Cnx/Crt. Proteínas parcialmente enoveladas podem ser re-glicosiladas por uma UGGT (*UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase*) facilitando outro ciclo de enovelamento Cnx/Crt. e) Exportação. Proteínas enoveladas adequadamente são liberadas do RE e englobadas em vesículas COPII (*coatamer protein II*) para transporte do Golgi. f) ERAD. Proteínas terminalmente mal enoveladas são deslocadas através da membrana do RE e direcionadas para degradação pelo sistema citosólico ubiquina-proteassoma. EDEM (*ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*). (Adaptado de MCCAFFREY; BRAAKMAN, 2016)

Os três ramos do UPR estão envolvidos na ativação de componentes do ERAD, como por exemplo EDEM (*ER degradation- enhancing α -mannosidase-like lectin*) que reconhece proteínas mal dobradas e realiza a retrotranslocação do RE para degradação e é regulada através de IRE1 α (OLIVARI; MOLINARI, 2007) e HERPUD que atua recrutando o proteassoma 26S para a membrana do RE e é ativado por ATF4, ATF6 e NRF2 (MA; HENDERSHOT, 2004)

Na presença de um estresse de RE crônico ou severo, vias de morte celular são ativadas na tentativa de eliminar as células comprometidas através da indução transcricional de GADD153/CHOP, ativação de JNK e caspase 12 (FAITOVA et al., 2006). Em condições normais, CHOP está localizado no citoplasma celular, porém na presença de um estímulo estressor seus níveis são elevados, permitindo o seu acúmulo no núcleo, que pode levar à parada do ciclo celular e a apoptose (JAUHAINEN et al., 2012; OYADOMARI; MORI, 2004). A transcrição de CHOP pode ser induzida pelas três proteínas sensoras do UPR, sendo a via de PERK/eIF2 α dominante por meio de ATF4. O envolvimento de CHOP em vias de morte celular pode ocorrer pelo impedimento da ativação de Bcl-2 e NF κ B, permitindo que a mitocôndria receba os efeitos pró-apoptóticos das proteínas BH3-*only*. Outro mecanismo pelo qual CHOP pode regular apoptose é através de interação proteína-proteína, uma vez que esta pertence à família de proteínas C/EBPa (CCAAT/*enhancer binding protein alpha*), a qual interage com as quinases CDK2 e CDK4, inativando-as e promovendo efeito antiproliferativo (ALMANZA et al., 2018; MCCULLOUGH et al., 2001; OYADOMARI; MORI, 2004; WANG et al., 2001).

O estresse de RE também desencadeia a resposta de morte celular regulada pela ativação de JNK. TRAF2, recrutado por IRE1 α , ativa as vias de JNK e p38 através de ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) (HETZ, 2012; URANO et al., 2000). JNK quando ativada, inibe Bcl-2 por fosforilação impedindo a sua atividade anti-apoptótica e o controle da saída de Ca²⁺ do RE, enquanto que a fosforilação de Bax e Bim desencadeia os efeitos pró-apoptóticos (ALMANZA et al., 2018). Adicionalmente, TRAF2 ativa a caspase 12 através de clivagem e formação do complexo IRE1-TRAF2-caspase 12 (GARCÍA DE LA CADENA; MASSIEU, 2016; YONEDA et al., 2001). Entretanto, durante o estresse de RE, a liberação de Ca²⁺ do RE para o citoplasma, permite que este seja absorvido pela mitocôndria promovendo apoptose independentemente do UPR (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000).

1.2.5. Estresse de RE e autofagia

Apesar da ativação clássica de UPR, o estresse de RE também pode desencadear o processo autofágico (CORAZZARI et al., 2017). A autofagia, é o processo catabólico no qual a célula usa a maquinaria lisossomal para digerir o seu conteúdo citoplasmático composto por organelas danificadas, supérfluas e proteínas mal enoveladas (CUERVO, 2008).

Existem três principais formas de autofagia descritas: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Microautofagia refere-se ao englobamento de componentes celulares diretamente pelos lisossomos. Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas alvo são translocadas através da membrana lisossômica em um complexo com proteínas chaperonas tais como Hsc-70 (*heat shock cognate 70*), que quando associadas são reconhecidas por um receptor de membrana lisossômica LAMP-2A (proteína de membrana associada ao lisossomo 2A), resultando na degradação (OKU; SAKAI, 2018).

A forma mais comum de autofagia é a macroautofagia, onde os componentes celulares são envoltos em uma dupla membrana lipídica, denominada autofagossomo, e entregues aos lisossomos para degradação (OKU; SAKAI, 2018; VELLAI et al., 2009). Na etapa de iniciação, ocorre a síntese de uma estrutura de membrana dupla denominada fagóforo. A nucleação, regulada por PI3K de classe II em conjunto com Beclina-1, produz PIP3 e resulta no recrutamento de WIPI/Atg18 e consequentemente LC3 (*light chain of the microtubule-associated protein 1*) que permite a formação do autofagossomo. Estes processos são seguidos pela maturação, onde LC3-I é então conjugada à fosfatidiletanolamida, gerando a forma lipidada, LC3-II, que recruta lipídios para expandir a membrana do autofagossomo (KROEMER; MARIÑO; LEVINE, 2010). Proteínas adaptadores, como por exemplo p62/SQSTM1 (*Sequestosome 1*) e NBR1, recrutam os componentes a serem degradados para o autofagossomo, assim este poderá se fundir com o lisossomo formando um autolisossomo ácido. Então,

através de enzimas lisossômicas um processo de reciclagem degrada o material sequestrado e devolve ao citoplasma os produtos da degradação para serem reutilizados (TOOZE; YOSHIMORI, 2010). Aqui, o termo autofagia será utilizado como sinônimo de macroautofagia, exceto quando explicitado.

Diversos estímulos são capazes de desencadear o processo autofágico como por exemplo a escassez de nutrientes na célula, o estresse de RE, hipóxia, infecções, estresse oxidativo, e dano ao DNA (BORDIN et al., 2013; SRIDHAR et al., 2012). Alguns destes fatores são comuns ao desenvolvimento tumoral, como por exemplo, a privação de nutrientes e oxigênio. É neste cenário que a autofagia contribui na proliferação do tumor, proporcionando a demanda metabólica necessária através da reciclagem dos componentes celulares. Apesar disso, hipóteses sugerem que o mecanismo autofágico pode também levar a morte celular através da digestão exacerbada de proteínas, indução de vias apoptóticas ou ainda pela degradação de elementos citoprotetores (ONORATI et al., 2018; VESSONI et al., 2013). Desta forma, tanto a autofagia como o UPR, são mecanismos celulares que a intensidade e a duração dos estímulos definem a participação destas vias na promoção de sobrevivência ou morte celular.

No contexto do UPR, PERK e/ou IRE1 α podem desencadear o processo autofágico. Quando ativado o eixo PERK, ocorre elevação dos níveis de Atg12 que atua convertendo LC3-I em LC3II (KOUROKU et al., 2007; WANG; KAUFMAN, 2016). A ativação de IRE1 α , por sua vez, resulta na liberação de Beclina-1 através da fosforilação e inibição de Bcl-2 por JNK permitindo a autofagia (SONG et al., 2017). Independentemente do UPR, o estresse de RE é capaz de induzir a via PI3K de classe II necessária à indução de autofagia pelo cálcio liberado pelo RE (LIU et al., 2007).

Na presença de condições adversas a sobrevivência, a autofagia e o UPR cooperam tanto na modulação de vias adaptativas que permitem a sobrevivência, como na indução de morte celular (CORAZZARI et al., 2017). Este conceito, serve de embasamento para o desenvolvimento de terapias que busquem a modulação destas

respostas impedindo a adaptação ao ambiente hostil ou promovendo estresse excessivo que culmine em morte celular (HEALY et al., 2009; TAMEIRE; VERGINADIS; KOUMENIS, 2015). Vários fármacos antitumorais ativam vias de resposta ao estresse de forma secundária ao seu mecanismo de ação, portanto o estudo da combinação de fármacos clássicos com estes agentes indutores de estresse devem ser realizado com cautela (Revisado em SUH et al., 2012). Além disso, a estreita relação entre os processos de autofagia e a resposta de estresse no RE pode prejudicar a resposta terapêutica, uma vez que uma intervenção no UPR pode acarretar numa resposta autofágica citoprotetora e não na morte celular.

1.2.6. O UPR no câncer

As perturbações do ambiente celular no contexto de um tumor em desenvolvimento são um desafio constante para a manutenção da homeostasia celular, o que leva a ativação de uma série de mecanismos adaptativos que permitem a progressão tumoral (AVRIL; VAULÉON; CHEVET, 2017).

Características do crescimento tumoral como formação de regiões hipóxicas, deprivação de nutrientes e acidose podem desencadear o estresse de RE (DUFÉY; URRÁ, 2015). Da mesma forma, a proliferação exacerbada e descontrolada dos tumores requer o aumento da síntese proteica, excedendo a capacidade de enovelamento e levando ao estresse do RE (LUO; LEE, 2013). Além do papel adaptativo durante o desenvolvimento tumoral, existem indícios da participação de fatores de transcrição integrantes do UPR na reprogramação da expressão gênica neste processo (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2015).

Adicionalmente, entre os fatores que alteram a proteostase na célula tumoral também podem ser incluídos o desbalanço redox, a frequência de mutações e a instabilidade genômica (URRÁ et al., 2016). Assim, na última década foi consolidado o papel do UPR no desenvolvimento do câncer e na resistência a terapia, emergindo como um potencial alvo para o tratamento do câncer (OBACZ et al., 2017).

A ativação constitutiva de diferentes componentes do UPR é relacionada a aspectos centrais da biologia tumoral, como por exemplo: sobrevivência e adaptação ao estresse, transformação celular, dormência, angiogênese, imunogenicidade, instabilidade genômica, metástase, metabolismo e resistência ao tratamento (URRA et al., 2016). Alguns exemplos desta associação com os marcadores do câncer são resumidos na tabela 1 e representados na Figura 6.

Tabela 1. Exemplos da associação do UPR com marcadores do câncer.

<i>Marcadores do câncer</i>	<i>Componente e efeito</i>	<i>Referência</i>
Angiogênese	XBP1 e ATF4 - controle da expressão de VEGF (<i>Vascular endothelial growth factor</i>), um importante fator pró-angiogênico;	(BINET; SAPIEHA, 2015; CHEN et al., 2014)
Resposta Imunológica	XBP1 - formação e sobrevivência de células dendríticas, acelerando a progressão tumoral; CHOP - elevado em tumores infiltrativos com função imunomodulatória;	(CUBILLOS-RUIZ et al., 2015; THEVENOT et al., 2014)
Dormência e resistência terapêutica	ATF6 - constitutivamente ativo em células dormentes, presente em tumores recorrentes e associado a pior prognóstico; IRE1α/XBP1/PERK - regulação ciclina D1, possível correlação com a dormência tumoral; PERK/eIF2α - resistência de células dormentes à terapia;	(BREWER; DIEHL, 2000; LIN et al., 2007; RANGANATHAN et al., 2006; SCHEWE; AGUIRRE-GHISO, 2008; THORPE; SCHWARZE, 2010)
Instabilidade genômica	PERK e IRE1α - deficiência associada ao aumento da instabilidade genômica; estresse de RE leva ao estresse oxidativo gerando danos ao DNA;	(ACOSTA-ALVEAR et al., 2007; BOBROVNIKOVA-MARJON et al.,

	XBP1 - regula um cluster de genes de reparo; Deficiência em ATM ou p53 desencadeia estresse de RE;	2010; DIOUFA et al., 2012; FAROOQI et al., 2015; HE et al., 2009; HENRY et al., 2010)
Metástase e Invasão	ATF4 - ativação de LAMP3 (lysosome-associated membrane protein 3), importante fator regulado por hipóxia e associado a metástase; ATF4 - metástase e invasão através de metaloproteases; IRE1α - adesão e migração; XBP1s – metástase.	(AUF et al., 2010; CHEN et al., 2014; MUJCIC et al., 2013; NAGELKERKE et al., 2013)



Figura 6. Estresse de RE e marcadores tumorais. Características adquiridas pelas células tumorais permitem a progressão tumoral. O UPR está relacionado a maioria destes marcadores do câncer. ATF6 é associado principalmente a metástase e dormência, enquanto IRE1a está envolvido com a maioria das características exceto a dormência tumoral. Sugere-se que PERK participe em processos relacionados ao crescimento e a progressão tumoral (Adaptado de URRÁ et al., 2016)).

A expressão elevada de BiP foi identificada em diferentes tipos tumorais, incluindo mama, cérebro, pulmão, pele, onde participa prevenindo a indução de apoptose em decorrência do estresse no RE (WANG; KAUFMAN, 2016). Além disso, altos níveis de BiP também foram associados com a malignidade e proliferação acelerada dos tumores (LUO; LEE, 2013). Em células de glioma, a redução dos níveis desta chaperona foi capaz de inibir o desenvolvimento tumoral e aumentar a indução de apoptose na presença de quimioterapia com agente alquilante, sendo considerado um biomarcador da progressão tumoral (PYRKO et al., 2007) .

Outro exemplo do envolvimento de fatores do UPR em processos que permitem a progressão tumoral são mutações em IRE1 α encontradas em tumores, potencialmente envolvidas no processo tumorigênico, na angiogênese e na inflamação pró-tumorigênica (OBACZ et al., 2017). XBP1s, por sua vez, toma parte no desenvolvimento tumoral pela formação de um complexo transcricional com HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*) em condições de baixos níveis de oxigênio, regulando a expressão de diferentes genes associados a agressividade do tumor como VEGFA, PDK1 e GLUT1 (CHEN et al., 2014). Além disso, o eixo IRE1 α -XBP1 também é implicado na progressão tumoral e associado a uma piora na sobrevida dos pacientes de diferentes tumores incluindo glioblastoma (PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016; URRÁ et al., 2016).

Exemplos de envolvimento do eixo da PERK no desenvolvimento tumoral incluem a elevada expressão de ATF4 em amostras tumorais, que quando silenciada resulta no aumento da apoptose (SINGLETON; HARRIS, 2012). No mesmo eixo, PERK e ATF4 regulam a expressão VEGF promovendo a angiogênese, além da “stemness” celular (OBACZ et al., 2017). A ativação deste eixo também é associada a dormência tumoral, aos processos de invasão e metástase, além da resistência à terapia (DUFÉY; URRÁ, 2015).

Dados referentes ao envolvimento de ATF6 no desenvolvimento tumoral são mais escassos, mas alguns trabalhos demonstram que este é necessário para a adaptação à estresses nutricionais e pode estar envolvido na proliferação celular e na sensibilidade à quimioterapia (Revisado em OBACZ et al., 2017).

Pelo envolvimento dos diferentes eixos do UPR no processo tumoral e na resistência a quimioterapia, interferir com os componentes desta via surge como uma estratégia atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (CORAZZARI et al., 2017). Neste sentido, duas principais abordagens têm sido exploradas: uma que busca a indução exacerbada do estresse de RE de forma que a célula tumoral não consiga superar e acabe desencadeando a morte celular e a outra, na qual redução da capacidade adaptativa destas células, acaba levando conseqüentemente à morte das células tumorais (OJHA; AMARAVADI, 2017).

Inibidores dos três braços do UPR foram desenvolvidos (Conforme revisões, OBACZ et al., 2017; WANG et al., 2018), com a proposta de induzirem diretamente a morte do tumor ou sensibilizarem às células a tratamentos já existentes. Uma das estratégias para o tratamento de tumores resistentes como o glioblastoma, é a combinação de diferentes ativadores do estresse de RE com outros agentes quimioterápicos (Revisado em PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016). Em glioblastoma, por exemplo, o inibidor de proteassoma bortezomibe em conjunto com celecoxibe, inibidor seletivo da ciclooxigenase 2 (COX-2) que causa estresse no RE pelo vazamento de cálcio do RE para o citoplasma, aumentou os níveis de apoptose através da ativação de UPR por CHOP e JNK (KARDOSH et al., 2008). Em outro estudo, a combinação de salinomicina (um agente ionofóro indutor de estresse de RE) com temozolomida levou a um aumento de morte celular através da regulação de proteínas envolvidas no reparo de DNA (XIPELL et al., 2016).

1.3. Glioblastoma multiforme (GBM)

O glioblastoma multiforme (GBM, glioma grau IV) origina-se de células da zona subventricular do sistema nervoso central (SNC) e representa o tipo mais comum de tumor primário de cérebro na vida adulta (46,6%) (LEE et al., 2018b; OSTROM et al., 2016).

Considerados um dos mais agressivos, estes tumores apresentam pouca responsividade aos tratamentos convencionais, uma vez que sua capacidade de infiltração os torna difíceis de ressecção completa acarretando em altas taxas de recorrência (ALPHANDÉRY, 2018; VELIZ et al., 2015). Em vista disso, a sobrevida média dos pacientes é de cerca 18 meses com apenas 10% dos pacientes atingindo uma sobrevida de 5 anos (DI CARLO et al., 2017).

A incidência dos GBM nos Estados Unidos é de 3–4/100,000, com uma taxa de mortalidade anual de 15.000 casos (DE ROBLES et al., 2015; LIEBERMAN, 2017). No Brasil, a estimativa de incidência de câncer do SNC para o biênio 2018-2019 é de 5,62 novos casos para cada 100 mil homens e 5,62 para cada 100 mil mulheres, totalizando 11.320 novos casos (ISBN 978-85-7318-361-0). Com envelhecimento populacional e a introdução de novas tecnologias diagnósticas de imagem constata-se um aumento da incidência e mortalidade de 5% na população acima de 65 anos e uma taxa de incidência de 17,5 casos de GBM a cada 100 mil pessoas/ano nesta faixa etária (JEMAL et al., 2011; TAMIMI; JUWEID, 2017).

De acordo com a sua origem, GBM podem ser separados em dois subtipos, denominados primários quando se iniciam *de novo* e secundários quando decorrem da progressão de tumores de menor grau (OHGAKI; KLEIHUES, 2013). GBM primários acometem geralmente idosos com mais de 60 anos e secundários geralmente afetam uma população mais jovem – mediana de 45 anos (LE MERCIER et al., 2012). Além do desenvolvimento, existem ainda diferenças genéticas entre estes dois subtipos de GBMs, sugerindo uma evolução por vias diferentes. GBM primários são caracterizados

por mutação e amplificação do receptor do fator EGFR (*epidermal growth factor receptor*), deleção e mutação de PTEN (*phosphate and tensin homologue*) e perda do cromossomo 10q. Estes, diferem dos secundários que são frequentemente identificados com mutações na IDH1 (*isocitrate dehydrogenase 1*), mutações em p53 e perda do cromossomo 19 (REIFENBERGER et al., 2016).

Atualmente, o avanço de projetos de larga escala como o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) e outras plataformas que identificam perfis de alterações transcriptômicas, epigenômicas e proteômicas tem permitido importante avanço na compreensão da complexidade da patogênese tumoral, além de salientar a relevância de fatores moleculares para o manejo do paciente (LEE et al., 2018a). Um exemplo disso, é a classificação transcricional dos GBMs em 3 tipos - proneural, clássico e mesenquimal - decorrente de padrões de expressão de mRNA identificados por estudos de microarranjo como parte do TCGA, que caracterizam subtipos tumorais com respostas diferentes de sobrevivência e progressão da doença (WANG et al., 2017).

Em 2016, a WHO divulgou a nova classificação de tumores do SNC incluindo além dos critérios histológicos, características moleculares, buscando a integração entre dados clínicos e de pesquisa na tentativa de aumentar a acurácia diagnóstica, além da subtipagem molecular ser importante para a identificação de pacientes que podem ser beneficiados com terapias adjuvantes específicas (LOUIS et al., 2016; PAOLILLO; BOSELLI; SCHINELLI, 2018).

1.3.1. Tratamento

A abordagem típica para tratamento de GBMs envolve ressecção cirúrgica máxima, radioterapia e quimioterapia. Apesar da estratégia agressiva de tratamento, a sobrevida dos pacientes ainda é pouco alterada. A ressecção cirúrgica completa é bastante prejudicada pela difusão, invasividade e irregularidade de bordas deste tipo de tumor (VELIZ et al., 2015). Após a cirurgia, a radioterapia aumenta de 3-12 meses

a sobrevida média, ainda assim a recorrência destes tumores é de 90% no local da cirurgia (STUPP et al., 2005; WELLER et al., 2013). Embora o prognóstico ainda seja precário, a aplicação do protocolo de Stupp com radiação ionizante e uso concomitante do agente alquilante TMZ aumentou significativamente a sobrevida média de 12.1 para 14.6 meses, quando comparado ao tratamento de TMZ sozinho (STUPP et al., 2005, 2009).

Aprovada pelo FDA em 2005 para o uso em GBMs, a TMZ hoje é o tratamento de primeira linha para este tipo de tumor. Após a ressecção cirúrgica, os pacientes são submetidos a um regime de tratamento intenso com TMZ adjuvante a radioterapia por 6 semanas (75 mg/m²/dia), para então seguir o tratamento de manutenção que geralmente acontece pelo protocolo 1-5/28. Neste protocolo, os pacientes recebem doses diárias de até 1 g/m² de TMZ (entre 150 e 200 mg/m²/dia) por 5 dias, seguido de 23 dias sem administração do fármaco, completando os 28 dias do ciclo que geralmente se repete 6 vezes (STRIK et al., 2012).

Dentro do grupo de pacientes que melhor respondem ao tratamento combinado com TMZ, se encontram aqueles que possuem o promotor metilado da enzima de reparo de DNA MGMT, com uma sobrevida de 21.7 meses comparada aos 12.7 meses de pacientes sem a metilação sob o mesmo tratamento. Ainda, em pacientes que receberam o tratamento concomitante e apresentavam promotor metilado de MGMT, a taxa de sobrevida após dois anos aumentou para 46% comparados a 13% dos pacientes sem a metilação (HEGI et al., 2005).

Além da TMZ, BCNU (Carmustina) e CCNU (Lomustina) também são utilizados no tratamento dos GBMs. O BCNU e CCNU são nitrosuréias com ação bifuncional, que funcionam como um agente alquilante (BRANDES et al., 2016). O primeiro, é aplicado para liberação local na cavidade cirúrgica, enquanto o segundo faz parte de um coquetel quimioterápico que também inclui Procarbazina e Vincristina (BUSH; CHANG; BERGER, 2017). O BCNU apresenta efeitos adversos como redução

do volume de líquido cérebro-espinhal, aumento da pressão intracranial e edema, e o aumento na sobrevivência dos pacientes é de cerca de 2 meses (GUTENBERG et al., 2013; WESTPHAL et al., 2006). Já o coquetel PCV (Procarbazina + CCNU + Vincristina) foi por algum tempo utilizado como o tratamento de escolha para GBM, mas não é mais usado devido ao grande número de efeitos adversos. Atualmente, essa combinação está sendo avaliada em tumores recorrentes após tratamento com TMZ ou na ausência de outras alternativas (KUHNHENN et al., 2012; SCHMIDT et al., 2006).

1.3.1.1. Temozolomida (TMZ)

A TMZ é um agente alquilante, que como os demais compostos deste grupo é capaz de modificar proteínas, lipídios, RNA e DNA. Este fármaco é uma imidazotetrazinona, considerada uma pró-droga que é ativada espontaneamente em pH fisiológico (pH 7), não necessitando metabolização hepática. A ação de metilação da TMZ decorre do cátion metildiazônio, produto da degradação do composto intermediário metiltriazeno-1-il imidazole-4 carboxamida (MITC) gerado pelo ataque nucleofílico na ativação da TMZ que também forma a molécula inativa 5-aminoimidazole-4 carboxamida (AIC) (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). Neste processo, a citotoxicidade da TMZ ocorre pela transferência de grupos metil do íon metildiazônio para bases do DNA, gerando principalmente as lesões N7-metilguanina (60-80%), N1 e N3-metiladenina e N3 metilcitosina (25%) e O6-metilguanina (5%) (FU; CALVO; SAMSON, 2012).

As lesões de O⁶meG são reparadas por reversão do dano pela MGMT, uma proteína de 22kDa localizada no citoplasma e no núcleo que, na presença de dano alquilante, encontra-se em maior quantidade no núcleo para realizar o reparo. MGMT é considerada uma enzima suicida, uma vez que se torna inativa ao transferir o grupamento alquil da guanina para a cisteína do seu sítio ativo (Cys145) no reparo do DNA. Quando a atividade desta enzima é reduzida, a O⁶-MeG permanece e durante a

replicação do DNA emparelha erroneamente com a timina. Tal incorporação da timina no lugar da citosina é reconhecido pela via de reparo de mal emparelhamento (MMR) que atua removendo a timina da fita recém-sintetizada de DNA. No entanto, a fita molde continua com o resíduo de O⁶-meG que gera ciclos fúteis de remoção de timinas resultando em quebras no DNA e no colapso da forquilha de replicação (Revisado em ERASIMUS et al., 2016; FU; CALVO; SAMSON, 2012; ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

Os cerca de 95% das lesões causadas pela TMZ no nitrogênio das adeninas e citosinas são detectadas e corrigidos pelo BER, discutidos na seção 1.1.1.

Desta forma, três sistemas de reparo de DNA são importantes para que a TMZ seja eficiente no tratamento antitumoral: MGMT, MMR e BER (Figura 7). O funcionamento adequado do MMR é necessário para gerar a citotoxicidade da TMZ, enquanto MGMT e BER protegem as células contra a toxicidade e mutagênese induzidas por agentes alquilantes e quando ausentes permitem o acúmulo da maioria das lesões decorrentes da exposição à TMZ (LEE, 2016).

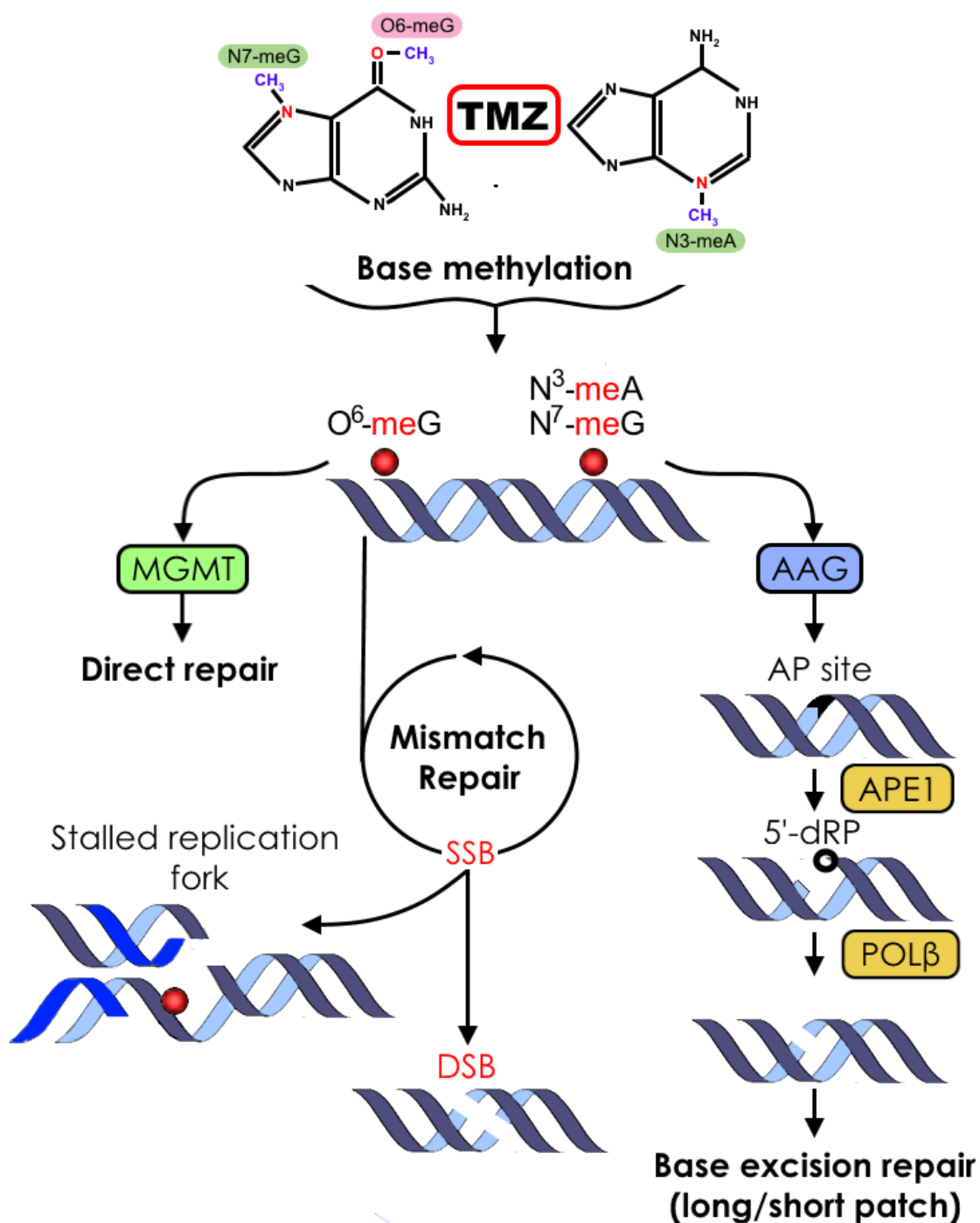


Figura 7. Mecanismos de reparo envolvidas no mecanismo de ação da TMZ: BER, MMR e MGMT. Resumo esquemático das lesões induzidas no DNA pela TMZ e mecanismos de reparo implicados na sua remoção em GBM. A reversão direta de O⁶-meG é mediada por MGMT. Na ausência de MGMT, o O⁶-meG permite realizar a incorporação incorreta de T durante a síntese de DNA, resultando em ciclos fúteis de MMR que levam à geração de quebras de fita simples de DNA (SSBs), quebras de fita dupla (DSBs) e DSBs associados à replicação. A remoção de N7-meG e N3-meA, mediada pelo BER, é iniciada pela DNA glicosilase MPG ou AAG. O reparo do sítioapurínico/apirimidínico (AP) resultante pode envolver a substituição de um único nucleotídeo (SP-BER) ou vários nucleotídeos (LP-BER). (Adaptado de ERASIMUS et al., 2016 e YOSHIMOTO et al., 2012).

Portanto, dada a importância dos componentes das vias de reparo do DNA na resposta dos GBMs à quimioterapia e do UPR no desenvolvimento e tratamento do câncer, é de grande importância entender a complexidade das interações entre estes mecanismos de resposta ao estresse a fim de fornecer novas perspectivas na patogênese do câncer e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas.

2. OBJETIVO GERAL

O trabalho tem por objetivo caracterizar o envolvimento de AAG na resposta de estresse ao RE e elucidar o impacto da modulação desta DNA glicosilase na ativação do UPR no contexto do glioblastoma.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.1.** Identificar e caracterizar a participação de AAG na indução de estresse do RE em linhagens celulares de glioblastoma com diferentes níveis de AAG;
- 2.1.2.** Determinar o papel da AAG na sobrevivência das linhagens de glioblastoma após tratamento com agentes alquilantes;
- 2.1.3.** Avaliar se AAG altera a resposta das linhagens de glioblastoma ao tratamento alquilante combinado a indução farmacológica de estresse de RE.

3. CAPÍTULO I – Desenvolvimento e caracterização das linhagens celulares moduladas para AAG

3.1. INTRODUÇÃO

Devido a constante exposição a agentes endógenos e exógenos que levam a danos no DNA, as vias de reparo de DNA são imprescindíveis para a manutenção da integridade genômica (NIEDERNHOFER et al., 2018). Agentes alquilantes como a temozolomida (TMZ) podem danificar as bases do DNA e levar a citotoxicidade e mutagenicidade (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). Neste sentido, as respostas celulares frente a alquilação são fatores relevantes para a compreensão tanto das causas como do tratamento do câncer.

Diferentes vias de reparo protegem as células contra as lesões causadas pela TMZ e podem desempenhar um papel na resposta do glioblastoma (GBM) à terapia alquilante (Revisado na seção 1.3.1.1 da introdução). Os principais mecanismos envolvidos no reparo do dano alquilante ao DNA incluem a proteína de reparo O⁶meG-DNA metil transferase (MGMT) e a via de reparo por excisão de bases (BER) (FU; CALVO; SAMSON, 2012). A proteína MGMT repara a lesão O⁶meG prevenindo a mutagenicidade e a citotoxicidade associada a esta lesão. No entanto, 7meG e 3meA também são gerados pela TMZ e apesar de ambas possuírem potencial citotóxico a importância do BER para o GBM ainda é pouco explorada. Recentemente, demonstrou-se que a expressão da DNA glicosilase conhecida como AAG (*alkyl adenine glycosylase*- também conhecida como MPG ou APNG), a enzima que inicia o BER para o dano alquilante, é um importante determinante na sobrevida dos pacientes de GBM (AGNIHOTRI et al., 2012).

O BER é iniciado com a remoção da base danificada por uma das várias DNA-glicosilases substrato-específicas, no caso do dano alquilante a AAG. Após a excisão da base ocorre a formação de um sítio AP que será subsequentemente processado por enzimas a jusante permitindo a síntese e a ligação do DNA. Os passos que seguem a remoção da base precisam ser extremamente coordenados uma vez que

podem gerar substratos potencialmente tóxicos como os sítos AP e quebras de fita simples (FU; CALVO; SAMSON, 2012; SOBOL et al., 2003). Portanto, uma ação incompleta desta via tem o potencial de gerar danos ao invés de repará-los. Diversos estudos indicam que a função coordenada dos fatores do BER levando ao completo reparo é chave para a homeostase e a saúde (LEE et al., 2009; SOBOL et al., 2003).

Como previamente discutido na introdução, variados efeitos foram observados pela modulação de AAG em resposta a agentes alquilantes. Isto posto, o objetivo inicial deste estudo era explorar a possibilidade de que a modulação de AAG seria um importante determinador na resposta celular ao tratamento alquilante em linhagens de GBM. Para tanto, nós nos propusemos a construir um painel de linhagens celulares onde AAG seria silenciada ou superexpressa, e este capítulo detalha a geração destas células.

3.2. METODOLOGIA

Cultivo celular

Foram utilizadas as linhagens celulares A172 e T98G derivadas de GBM humano, adquiridas do banco de células ATCC (*American Type Culture Collection*, EUA). Segundo AGNIHOTRI et al., 2012^a, as linhagens A172 e T98G possuem diferentes níveis de expressão do gene *AAG*. Além disso, a linhagem A172 é *MGMT* negativa, enquanto a linhagem T98G expressa o gene *MGMT* (AGNIHOTRI et al., 2012; TANG et al., 2011). Tais características dos dois tipos celulares utilizados são importantes para a compreensão das respostas celulares das linhagens à TMZ. Baseado nisso, propomos o silenciamento de *AAG* na linhagem T98G e a superexpressão na linhagem A172. As linhagens de glioblastoma humano foram cultivadas em meio de cultura DMEM-LG (*Dulbecco's modified Eagle's medium, low glucose*- Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% antibióticos e glutamina 2,5mM, todos adquiridos da marca Invitrogen. As culturas celulares foram mantidas em incubadora a 5% de CO₂ e 37°C e periodicamente verificadas quanto à ausência de micoplasma utilizando o kit *MycoAlert* (Lonza).

Além das linhagens celulares de GBM, utilizou-se a linhagem celular de rim de embrião humano HEK293T na etapa de preparação do sistema lentiviral utilizado para a transdução das linhagens de GBM. A linhagem HEK293T foi cultivada em meio de cultura DMEM-LG, suplementado com 10% de SFB e antibióticos (Invitrogen) e mantidas em incubadora contendo 5% de CO₂ a 37°C.

No presente estudo também foi utilizada a linhagem *E. coli* XL1 competente para a etapa de amplificação dos plasmídeos utilizados no silenciamento e superexpressão do gene AAG. A linhagem bacteriana foi cultivada em condições padrões em meio de cultura LB e antibióticos quando necessário.

Construção dos vetores de superexpressão e silenciamento

A fim de analisar o impacto da modulação da expressão de AAG em linhagens celulares de GBM, foram idealizados construtos plasmidiais. O primeiro, como controle o vetor de expressão pGFP-C3 vazio (pGFP-C3 empty) (Figura 1A). O segundo, para a superexpressão de AAG, contendo a sequência codificadora integral de AAG (NCBI NM_002424.3), foi clonado no vetor de expressão pEGFP-C3, a fim de gerar uma fusão N-terminal entre GFP e AAG (denominado C3-hAAG, Figura 1B)

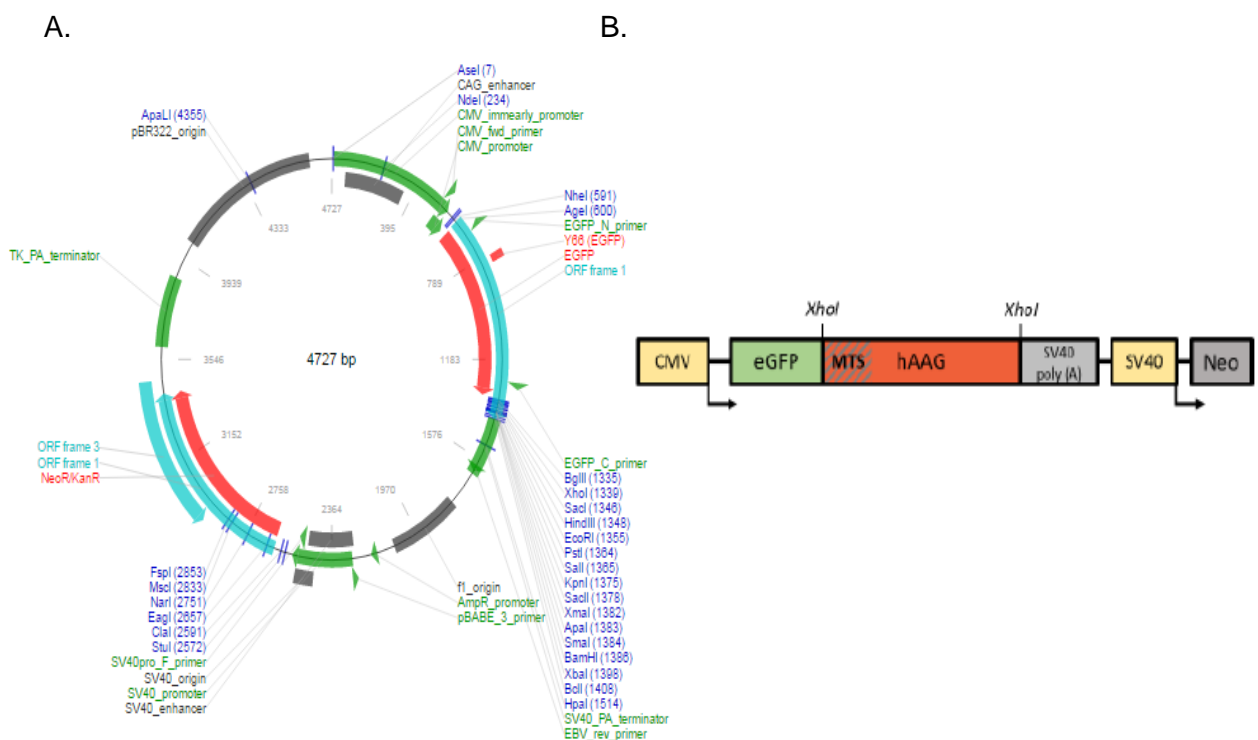


Figura 1. Plasmídeo para superexpressão. A. Mapa do vetor pEGFP-C3 (adaptado da ficha técnica do produto). B. Mapa parcial do plasmídeo pEGFP-C3-hAAG, ilustrando o cassete de expressão da proteína fusionada EGFP-AAG.

Para complementar o cenário de modulação da expressão de AAG, o sistema de silenciamento foi obtido da empresa *Thermo Fisher Scientific*. Este possui quatro constructos baseados no vetor pGiPZ com regiões diferentes do gene *AAG*, para silenciamento através de sistema lentiviral utilizando shRNA, juntamente com um controle (*non-silencing pGIPZ*).

No processo, são inseridos um gene de resistência à puomicina e um de GFP permitindo a seleção das células transduzidas. Foram utilizadas 4 sequências shAAG com o objetivo de obter, no mínimo, 2 linhagens silenciadas para AAG. Sendo estas as seguintes: V3LHS_343111 - ACAGCTTCATCCTGTGCCA, V3LHS_343113 - TCATGCAGAAGTACATGCC, V3LHS_343114 - CTAGCTGGTCGCTGCTTCT, V3LHS_343116: CATGCAGAAGTACATGCCG.

Transfecções dos constructos de superexpressão

Todas as transfecções foram realizadas utilizando o reagente lipofectamina (*Life Technologies*), seguindo as recomendações do fabricante para uso em placas de 96 poços. Após otimização, as condições escolhidas foram 2×10^4 células por poço de uma placa de 96 poços (plaqueadas no dia anterior à transfecção), 100 ng de DNA, 0,25 μ L de lipofectamina e 0,1 μ L do reagente Plus (contido no kit). A transfecção foi conduzida em meio livre de soro e incubada por 4 horas. Após esse período o meio foi substituído por meio completo (DMEM-LG, 10% SFB e 2.5 mM de glutamina). 24 e 48 horas pós-transfecção as células foram visualizadas sob microscopia de fluorescência para a avaliar a presença de células GFP-positivas, quando aplicável. Células transfectadas com plasmídeos de superexpressão foram selecionadas com 600 μ g/mL de G418 (geneticina) por um período de 7 a 10 dias.

Transformação bacteriana

Bactérias *E. coli* XL1 termocompetentes foram transformadas com os plasmídeos descritos acima pelo protocolo padrão de choque térmico. A metodologia envolve a incubação do *mix* contendo as bactérias competentes e os plasmídeos por 30 minutos a 4°C seguida por uma incubação a 42°C por 2 minutos. Então, o *mix* foi incubado em meio de cultura LB líquido durante 1 hora a 37°C sob agitação para permitir a expressão do gene de resistência ao antibiótico específico (ampicilina). Após este período, uma alíquota de cada suspensão bacteriana foi transferida para uma placa com meio de cultura LB sólido contendo ampicilina e foi então incubada a 37°C *over-night*. A partir das colônias transformadas e isoladas, foram feitos inóculos em meio de cultura LB líquido contendo ampicilina e incubados a 37°C *overnight*. Após crescimento das culturas, os plasmídeos foram extraídos com o kit *PureLink® HiPure Plasmid Midiprep* (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Transdução das células T98G

Para a transdução das células de glioblastoma T98G com as sequências shAAG, foi utilizado o sistema de vetores lentivirais. A produção lentiviral foi realizada pela co-transfecção de células empacotadoras HEK293T com o reagente PEI (*polyethylenimine*) complexado aos plasmídeos empacotadores de vírus e aos plasmídeos de expressão shAAG e sequências controle, em meio de cultura sem soro fetal bovino e sem antibióticos (LONGO et al., 2013). Então, após 16 horas da transfecção, as células foram lavadas e incubadas com meio de cultura. Após 72 horas, o sobrenadante contendo o lentivírus foi coletado (por 3 dias consecutivos), filtrados e congelado a -80°C. Para a transdução, a linhagem celular T98G foi incubada com o lentivírus por aproximadamente 16 horas. Para a seleção das células T98G transduzidas, as células foram expostas ao antibiótico puomicina na concentração final de 2 µg/mL por um período de 7 a 10 dias. Uma vez que nem todas as populações obtidas após a seleção com puomicina eram totalmente GFP positivas, realizou-se uma segunda etapa de seleção utilizando *sorting* celular através de

citometria de fluxo. Após atingirem 70% de confluência, as populações de T98G shAAG3 e T98G shAAG4 foram selecionadas no citômetro de fluxo (*FACS Canto*) utilizando a marcação GFP positiva como parâmetro de seleção. Desta forma, obtivemos uma população com mais de 95% de células GFP positivas.

Para a quantificação do percentual de células transduzidas, as linhagens foram analisadas quanto à presença de GFP no equipamento *Guava Easy Cyte Plus Cell Cytometer* e os resultados foram processados no software *ExpressPro* (*Guava Technologies*).

Caracterização das linhagens celulares

As linhagens geradas foram caracterizadas por RT-qPCR, Western-blot e por ensaio enzimático de atividade para confirmar modulação e funcionalidade de AAG.

Isolamento de RNA

As células foram cultivadas em garrafas T25 até atingirem 90% de confluência e tiveram o RNA isolado utilizando *Pure Link RNA Mini Kit* (*Life Technologies*) conforme sugerido pelo fabricante.

Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada com o kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis* (*Thermo Fisher Scientific*), conforme instruções do fabricante, utilizando 1µg de RNA total. O cDNA foi então amplificado por PCR utilizando o par de primers a seguir hAAG1_498-517_fwd: CCC CGC AAC CGA GGC ATG TT 3', hAAG1_610_591_rev: AGC AAG ACG CAA GCC CCG TC 3'.

RT-qPCR

Para avaliar eficácia da modulação de AAG das linhagens superexpressoras e silenciadas para AAG, o cDNA foi submetido a uma reação de RT-qPCR e diferenças na expressão foram avaliadas pelo método de $\Delta\Delta C_t$, a β -Actina humana (ACTB, NM_001101.3) foi selecionada como controle de expressão endógena e amplificada utilizando os primers human_beta_actin fwd: 5' ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA 3',

human_beta_actin rev: 5' GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA 3'. AAG humana foi amplificada utilizando os primers citados na seção anterior. Todas as reações foram feitas em singleplex em uma placa de 96 poços em triplicata. A amplificação foi detectada utilizando *SYBR Green Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)*. A reação, de um total de 10 µL, consistiu de 5 µL de 2x Master Mix, 10µM de cada um dos primers 1 µL de cDNA e água livre de RNases e DNases. As reações foram conduzidas no *QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Life Technologies)* e as condições foram como segue: 50°C/2 minutos (ativação de UDG), 95°C/10 minutos (desnaturação inicial) e 40 ciclos de 95°C/15 segundos seguidos por 60°C/1 minuto (anelamento/extensão). No final da reação foi acrescentado um ciclo adicional de análise da curva de desnaturação.

Isolamento e quantificação de proteínas

As células foram cultivadas em garrafas T75, e quando estavam 80% confluentes, foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 300 x g. O pellet celular então foi ressuspensionado em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) e centrifugado nas mesmas condições. No final da centrifugação o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 100µL de tampão RIPA (Sigma) com coquetel inibidor de protease 1x (*Thermo Scientific*). Os tubos então foram submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento (temperatura ambiente) e foram sonicados em banho-maria por 10 minutos. Após a sonicação, os lisados celulares foram centrifugados a 16.000 x g por 5 minutos a 4°C. Os extratos foram armazenados a -20°C.

A concentração proteica dos extratos foi determinada através do ensaio do ácido bicinonínico (BCA) utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific)*, utilizando 10µl de amostra e padrões conforme recomendado pelo fabricante.

Western-blot

Depois de quantificados, um total de 20 µg de amostra foram diluídos em tampão Laemmli 4X (277,8 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 44,4% glicerol; 4,4% SDS e 0,02% azul de bromofenol) da *Bio-Rad Laboratories* e água ultrapura. As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 minutos e então foram corridas em géis comerciais *Any kDa Mini-PROTEAN TGX* (*Bio-Rad Laboratories*), com poder de resolução de proteínas entre 10-200 kD. A eletroforese foi executada a uma voltagem constante de 125V durante aproximadamente 1 hora.

Western-blot – transferência e análise

A transferência foi realizada em condições semi-secas utilizando o *Trans-Blot Turbo Transfer Pack* no sistema *Trans-Blot Turbo* (ambos da *Bio-Rad Laboratories*) por 30 minutos a uma voltagem constante de 25V. A membrana de PVDF foi então bloqueada com leite/T-TBS (*Tween Tris Buffered Saline*) 1% por 1 hora. Depois de bloqueada, a membrana foi incubada *overnight* com anticorpos primários contra AAG humana (Anti-AAG HPA006531, Sigma) numa diluição de 1:500 e anti-β-Actina humana (Anti-β-Actin, A2228, Sigma) na diluição de 1:7000 em TBS. No dia seguinte, depois da membrana passar por três etapas de lavagem com TBS, foi incubada a briga da luz com os anticorpos secundários fluorescentes *IRDye 680RD green goat anti-mouse IgG* (LI-COR, 1:6000) e *IRDye 800CW red Goat anti-rabbit IgM* (LI-COR, 1:6000) por mais uma hora. Então a membrana passou por 4 lavagens (duas com T-TBS e duas com TBS) de 5 minutos cada sob agitação e finalmente foi escaneada no *Odyssey CLx IR imaging system* (LI-COR).

Ensaio enzimático de atividade da AAG

Para realização do ensaio de atividade enzimática utilizou-se um oligonucleotídeo com uma base interna modificada como substrato para a glicosilase AAG. Grupos 3' fluoresceína e 5' amino foram covalentemente ligados a superfície dos poços de uma placa *Nunc ImmobilizerTM* através do grupo amino. Um oligonucleotídeo complementar é hibridizado ao primeiro para formar uma dupla

hélice de DNA imobilizada. Extratos celulares ou uma glicosilase DNA recombinante foram incubados então com o complexo de oligonucleotídeos em diferentes poços por 1h a 37°C. A proporção de bases modificadas excisada em cada poço reflete a atividade de glicosilase na amostra ou no padrão. A reação é terminada pela lavagem dos poços, e então adicionada uma solução alcalina e a placa é aquecida para desnaturação do DNA e geração das quebras de fita nos sítios abásicos alcali-lábeis. A solução alcalina é transferida para os poços equivalentes numa placa separada e a atividade da enzima é determinada pela medida da fluorescência eluída ou retida.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e caracterização das linhagens de glioblastoma moduladas para AAG

Para melhor compreender o impacto da modulação de AAG uma série de linhagens celulares foi desenvolvida mediante a transfecção dos plasmídeos descritos na seção anterior.

Silenciamento de AAG na linhagem T98G

Após a seleção de células transduzidas, foi possível observar a expressão das células GFP positivas utilizando microscopia de fluorescência. A fim de confirmar o silenciamento de AAG, as técnicas qRT-PCR e Western Blot foram utilizadas.

Conforme apresentado na figura 2A, a quantificação relativa dos valores de expressão de AAG nas células shAAG1, shAAG2, shAAG3 e shAAG4 mostrou que todas as células transduzidas com os plasmídeos shAAG possuem níveis inferiores de mRNA de AAG em relação às linhagens selvagem (WT) e shNS (a qual foi transduzida com as sequências controle de silenciamento), correspondendo a uma redução de 40 – 60% de expressão em relação à linhagem controle T98G shNS.

A linhagem T98G shNS mostrou níveis superiores da proteína AAG em relação à linhagem selvagem não transduzida (Figura 2B). Tal efeito pode estar relacionado ao próprio procedimento de transdução o qual pode estar levando a uma fraca indução de

danos no DNA e conseqüentemente uma ativação de AAG. Em relação às linhagens transduzidas com shAAG, foi observada uma clara resposta negativa na expressão de AAG nas linhagens T98G shAAG3 e shAAG4, como verificado pela ausência da banda referente à proteína AAG (Figura 2B). Entretanto, a sequência shAAG1 apresentou uma forte expressão de AAG, muito similar a T98G shNS (resultado não apresentado).

O ensaio de atividade enzimática demonstrou que além da quantidade de AAG, a atividade desta também foi reduzida na linhagem shAAG3 (Figura 2D).

Desta forma, os resultados obtidos pelas técnicas de qRT-PCR, Western Blot e atividade enzimática demonstraram que o gene AAG foi silenciado nas linhagens transduzidas com os plasmídeos shAAG, células shAAG2, shAAG3 e shAAG4 o que confirma a obtenção das linhagens T98G contendo diferentes níveis de silenciamento de AAG.

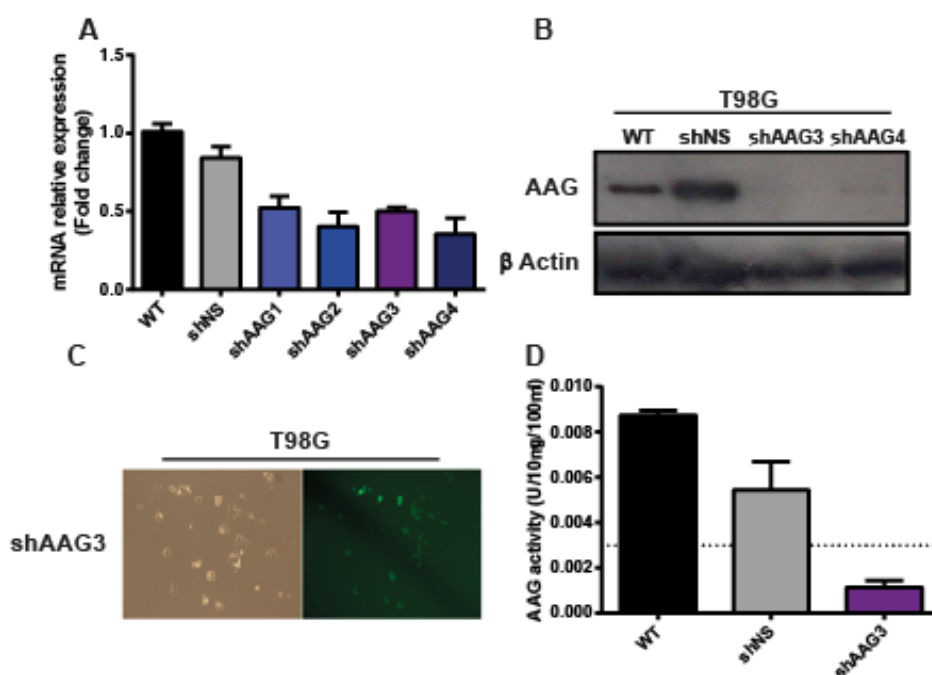


Figura 2. Caracterização morfológica e fenotípica das linhagens T98G silenciadas em AAG. A. Quantificação relativa de AAG por RT-qPCR sugerindo o silenciamento de AAG nas diferentes sequências utilizadas de shAAG B. Imagem representativa de Western blot onde vê-se a ausência de bandas nas linhagens silenciadas, na porção correspondente ao tamanho estimado da proteína AAG de 37 KDa C. T98G shAAG3 pode ser observada sob microscopia de campo claro e fluorescência (200x). D. Redução da atividade enzimática de AAG na linhagem shAAG3.

Superexpressão de AAG na linhagem A172

Duas linhagens foram desenvolvidas através da transfecção dos constructos já citados: *Empty Vector*, composta de células transfectadas apenas com o pEGP-C3 vazio, a ser usado como controle negativo, *Whole-cell overexpressor*, transfectado com C3-hAAG, cuja superexpressão pode ocorrer no núcleo e mitocôndria.

A caracterização das linhagens está detalhada na figura 3. Para confirmar a superexpressão de AAG foi realizada a quantificação desta por RT-qPCR (Figura 3A), as células hAAG A172 expressam níveis de mRNA de AAG ao menos 3 vezes acima das células parentais A172 WT. O painel B da mesma figura mostra a análise dos níveis proteicos de AAG, usando-se β -actina humana como controle de carregamento da amostra aplicada. Nele, vê-se apenas na linhagem superexpressora, uma forte banda em torno dos 54 kDa, tamanho previsto para proteína de fusão GFP+AAG (17 + 37 kDa), notando-se que a proteína AAG endógena também é detectada, especialmente em lisados proteicos das linhagens A172 WT e A172 hAAG. No painel C, pode-se ver a morfologia celular de cada uma das linhagens apresentando fluorescência verde. A atividade enzimática da AAG também foi avaliada através de ensaio *in vitro*, como representado na figura 3, painel D. Na figura, podemos observar que as células superexpressoras A172 hAAG apresentam maiores níveis de atividade glicosílica do que as linhagens controles A172 WT e C3. Levando-se em consideração os resultados apresentados, confirmamos que a linhagem superexpressora de AAG foi desenvolvida com sucesso.

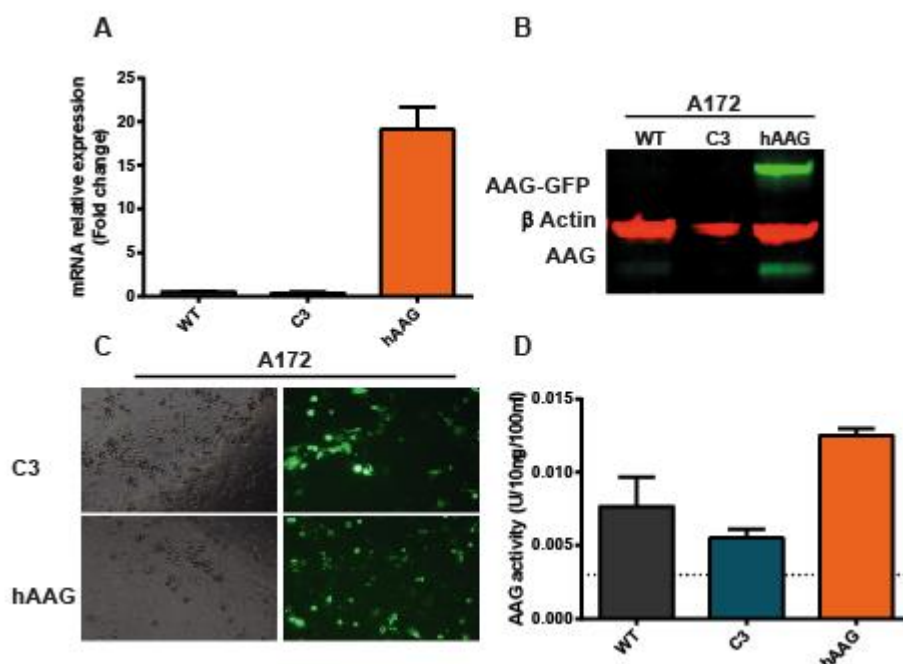


Figura 3. Caracterização morfológica e fenotípica da linhagem superexpressora de AAG. A. Quantificação relativa de AAG por RT-qPCR sugerindo a superexpressão de AAG, posteriormente confirmada em (B) onde vê-se a presença de bandas de grande intensidade apenas na linhagem superexpressora, correspondendo ao tamanho estimado da proteína de fusão GFP-AAG. C. As diferentes linhagens podem ser observadas sob microscopia de campo claro e fluorescência (200x). D. Ensaio *in vitro* de atividade enzimática de AAG.

O estudo dos mecanismos que coordenam a sensibilidade celular frente a diferentes insultos que danificam o DNA é de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do câncer, uma vez que grande parte dos fármacos utilizados se baseiam na capacidade de danificar o DNA levando a morte celular (ANNOVAZZI; MELLAI; SCHIFFER, 2017).

Dentre as abordagens utilizadas para realizar este tipo de pesquisa estão os experimentos de ganho ou perda de função, como por exemplo as estratégias de *knock-down* e superexpressão utilizadas aqui. Para avaliar o impacto no fenótipo celular, nós geramos com sucesso um painel de linhagens de glioblastoma que está superexpressando (A172 hAAG) ou reduzindo a expressão de AAG (T98G shAAG).

Em posse destas ferramentas biológicas, partimos para a investigação do impacto de AAG no estresse de RE e na ativação do UPR, que será discutido nos próximos capítulos.

4. CAPÍTULO II – “A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress”.

Neste artigo original, submetido para publicação no periódico PNAS (*Proceedings of the National Academy of Sciences*), abordamos a relação do reparo de DNA defeituoso com uma resposta prejudicada ao estresse do RE. Aqui apresentamos, através de camundongos e células tumorais humanas deficientes em AAG, a necessidade desta proteína para a proficiência celular na ativação do UPR induzido por agente alquilante. Além disso, exploramos a influência da modulação da expressão de AAG na sobrevivência celular frente a combinação de um agente alquilante com a indução de estresse do RE. Logo, nosso estudo identifica AAG como um ponto de convergência para as vias de resposta ao estresse podendo ser explorado para aprimorar o tratamento do câncer.

BIOLOGICAL SCIENCES: Cell Biology.

A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress

Larissa Milano ^{1,4}, Clara F. Charlier ², Rafaela Andregueti ², Abdullah Aljohani ², Eleanor Healing ³, Marcos P. Thomé ⁴, Ruan Elliott ³, Leona D. Samson ⁶, Guido Lenz ^{4,5}, João Antonio P. Henriques ^{4,5}, Axel Nohturfft ⁷ and Lisiane B. Meira ^{1,2}

Departments of ¹ Clinical and Experimental Medicine, ² Biochemistry and Physiology and ³ Nutritional Sciences, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK; ⁴ Department of Biophysics and ⁵ Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ⁶Departments of Biological Engineering and Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139, USA; ⁷ Molecular and Clinical Sciences Research Institute, St. George's University of London, London, UK.

Corresponding author: Lisiane B. Meira, Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, GU2 7XH, UK, email: l.meira@surrey.ac.uk

Keywords: alkylating agents, DNA glycosylase, AAG/MPG, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response

Author contributions: LM, LDS, AN and LBM designed research; LM, CFC, RA, AA, MPT, EH, AN and LBM performed research; JAH, GL and RE contributed new reagents or analytical tools; LM, LDS, AN and LBM analyzed data; LM, AN and LBM wrote the paper.

Abstract

Alkylating agents damage DNA and proteins and are widely used in cancer chemotherapy. Cellular responses to alkylation-induced DNA damage have been well studied, however, knowledge of how cells deal with alkylated proteins, and their effects in alkylating therapy toxicity, is still sparse. To investigate cellular outcomes to alkylation damage, we investigated gene expression in the mouse liver in response to the alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS), comparing mice deficient in alkyladenine DNA glycosylase (Aag), the enzyme initiating DNA repair for alkylated DNA bases, and wild type animals. MMS induced a transcriptional response in the livers of mice that was qualitatively and quantitatively different between genotypes. The response was more robust in the wild type and importantly, transcripts related to endoplasmic reticulum (ER) stress/unfolded protein response (UPR) are induced by MMS in an Aag-dependent manner. We also used human cell lines expressing different AAG levels to investigate the mechanism underpinning alkylation-induced UPR activation. We show that AAG is required for UPR induction as evidenced by expression of the chaperone BiP and activation of the transcription factor XBP1. Finally, considering the paradoxical survival or apoptotic outcome of the UPR, we show that pharmacological activation of the UPR synergizes with alkylation to promote cytotoxicity in cancer cells in an AAG-dependent manner. Thus, our findings uncover a novel role for AAG in linking cellular responses to alkylation-induced DNA and protein damage. We infer that combining alkylating agents with pharmacological UPR activators may be a promising cancer therapeutic strategy.

Significance Statement

Stress response pathways, such as the DNA damage response (DDR) and the UPR, are critical in the pathogenesis and therapeutics of cancer and other chronic diseases. There is growing evidence of interplay between ER stress and genome damage repair, but heretofore no published data linking defective DNA repair with impaired ER stress response. Here, we show that AAG is necessary for ER stress activation in response to

alkylating agents. AAG-deficient mice and human cancer cells are defective in alkylation-induced UPR. In addition, AAG expression influences cell survival upon alkylation and ER stress induction. Our studies identify AAG as a point of convergence for stress response pathways. This knowledge could be explored to improve cancer treatment.

Introduction

Organisms are constantly exposed to a variety of stresses that can result in macromolecular injury and cellular dysfunction (1, 2). Reactive compounds that originate from the environment or arise from intracellular processes can damage nucleic acids, proteins and lipids. Exposure to stress triggers highly conserved signalling pathways, such as the DDR and ER stress responses that act to restore homeostasis. Failure of cells and tissues to properly respond to stress and damage underpins the pathogenesis of many diseases (2–4).

Alkylating agents represent an abundant and ubiquitous family of reactive chemicals that can damage DNA, RNA and proteins (5). Sources of alkylating agents include by-products of metabolism (6), and environmental nitroso-compounds such as nitrosamines that are present in certain pollutants and food preservatives (7–9). Exposure to alkylating agents has been associated with pathologies such as type-2 diabetes, non-alcoholic steatohepatitis and certain neurodegenerative diseases (10, 11). On the other hand, because they effectively kill dividing tumour cells, alkylating agents are commonly employed as cancer chemotherapeutic agents.

Alkylation-induced DNA base lesions are primarily repaired by the base excision repair (BER) pathway, initiated by the enzyme alkyladenine DNA glycosylase, or AAG (also known as MPG) (12). AAG excises damaged bases from the DNA phosphodiester backbone, generating an abasic site. Subsequently, an apurinic/apyrimidinic endonuclease cleaves the phosphodiester backbone at the abasic site, creating a single-strand break (SSB) that contains 3'OH and 5'deoxyribose-5-phosphate (5'dRP) termini. Next, DNA polymerase β removes the 5'dRP and carries out single-nucleotide gap filling synthesis. The nicked DNA is then ligated by DNA ligase I or the XRCC1/Ligase III complex (6, 13). The flux of intermediates through this pathway must be efficiently coordinated because BER intermediates, such as abasic sites and SSB, are highly toxic (14, 15). Deficiencies in BER enzymes have been associated with increased alkylation

sensitivity and susceptibility to chronic inflammation (14–16). Also, BER flux imbalance due to AAG overexpression exacerbates alkylation toxicity in numerous mammalian cell types and in mice (14, 15). Elevated AAG expression has been associated with poor prognosis in glioblastoma patients (17, 18).

While the effects of alkylation on DNA have been well studied, cellular responses to alkylation-induced protein damage are poorly understood. Alkylation treatment of yeast and mammalian cells induces hallmarks of ER stress, involving the UPR (19–21). The UPR is an adaptive signal transduction pathway orchestrated by the ER that is important for the maintenance of a functional proteome. A wide range of perturbations can result in ER stress, such as accumulation of unfolded/misfolded proteins, disturbances in calcium homeostasis, hypoxia, oxidative stress and viral infections (4). Three ER-resident transmembrane proteins initiate the UPR: inositol-requiring kinase 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6) and protein kinase-like ER kinase (PERK). These transducers are negatively regulated by chaperones that dissociate during ER stress, leading to activation of the UPR (4). The UPR usually acts as a cytoprotective mechanism, but chronic ER stress leads to cell death (4). Recently, UPR activation was shown to play a key role in cancer, by enabling tumour cells to tolerate and thrive in a hostile environment of nutrient deprivation, hypoxia and low pH, which in turn contributes to cellular transformation, tumour growth, metastasis and resistance to chemo/radiotherapy (22).

To better characterize the outcomes of alkylation damage, we analyzed gene expression in livers of wild-type and Aag-deficient mice that had been exposed to the model alkylating agent MMS. Our findings show that alkylation treatment induces ER stress and the UPR in living animals. Surprisingly, alkylation-induced expression of ER stress genes was dependent on the Aag DNA repair enzyme. Using a panel of human cell lines expressing different levels of AAG, we further demonstrate that AAG is required for UPR induction after alkylation treatment. Finally, considering the dual survival or apoptotic

outcome of the UPR, we also examine the effect of AAG status on cellular sensitivity to alkylating agents alone or combined with a pharmacological activator of ER stress.

Results

Aag is required for alkylation-induced ER stress response

Alkylating agents activate both the DDR and the UPR. To explore potential connections between these pathways, we compared alkylation-induced changes in livers of wild-type and Aag-deficient mice. Animals were injected with a mild, non-lethal dose of the direct acting alkylating agent MMS, and liver tissue was harvested after 6 hours. For both genotypes there was no evidence of any difference in gross liver pathology between controls or MMS-treated cohorts (data not shown). However, transcriptome analysis using gene chip arrays revealed substantial differences in MMS responses between wild-type and Aag-deficient mice ($\log_2FC \geq 1.75$; $p\text{-FDR} \leq 0.05$), with 4.7 times more genes affected in wild-type with minimal overlap (Fig. 1). These data indicate the Aag holds a key position in the transcriptional response to MMS.

By the current criteria, the induction of 218 genes depended on Aag (Fig. 1A). To explore whether specific categories of genes are particularly affected, we performed gene-set enrichment analyses using libraries provided by the enrichr database (23, 24). As expected from studies with cultured cells (19–21, 25), genes induced by MMS in wild-type liver are enriched for gene-sets related to ER stress (GO:0034976, $p\text{-FDR} = 1.6E-05$) and the UPR (GO:0030968, $p\text{-FDR} = 2E-05$); however, of the 12 ER stress response genes induced in wild-type, only one is also induced in the Aag mutant liver (Dataset S1). Genes induced in an Aag-dependent manner also had significant overlap with multiple gene-sets induced by drugs that are known to cause ER stress (Dataset S1, Fig. S1).

To verify the microarray results, we performed qPCR for markers of ER stress in liver tissue from an independent cohort of mice. Alkylation treatment induced the canonical

ER stress markers *Herpud* and *Chop*, and this effect was markedly reduced in *Aag* knockouts ($p=0.031$; Fig. S2). Taken together, the microarray and qPCR results show that *Aag* plays a critical role in the MMS-induced ER stress response.

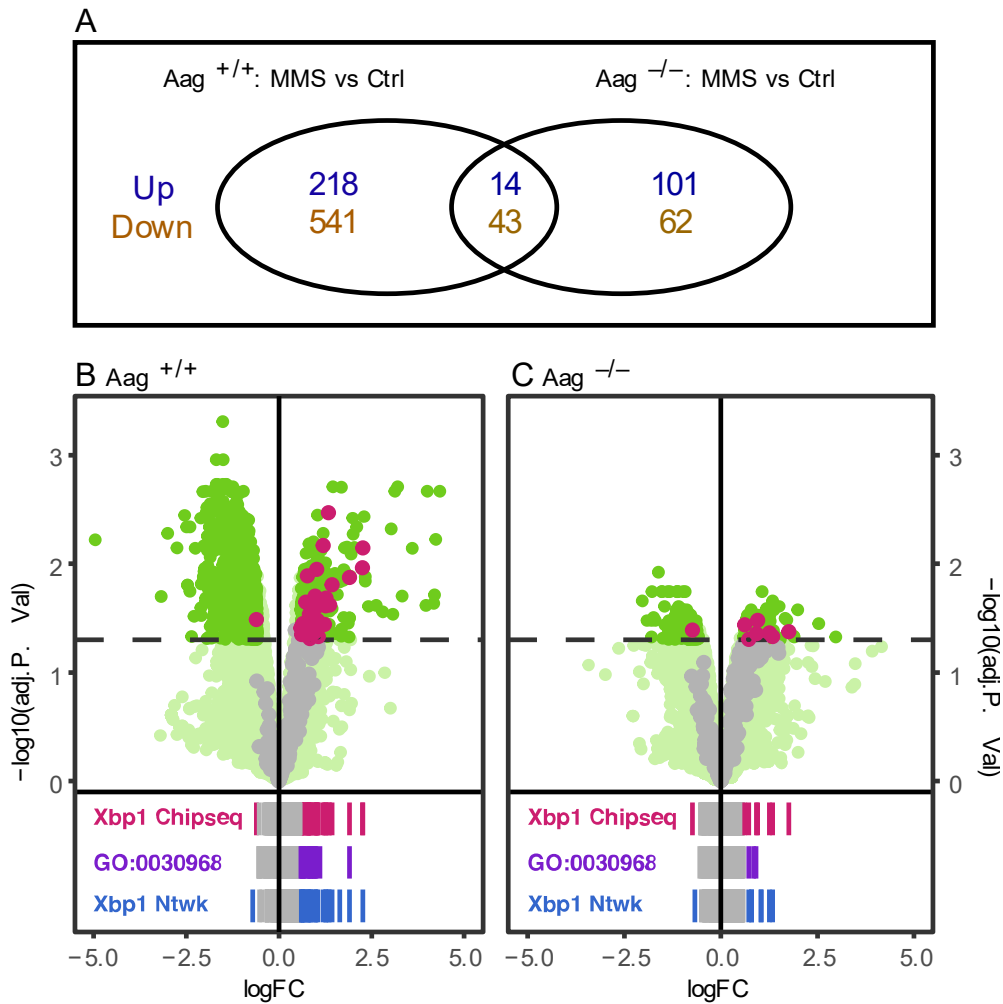


Fig. 1. *Aag* deficiency modifies the transcriptional response to alkylation. Wild-type and *Aag*-deficient mice were injected with MMS or solvent for 6 hrs. Liver RNA was then analyzed using oligonucleotide microarrays. (A) Venn diagram indicating number of differentially regulated probe sets based on minimum \log_2 fold change of 1.75 and a maximum false discovery rate (FDR)-adjusted p value of 0.05. (B, C) Negative \log_{10} adjusted p values are plotted against \log_2 (fold change). Dashed line, negative \log_{10} of 0.05. Xbp1 targets according to mouse liver ChIP-seq data (27) are highlighted in gray or in magenta where $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1.75$ and $p\text{-FDR} \leq 0.05$. Rug plots below indicate the \log_2 (fold change) of genes annotated as Xbp1 targets (magenta), Xbp1 transcriptional correlation network (blue) and ER stress response (GO:0030968, purple); where $|\log_2(\text{fold change})| < 1.75$ genes are marked in gray; hashes are drawn at 60% transparency.

Alkylation-induced activation of Xbp1 requires Aag

Expression of ER stress-related genes is known to be controlled in part by the bZIP transcription factor X-box binding protein 1 (Xbp1) (4), and genes induced by MMS in an Aag-dependent manner showed a significant overlap with genes in the Xbp1 transcriptional network. These networks include (i) genes up-regulated in mice expressing a constitutively active form of Xbp1 (p -FDR = $3E-08$; Dataset S1 'up.wt.only') (26), (ii) physical Xbp1 targets according to mouse liver ChIP-seq data (p = $1.6E-14$; Fig. 1B) (27), and (iii) the Xbp1 transcriptional correlation network (p = $2.5E-10$; Fig. 1B) (28).

The above data suggest that Aag might be required for maximal activation of Xbp1 by MMS. Generation of transcriptionally active Xbp1 protein requires unconventional splicing of its mRNA, a process initiated by the ER stress-induced endonuclease IRE1 (29). We asked, therefore, whether alkylation treatment and the presence of Aag affects the splicing of Xbp1. Experiments were carried out with T98G cells, which are derived from glioblastoma, a type of cancer frequently treated with alkylating chemotherapy agents (30). XBP1 splicing was studied by RT-PCR plus gel electrophoresis, or by quantitative PCR using primers specific for spliced XBP1. MMS induced XBP1 splicing in wild-type T98G cells (Fig. 2 A and B); however, when AAG expression and activity was reduced by RNAi (Fig. S3, A-C), XBP1 splicing was substantially diminished (Fig. 2 A and B). Cells transfected with a non-silencing control shRNA (shNS) displayed some XBP1 splicing even in the absence of MMS, which may be due to stress caused by the CMV-driven knockdown system we employed (Fig. 2A, lanes 3-4; Fig. S4). A time curve of MMS treatment showed that XBP1 splicing peaked after 4 h, and splicing was reduced in AAG-deficient cells at all time points up to 24 h (Fig. 2C).

Next, XBP1 splicing was compared in A172 glioblastoma cells that express comparably low endogenous levels of AAG (Fig. S3, D-G), versus A172 cells stably expressing an GFP-AAG fusion protein. Differential AAG expression and activity in these cells was verified by qPCR, immunoblotting and enzyme assay (Fig. S3, D-F). As judged by

electrophoresis, XBP1 splicing could not be detected in parental A172 cells (Ctrl) or in A172 cells expressing just GFP (GFP), while splicing was effective in cells expressing GFP-AAG, albeit in a manner that is apparently independent of MMS treatment (Fig. 2D). When *XBP1* mRNA was analyzed by qPCR, on the other hand, MMS-induced splicing was detectable in parental A172 and in GFP cells, and splicing increased about twofold in cells over expressing GFP-AAG (Fig. 2E).

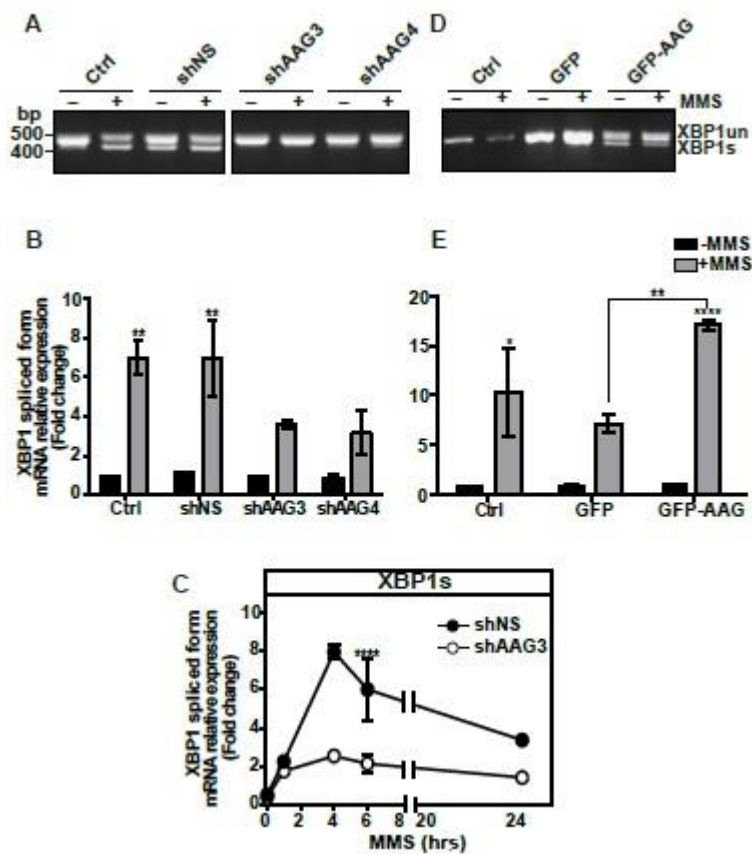


Fig. 2. AAG is required for XBP1 splicing induced by alkylation. (A) MMS treatment induced XBP1 splicing in wild-type T98G (Ctrl) and shNS cells but not in AAG knockdown shAAG3 cells. (B) XBP1 splicing quantification by qPCR. (C) Temporal characterization of XBP1 splicing in shNS and shAAG3 cells treated with MMS. (D) MMS-induced XBP1 splicing in A172 cells expressing low endogenous AAG (Ctrl and GFP) and overexpressing AAG (GFP-AAG). (E) Quantification of MMS-induced XBP1 splicing by qPCR in A172 Ctrl, GFP and GFP-AAG. *P < 0.05 **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

AAG modulates expression of XBP1 target genes in glioblastoma cells after alkylation treatment

To verify the effects of AAG on XBP1 activation, we measured the mRNA levels of *HSPA5* (BiP/GRP78) and *HERPUD1*, two prominent markers of ER stress (e.g. Fig. S1) and known targets of XBP1 regulation (26, 27). In T98G shNS, which express abundant levels of AAG (Fig. S3), MMS treatment increases BiP and HERPUD1 mRNA 3 to 4-fold ($p < 0.05$; $p < 0.01$), with BiP peaking after 6 h while HERPUD1 continues to increase for up to 24 h; in AAG knockdown cells, by contrast, BiP is not induced by MMS, and *HERPUD1* induction is significantly reduced (Fig. 3A). Immunoblotting confirmed that MMS-induced BiP expression reaches a maximum at 6h, and no induction is seen in AAG knockdown cells (Fig. 3 B and C). Regulation of BiP by MMS was also studied in GFP-transfected A172 cells, which express low levels of endogenous AAG versus cells overexpressing an AAG-GFP fusion protein (Fig. S3). Once again, AAG expression positively correlated with MMS-dependent BiP induction; BiP mRNA levels were higher in AAG overexpressing cells than in control cells after MMS treatment at all time points tested (Fig. 3D). Western blotting confirmed that MMS treatment induced BiP to higher levels in the AAG overexpressing A172 cells (Fig. 3E). These data further support the conclusion that MMS triggers an ER stress response through a pathway involving AAG.

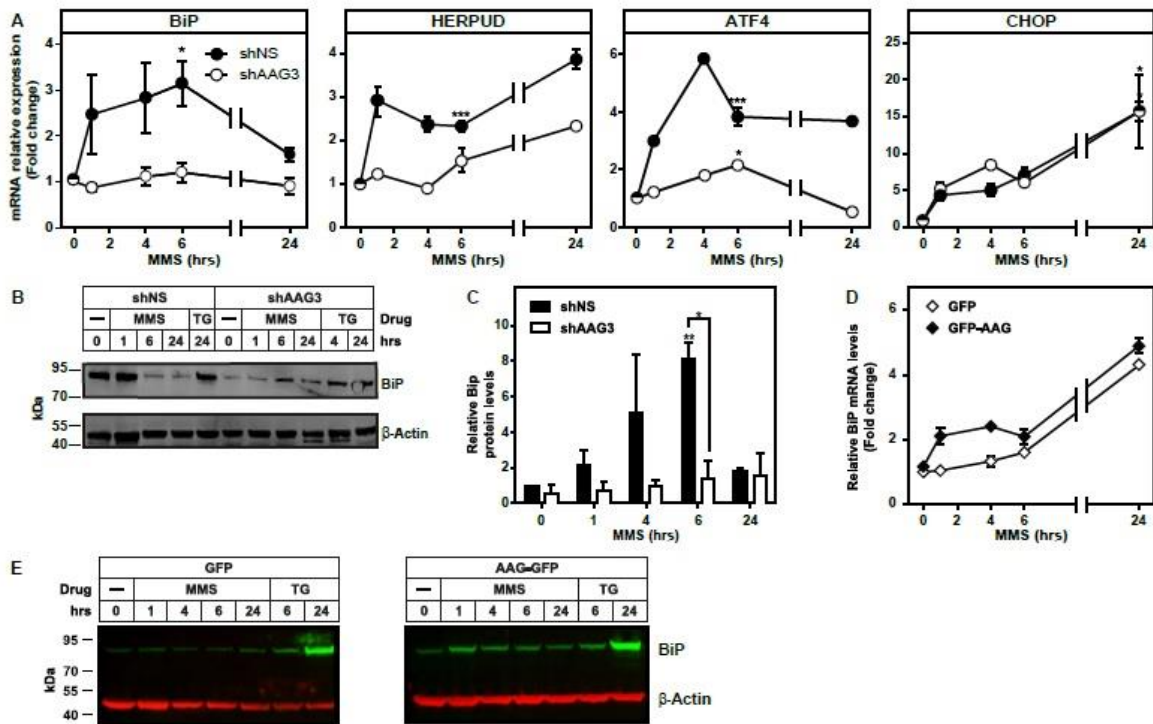


Fig. 3. AAG modulates expression of XBP1 target genes in glioblastoma cells after alkylation treatment. Cells were treated with 2.5 mM MMS or 300 nM thapsigargin, as indicated. (A) Quantification of *BiP*, *HERPUD*, *ATF4* and *CHOP* mRNA levels by qPCR. (B) BiP protein levels in shNS and shAAG3 cells. (C) Quantification of BiP protein, levels were normalized to β actin and expressed relative to untreated control. (D) Quantification of BiP mRNA levels in GFP-AAG and GFP cells. (E) Cells as in (D) were treated with MMS or thapsigargin (TG) and BiP protein levels measured by immunoblotting. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

The role of AAG is specific for alkylation-induced ER stress

To gauge whether AAG might be important for other branches of the UPR, we analyzed the mRNA levels of ATF4 and DDIT3/CHOP, which are controlled through the PERK and ATF6 pathways (31). Both ATF4 and CHOP were induced by MMS in control T98G cells, but only ATF4 induction was reduced in AAG-depleted cells (Fig. 3A).

Next, we studied the effects of the ER stressor thapsigargin, which depletes ER Ca^{2+} by blocking SERCA ATPases (32). Experiments with T98G and A172 glioblastoma lines expressing varying levels of AAG showed that thapsigargin induced splicing of XBP1 (Fig. S5 A), the transcription of BiP, HERPUD1, ATF4 or CHOP (Fig. S5 B-F) and increased BiP protein expression (Fig. S5 G) in an AAG-independent manner. These

results are consistent with the model that AAG affects specifically alkylation-induced ER stress through a pathway that feeds into the XBP1 and likely the PERK branches of the UPR.

AAG-mediated UPR induction plays a role in survival to alkylation

Activation of the UPR has been proposed as a mechanism underpinning glioblastoma chemoresistance. Increased expression of XBP1 (33), PERK (34) and GRP78/BiP (35, 36) has been reported in glioblastoma tumours and cell lines. Moreover, UPR down regulation increases glioblastoma sensitivity to gamma radiation, etoposide and cisplatin (34, 35, 37) and ROS inducers (33). Finally, UPR inducing drugs sensitise glioblastoma cells to the alkylating agent temozolomide (36, 38).

In this context, we assessed clonogenic survival following alkylation treatment in AAG knockdown shAAG3 cells and in control T98G cells. AAG knockdown significantly decreased survival after treatment with MMS (Fig. 4A) or temozolomide (Fig. 4B). Importantly, cell survival was significantly reduced in AAG-depleted cells at doses of MMS and temozolomide that only modestly reduced viability in control cells. That decreased AAG levels correlate with increased alkylation sensitivity could be explained by a lower DNA repair capacity (17, 39) but contrast with multiple reports linking increased AAG levels with enhanced alkylation sensitivity (6). Nevertheless, our results showing that AAG is required for alkylation-induced UPR induction suggests alkylation sensitivity may not solely depend on DNA repair but also on the adaptive response induced by ER stress to promote survival.

To further address the biological relevance of alkylation-induced ER stress in this model, we next treated the glioblastoma cell lines with a non-toxic dose of temozolomide (0.2 μ M), either alone or in combination with salinomycin (0.1 μ M), an ionophore known to induce ER stress (40). Salinomycin treatment sensitizes glioblastoma cells to temozolomide, and survival after temozolomide and salinomycin co-treatment is reduced

in AAG-expressing cells (Fig. 4 C and D). Strikingly, AAG knockdown protects cells against salinomycin, alone or in combination with temozolomide, demonstrating that AAG-mediated UPR induction contributes to cytotoxicity in this cell type. Highlighting the importance of alkylation-induced UPR for cell survival, we also show that *Perk* wild-type cells are more sensitive to MMS than *Perk* knock-out cells (Fig. S6). Taken together, our data are consistent with the conclusion that alkylation, signaling through AAG, induces hallmarks of an ER stress response. Whether this cascade results in cell death is likely to depend on signal strength and timing, cell type and physiological context (31).

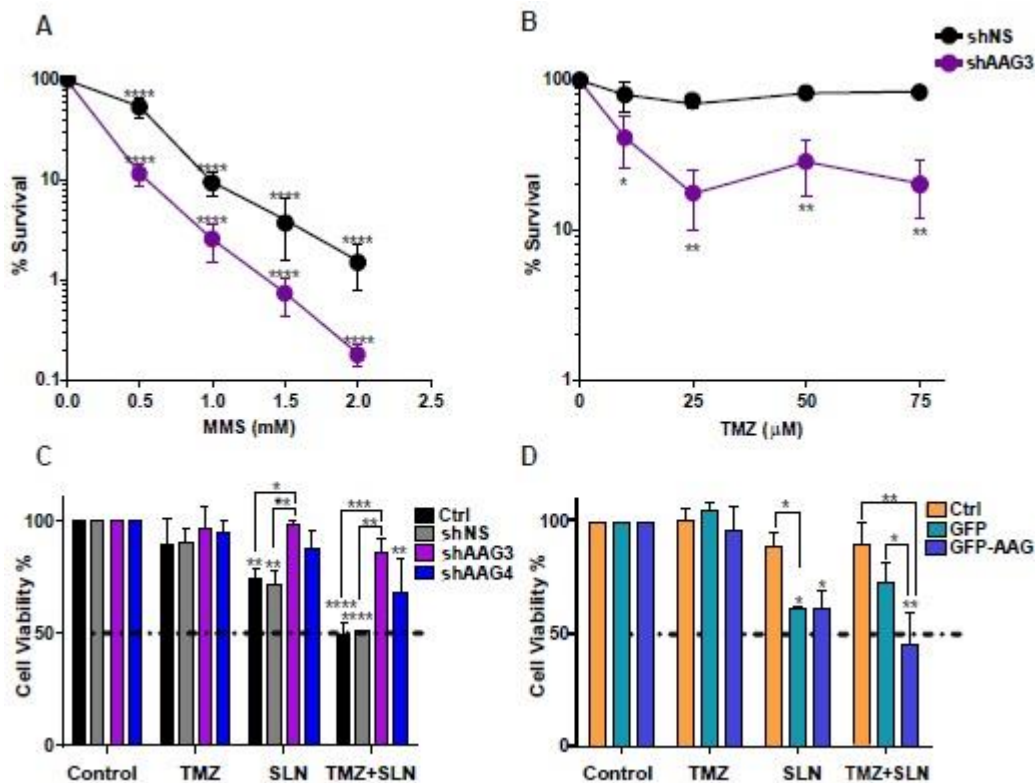


Fig. 4. AAG-mediated UPR induction plays a role in survival to alkylation. (A and B) Clonogenic survival for cells treated with MMS (0.5 to 2 mM) or temozolomide (TMZ, 10 to 75 µM). shAAG3 cells were more sensitive than shNS cells to (A) MMS or (B) temozolomide. (C and D) MTS survival for cells treated with temozolomide (0.2 µM) for 5 days singly or in combination with salinomycin (SLN, 0.1 µM). (C) MTS survival for shAAG3 and shAAG4 cells compared to wild type T98G (Ctrl) and shNS cells (D) MTS survival for cells overexpressing AAG (GFP-AAG) compared to cells with low endogenous AAG expression (Ctrl or GFP). *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001.

Discussion

Cancer chemotherapy relies on DNA damage induction by reactive compounds that are often also proteotoxic, thus increasing focus has been placed on the potential intersection between the UPR and genome damage response pathways. The present work uncovers a novel role for alkyladenine DNA glycosylase or AAG, a DNA repair enzyme, in the activation of the UPR in response to alkylating chemotherapeutic agents. We show here that alkylation treatment activates the UPR both in mouse liver and glioblastoma cells. Crucially, we find that the DNA repair protein AAG is a key factor modulating alkylation-induced UPR.

Alkylating agents target a variety of cellular macromolecules, including proteins. Although our study in the mouse liver examines alkylation-induced transcriptional reprogramming in repair deficient mice, they are mirrored by studies in *Saccharomyces cerevisiae* similarly showing transcriptional induction of the UPR by alkylation treatment (19, 41). Finally, UPR induction was shown to be important for alkylation survival in *Drosophila*, murine and human cell models (21, 25). Importantly, our work now shows that alkylation induces the UPR through a pathway that requires AAG and involves XBP1.

Up-regulation of UPR markers has been detected in glioblastoma and other cancer types, with implications for cancer progression and response to therapy. The IRE1/XBP1 branch is implicated in glioblastoma prognosis (42), potentially by promoting glioma infiltration and motility through the modulation of pro-angiogenic and pro-inflammatory chemokines (43, 44). While our results support a role for the IRE1/XBP1 branch in alkylation-induced UPR, we cannot rule out the participation of other pathways, namely PERK and ATF6. ATF6 reportedly affects glioblastoma development and radiotherapy resistance (37) while PERK is important for glioblastoma growth and survival (34). Given the importance of the UPR in cancer, a better understanding of how

AAG affects alkylation-induced UPR could advance efforts for therapeutically targeting ER stress/UPR in cancer.

Our gene expression analyses in the MMS-treated mouse liver show that the transcriptional response to alkylation treatment is profoundly reduced in the absence of Aag. Besides the enrichment for ER stress/UPR related transcripts, and the overlap with multiple gene-sets induced by ER-stress inducing drugs (Figure S1), we find that genes induced by MMS in wild-type liver also significantly overlap with single gene perturbations associated with specific biological phenotypes related to ER redox homeostasis (overexpression of *ERO1L*), UPR (*H6pd* knock-out) and recovery from inflammation and toxicity (*Socs3*, *Mat1a* and *Txnrd1* knock-outs) (Dataset S1). In contrast, Aag deficient mice do not exhibit alterations in the expression of these markers of tissue injury. This is consistent with previous work showing that *Aag* knockout protects from alkylation-induced cell death (14, 15), and with a role for Aag in promoting alkylation-induced tissue injury.

AAG-mediated alkylation-induced toxicity is rescued in animals that lack Parp-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1) (14). PARP-1 is activated at SSBs, to synthesize a polymer of ADP-ribose onto itself plus acceptor proteins usually associated with DNA transactions, consuming NAD⁺ in the process and shaping cellular outcome to a variety of stress conditions (45, 46). It is thought that AAG-mediated BER initiation followed by DNA strand cleavage induces PARP-1 activation that results in tissue damage by depleting cells of energy, which leads to necrosis. However, to what degree other pathways of cell death induction contribute to alkylation-induced tissue damage is currently unclear. Our results, highlighting a role for AAG in alkylation-dependent UPR induction, raise the possibility that AAG-dependent activation of the UPR could contribute to alkylation-induced cell death and tissue damage. PARP-1 has been previously shown to promote enhanced activity of the 20S proteasome in response to oxidative damage,

thus contributing to removal of oxidised nuclear proteins (47, 48). Whether PARP-1 plays a similar role in response to alkylated proteins remains to be determined.

How might AAG affect the UPR? As mentioned above, AAG-dependent DNA damage detection and/or processing, potentially through PARP-1, may drive cellular stress responses. Alkylation-induced ER stress could also result from dysfunctional mRNA transcription caused by repair intermediate accumulation leading to transcriptional stalling (49) and consequently an increase in defective proteins in the ER. Additionally, mitochondrial AAG activity could play a role in UPR induction (50). In support of the latter, mitochondrial OGG1 expression, a DNA glycosylase for oxidized bases in DNA, protects skeletal muscle and liver from ER stress and autophagy induced by high fat diet (51). Conversely, AAG could have repair-independent function(s) modulating the UPR. AAG interacts with proteins with known roles in transcriptional modulation and/or ubiquitin mediated proteolytic pathways, including HR23A, HR23B, p53 and oestrogen receptor alpha (52–54). AAG could affect the UPR through its interaction with proteins important for ER stress response or transcriptional control in general.

DNA repair and the UPR have been previously reported to cooperate in response to cellular stress. In particular, an important subset of XBP1 targets are DNA repair genes (55). ER stress induction was reported to modulate expression of DNA repair proteins, including AAG (56, 57). Further, pharmacological ER stress induction potentiated the cytotoxic effects of temozolomide in glioblastoma cells (56, 57). These results implicate ER stress/UPR in DNA repair modulation and suggest the two pathways can cooperate in stress response. However, a detailed characterization of this relationship is lacking and until our work, there was no evidence that a DNA repair enzyme can directly modulate ER stress responses.

Together, our results demonstrate a novel role for the DNA repair enzyme AAG in alkylation-induced UPR activation. We anticipate that a detailed mechanistic dissection

of this novel stress response crosstalk will lead to a better understanding of cellular outcomes upon alkylation exposure and may shape future advances in the prevention and treatment of cancer and other age-related diseases.

Materials and methods

Materials. MMS, puromycin, salinomycin, temozolomide and DMEM low glucose were from Sigma (St. Louis, MO). Cell culture reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Mice. *Aag* null mice were described previously (58). Details about animal experiments are described in *Supporting Methods*. The MIT Committee for Animal Care (CAC) approved all animal procedures; at the University of Surrey, all protocols were approved by the local Animal Welfare Ethical Review Body and carried out under UK Home Office License in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986.

Microarray processing and data analysis. Messenger RNA was isolated, amplified and hybridized onto Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430A 2.0 arrays according to the protocols suggested by Affymetrix (Santa Clara, CA). Data were analysed using R/Bioconductor as described in *Supporting Methods*.

Plasmids. Plasmid pEGFP-hAAG was generated by cloning the XhoI flanked AAG cDNA from pCAGGS-hAAG (59), into pEGFP-C3 (Clontech, Takara BioUSA, Inc). Lentiviral shRNA plasmids based on pGIPZ were purchased from Dharmacon; insert sequences are listed in Supplemental Table S1.

Cell culture. A172 and T98G human glioblastoma cell lines were obtained from ATCC, were free from mycoplasma contamination and always used from a young stock. Experimental details related to cell culture and cell line development are described in *Supporting Methods*.

AAG Activity assay. AAG activity was determined using an oligonucleotide plate based assay described in *Supporting Methods*.

XBP1 Splicing and expression analysis Quantitative and qualitative PCR methods and reagents are described in *Supporting Methods*.

Immunoblotting For details on immunoblotting and antibodies, see *Supporting Methods*.

Statistical analysis. Unless otherwise stated, results are presented as mean \pm standard error of the mean and analyses are results of three or more independent experiments. Two-way ANOVA was used to determine significance, followed either by post-hoc Dunnett or Tukey test for multiple comparisons when appropriate; significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical calculations were performed with GraphPad Prism software, Version 6.0.

Acknowledgments. We thank Rebecca Fry, Katherine Pease, Jennifer Calvo, Fugen Li and Stuart Levine (MIT BioMicroCenter) for help with the initial stages of the gene expression analysis. We thank Miriana Machado (UFRGS, Brazil) for clerical support and Ron Wek (Indiana University School of Medicine, USA) for the *PERK* knockout cells. The National Institutes of Environmental Health Sciences (ES11399) funded work performed at MIT. Work otherwise supported by the Royal Society (RC3532) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 400557/2013-4 and 207503/2015-0). LM, CFC and RA are recipients of SwB studentships (CNPq). Qassim University (KSA) supported AA. LBM was supported by an international visiting professorship grant (CNPq). The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vihervaara A, Duarte FM, Lis JT (2018) Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. *Nat Rev Genet* 19(6):385–397.
2. Maynard S, Fang EF, Scheibye-Knudsen M, Croteau DL, Bohr VA (2015) DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(10):a025130.
3. Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, Bordignon V, Agellon LB (2015) Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer. *Front Oncol* 5:11.
4. Hetz C, Papa FR (2018) The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell* 69(2):169–181.

5. Drabløs F, et al. (2004) Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* 3(11):1389–1407.
6. Fu D, Calvo JA, Samson LD (2012) Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* 12(2):104–20.
7. Fajen JM, et al. (1979) N-nitrosamines in the rubber and tire industry. *Science* 205(4412):1262–4.
8. Andrzejewski P, Kasprzyk-Hordern B, Nawrocki J (2005) The hazard of N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation during water disinfection with strong oxidants. *Desalination* 176(1–3):37–45.
9. Liu C, et al. (2009) Cured meat, vegetables, and bean-curd foods in relation to childhood acute leukemia risk: A population based case-control study. *BMC Cancer* 9(1):15.
10. Tong M, et al. (2009) Nitrosamine exposure causes insulin resistance diseases: Relevance to type 2 diabetes mellitus, non-alcoholic steatohepatitis, and alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 17:827–844.
11. De La Monte SM, Tong M (2009) Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: Potential relevance to sporadic alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 17:817–825.
12. O'Brien PJ, Ellenberger T (2004) Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279(11):9750–7.
13. Dianov GL, Hübscher U (2013) Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. *Nucleic Acids Res* 41(6):3483–3490.
14. Calvo JA, et al. (2013) Aag DNA Glycosylase Promotes Alkylation-Induced Tissue Damage Mediated by Parp1. *PLoS Genet* 9(4):e1003413.
15. Meira LB, et al. (2009) Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(3):888–93.
16. Meira LB, et al. (2008) DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest* 118(7):2516–25.
17. Agnihotri S, et al. (2012) Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Invest* 122(1):253–266.
18. Fosmark S, et al. (2017) APNG as a prognostic marker in patients with glioblastoma. *PLoS One* 12(6):e0178693.
19. Jelinsky SA, Samson LD (1999) Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1486–91.
20. Wang XZ, et al. (1996) Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* 16(8):4273–80.
21. Zanutto-Filho A, et al. (2016) Combined Gene Expression and RNAi Screening to Identify Alkylation Damage Survival Pathways from Fly to Human. *PLoS One* 11(4):e0153970.
22. Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C (2016) Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in cancer* 2(5):252–262.
23. Kuleshov M V., et al. (2016) Enrichr: a comprehensive gene set enrichment

- analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* 44(W1):W90–W97.
24. Chen EY, et al. (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14(1):128.
 25. Zanotto-Filho A, et al. (2016) Alkylating Agent-Induced NRF2 Blocks Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis via Control of Glutathione Pools and Protein Thiol Homeostasis. *Mol Cancer Ther* 15(12):3000–3014.
 26. Gregor MF, et al. (2013) The Role of Adipocyte XBP1 in Metabolic Regulation during Lactation. *Cell Rep* 3(5):1430–1439.
 27. Argemí J, et al. (2017) X-box Binding Protein 1 Regulates Unfolded Protein, Acute-Phase, and DNA Damage Responses During Regeneration of Mouse Liver. *Gastroenterology* 152(5):1203–1216.
 28. Brignull LM, et al. (2013) Reprogramming of lysosomal gene expression by interleukin-4 and Stat6. *BMC Genomics* 14:853.
 29. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell* 107:881–891.
 30. Weller M, et al. (2014) EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol* 15(9):e395-403.
 31. Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A (2009) Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 625(1–3):234–246.
 32. Bi M, et al. (2005) ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J* 24(19):3470–81.
 33. Liu Y, et al. (2011) Targeting X box-binding protein-1 (XBP1) enhances sensitivity of glioma cells to oxidative stress. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37(4):395–405.
 34. Hou X, et al. (2015) PERK silence inhibits glioma cell growth under low glucose stress by blockage of p-AKT and subsequent HK2's mitochondria translocation. *Sci Rep* 5:9065.
 35. Lee HK, et al. (2008) GRP78 is overexpressed in glioblastomas and regulates glioma cell growth and apoptosis. *Neuro Oncol* 10(3):236–243.
 36. Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67(20):9809–16.
 37. Dadey DYA, et al. (2016) The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. *Oncotarget* 7(2):2080–92.
 38. Epple LM, et al. (2013) Induction of the Unfolded Protein Response Drives Enhanced Metabolism and Chemoresistance in Glioma Cells. *PLoS One* 8(8):e73267.
 39. Svilar D, et al. (2012) Alkylation sensitivity screens reveal a conserved cross-species functionome. *Mol Cancer Res* 10(12):1580–96.
 40. Li T, et al. (2013) Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. *Autophagy* 9(7):1057–1068.

41. Jelinsky SA, Estep P, Church GM, Samson LD (2000) Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol Cell Biol* 20(21):8157–67.
42. Pluquet O, et al. (2013) Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α . *Cancer Res* 73(15):4732–43.
43. Jabouille A, et al. (2015) Glioblastoma invasion and cooption depend on IRE1 α ; endoribonuclease activity. *Oncotarget* 6(28):24922–24934.
44. Auf G, et al. (2010) Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(35):15553–8.
45. Eliasson MJ, et al. (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3(10):1089–95.
46. Yu S-W, et al. (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48):18314–9.
47. Ullrich O, et al. (1999) Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11):6223–8.
48. Catalgol B, et al. (2010) Chromatin repair after oxidative stress: Role of PARP-mediated proteasome activation. *Free Radic Biol Med* 48(5):673–680.
49. Edenberg ER, Downey M, Toczyski D (2014) Polymerase Stalling during Replication, Transcription and Translation. *Curr Biol* 24(10):R445–R452.
50. van Loon B, Samson LD (2013) Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) localizes to mitochondria and interacts with mitochondrial single-stranded binding protein (mtSSB). *DNA Repair (Amst)* 12(3):177–187.
51. Yuzefovych L V., LeDoux SP, Wilson GL, Rachek LI (2013) Mitochondrial DNA Damage via Augmented Oxidative Stress Regulates Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy: Crosstalk, Links and Signaling. *PLoS One* 8(12):e83349.
52. Miao F, et al. (2000) 3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins. *J Biol Chem* 275:28433–28438.
53. Likhite VS, Cass EI, Anderson SD, Yates JR, Nardulli AM (2004) Interaction of estrogen receptor alpha with 3-methyladenine DNA glycosylase modulates transcription and DNA repair. *J Biol Chem* 279(16):16875–82.
54. Liang C, et al. (2013) Identification of UHRF1/2 as new N-methylpurine DNA glycosylase-interacting proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 433:415–419.
55. Acosta-Alvear D, et al. (2007) XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* 27(1):53–66.
56. Xipell E, et al. (2016) Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. *Neuro Oncol* 18(8):1109–1119.
57. Weatherbee JL, et al. (2016) ER stress in temozolomide-treated glioblastomas interferes with DNA repair and induces apoptosis. *Oncotarget* 7(28):43820–43834.
58. Engelward BP, et al. (1997) Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):13087–92.

59. Klapacz J, et al. (2010) Frameshift Mutagenesis and Microsatellite Instability Induced by Human Alkyladenine DNA Glycosylase. *Mol Cell* 37:843–853.



Supplementary Information for

A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress

Larissa Milano ^{1,4}, Clara F. Charlier ², Rafaela Andreguetti ², Abdullah Aljohani ², Eleanor Healing ³, Marcos P. Thomé ^{4,5}, Ruan Elliott ³, Leona D. Samson ⁶, Guido Lenz ^{4,5}, João Antonio P. Henriques ^{4,5}, Axel Nohturfft ⁷ and Lisiane B. Meira ^{1,2}

Corresponding author : Lisiane B. Meira

Email: l.meira@surrey.ac.uk

This PDF file includes:

Supplementary text
Figs. S1 to S6
Tables S1 to S2
References for SI reference citations

Other supplementary materials for this manuscript include the following:

Datasets S1 – Gene enrichment analysis

Supplementary Information Text

Material and Methods

Animal Experiments. Wild type and *Aag* null 6-8 week old male mice were used. Mice were fed standard diet *ad libitum* and housed in accredited facilities at MIT and the University of Surrey. Euthanasia was by CO₂ asphyxiation.

MMS treatment of mice. MMS was dissolved in 10% ethanol in phosphate-buffered saline (PBS). Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with solvent or a single dose of 75 mg MMS per kg body weight, a dose known to be sub-lethal to both *Aag*-null and wild-type animals (1). Whole liver (mixtures of all 5 different liver lobes) was collected 6 h after treatment, cut into pieces, flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing.

Microarray processing and data analysis. Raw data background correction (RMA method), normalization (qspline method), probe specific correction, and summary value computation were performed using the `affy::expresso` function in R [PMID: 14960456]. Differential gene expression was studied using `limma` [PMID: 25605792], applying a minimum log₂ fold change of 1.75 and a maximum adjusted p value (false discovery rate [FDR] method) of 0.05. Lists of differentially expressed genes were analysed for enrichment (hypergeometric test) with prior knowledge categories using 89 gene-set libraries from the `enrichr` website [PMID:23586463] [PMID:27141961]; p values were corrected for multiple hypothesis testing using the FDR method. Microarray data have been deposited on GEO (GSE115254). R scripts and additional data files used in this study are available on figshare [<https://doi.org/10.24376/rd.sgul.6429092>] [Link while manuscript is under review: <https://figshare.com/s/8ab1e67261965796151b>].

Cell culture and cell line construction. Medium A refers to DMEM low glucose containing 10% foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine. Cells were grown in medium A at 37°C in 5% CO₂. Lentivirus expressing AAG shRNAs were produced as described previously (2), followed by infection of T98G cells and selection in medium A plus 1 µg/mL puromycin. A172/hAAG cells, stably expressing EGFP-hAAG, were generated by Lipofectamine LTX (Invitrogen) mediated transfection of A172 cells with pEGFP-hAAG, followed by selection in medium A plus 600 µg/ml G418.

Cell treatment and Survival determination. Clonogenic survival assays were performed as described (3). Briefly, cells were plated and treated with MMS (0.5-2mM) for 1 h or temozolomide (10 to 75µM) for 5 days. After 14 days, colonies were fixed with methanol and stained with 0.1% crystal violet. Colonies containing >50 cells were scored and the percent survival calculated relative to untreated control. For viability, cells were pre-treated with salinomycin (0.1 µM) for 24 hours and then temozolomide treated in the presence of salinomycin for 5 days. Cell viability was determined after treatment using the MTS-based CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, #G3580).

AAG Activity assay. Briefly, nuclear extracts were prepared from cells for AAG activity analysis using a NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit and the concentration of protein in the extracts determined using the MicroBCA kit according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK). Synthetic oligonucleotides HX02 (sequence 5' Phos-CACGAITCAACTCAGCAACTCC*T*T-NH₂ 3',

where Phos indicates a phosphate modification, I indicates an internal inosine, * indicates a phosphorothioate linkage between nucleotides and NH₂ indicates an amino group modification) and Loop01A (5' Flc-T*T*GGAGTTGCTGAGTTGATTCGTGAGCACCAACCGGTGCT 3', where Flc indicates a fluorescein modification) were synthesized and HPLC purified by Integrated DNA technologies (Leuven, Belgium). HX02 was covalently coupled to the surface of the wells of clear 96-well Nunc Immobilizer™ plates (ThermoFisher Scientific, Loughborough, UK) by overnight incubation with 100µl/well of a 0.5nM solution of the oligonucleotide in bicarbonate buffer, pH9.6. Loop01A was hybridized to the HX02 immobilized in the wells and the two oligonucleotides ligated together by treatment with T4 DNA ligase (Promega, Southampton, UK) to form a single intact hairpin loop structure containing a hypoxanthine residue as the substrate for hAAG. The substrate immobilized in the wells was incubated at 37°C for 1 hour with either recombinant hAAG (New England Biolabs, Hitchin, UK) at serial dilutions or with the different nuclear extracts diluted in DNA glycosylase buffer (20mM Tris HCl (PH 7.5), 100mM KCl, 5mM EDTA, 1mM EGTA, 5mM β-mercaptoethanol, 2µg/ml herring sperm DNA). Following the repair incubation, the substrate was denatured by incubating with 0.1M NaOH/0.1 x saline-sodium citrate buffer for 30 minutes at 75°C. Fluorescein retained in the wells after denaturation was detected using goat anti-fluorescein horseradish peroxidase conjugate (Abcam, Cambridge, UK) and TMB Microwell Peroxidase Substrate for horseradish peroxidase (KPL, Wembley, UK). The colour development reaction was terminated by addition of 2M phosphoric acid and absorbance for each well determined at 450nm. The activity of AAG in the nuclear extracts was determined by interpolation from the recombinant hAAG enzyme standard curve. (Healing E., Submitted)

XBP1 Splicing The detection of XBP1u (unspliced) and XBP1s (spliced) transcripts was performed as described in (4), except that Go Taq Green (Promega) was used, and PCR products were resolved on a 2.5% agarose gel.

mRNA Expression Analysis RNA was extracted using the PureLink RNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) and first strand cDNA was synthesized using the Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA amplification was done using SYBR Green Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and quantitative real-time PCR was performed using QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA). All experiments were performed with biological and technical triplicates. Results were generated using the comparative Ct method and are expressed as fold change relative to the untreated control (5). A complete list of primers used in this study is shown in Table S2.

Immunoblotting Cells were lysed with M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), supplemented with 1X Phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 1x protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Protein concentration was determined using the BCA assay (Pierce). Total protein lysates (20 µg) were separated under denaturing conditions in 4-20% True-PAGE (Sigma-Aldrich) gels. Proteins were then transferred onto PVDF membranes (Life Technologies). Membranes were blocked in 1% nonfat milk and incubated overnight with specific antibodies at 4 °C. Antibodies were as follows: β-actin (1:10,000 dilution; ab52614, Abcam), AAG (1:500 dilution; HPA006531, Sigma-Aldrich), BiP (1:1,000 dilution; 3183S, Cell Signaling). After primary antibody incubation,

membranes were washed and then incubated with the secondary antibodies IRDye 680RD green goat anti-rabbit IgG and IRDye 800CW red goat anti mouse IgM (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) at 1:10,000, for 1 hour at room temperature. Proteins were detected using the Odyssey CLx IR imaging system (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

Supplemental Figure S2

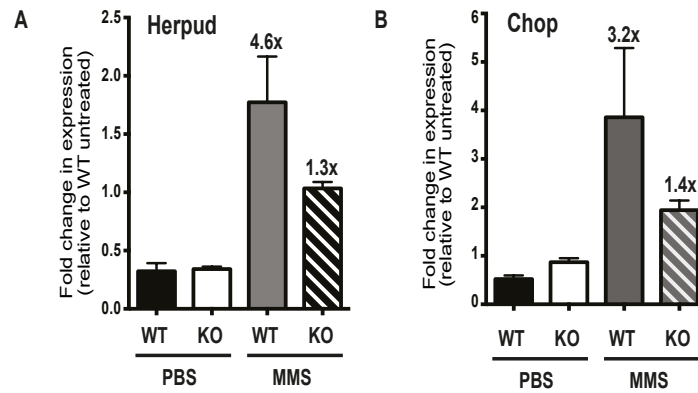


Fig. S2. Aag is required for induction of UPR markers in MMS-treated mouse liver. *Herpud* expression (A, $p < 0.0001$) and *Chop* expression (B, $p = 0.0017$) was quantified by qPCR in MMS-treated mouse liver. *Herpud* and *Chop* induction is significantly altered by Aag status ($p = 0.03$). The values are fold change in expression relative to mean expression in WT untreated ($n = 5$ /group, error bars represent mean \pm SEM).

Supplemental Figure 3

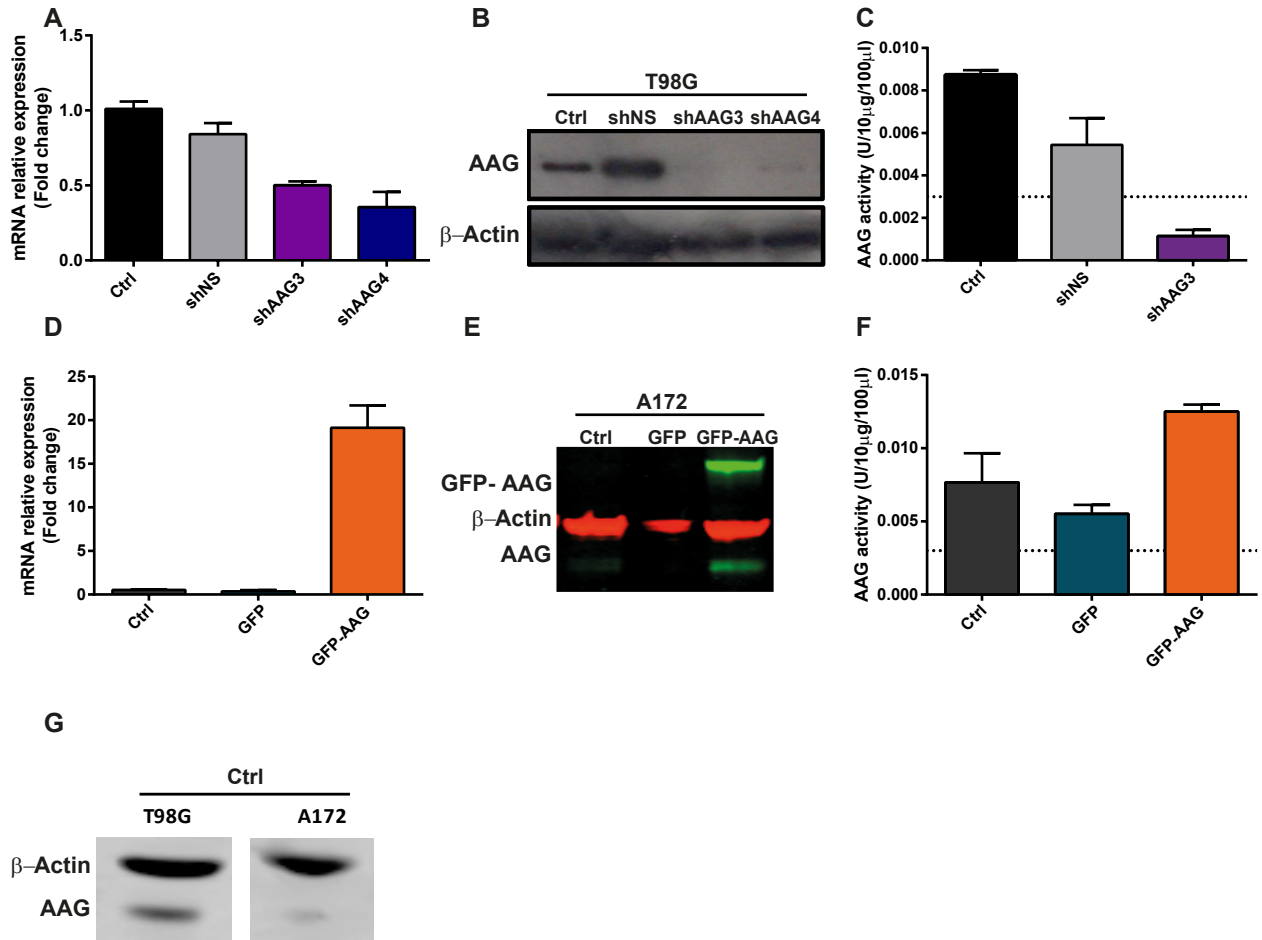


Fig. S3. Characterization of AAG expression and activity in glioblastoma cells engineered to express different AAG levels. T98G cells were transduced with viral particles produced from pGIPZ Lentiviral shRNA system for AAG knock down. (A) AAG mRNA levels in parental T98G (Ctrl), non-silenced control shNS and AAG knockdown shAAG3 and shAAG4 cells. (B) AAG protein levels were quantified in whole cell lysates by immunoblotting. (C) AAG activity was quantified in nuclear lysates. For AAG overexpression, A172 cells were transfected with either pEGFP-C3 expressing the human AAG gene (GFP-AAG) or empty pEGFP-C3 plasmids (GFP). (D) AAG mRNA levels measured by qPCR in parental A172 (Ctrl), A172 cells expressing pEGFP-C3 empty vector (GFP) and stable overexpressing human AAG (GFP-AAG). (E) AAG protein levels were measured in whole cell lysates by immunoblotting. (F) AAG activity was measured in nuclear lysates. (G) Comparison of endogenous AAG protein levels in parental A172 and T98G cell lines.

Supplemental Figure 4

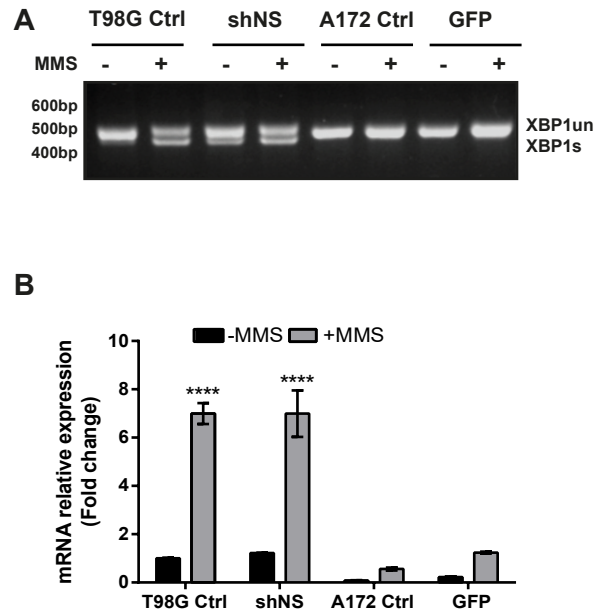


Fig. S4. Higher endogenous AAG levels in T98G correlate with increased XBP1 splicing after MMS treatment. MMS induced XBP1 splicing in T98G and A172 parental cell lines and respective controls as measured by (A) RT-PCR and (B) qPCR. **** $P < 0.0001$

Supplemental Figure 5

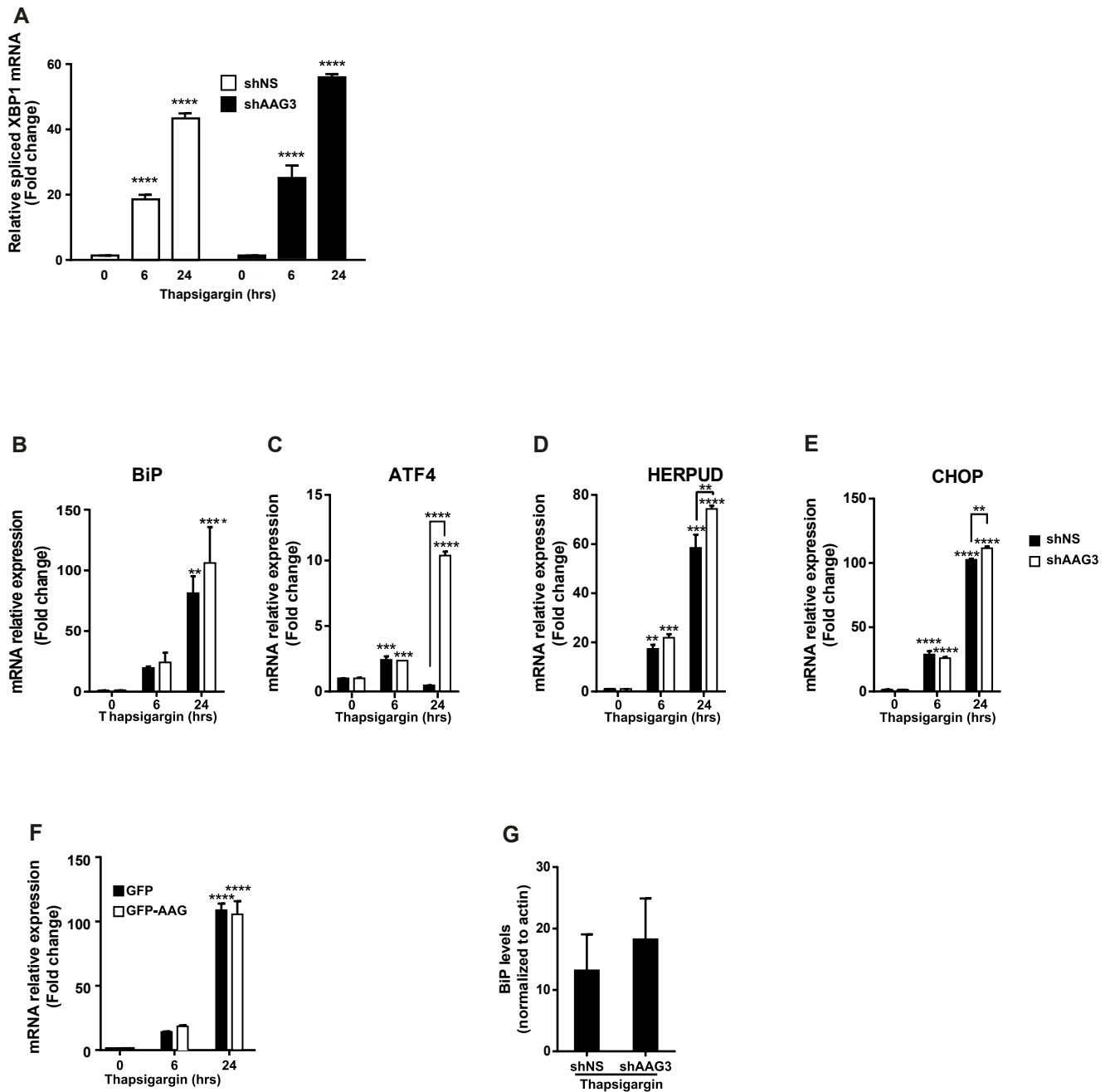


Fig. S5. AAG-mediated UPR induction is specific for alkylation treatment. (A) Thapsigargin (300 nM) induces similar levels of XBP1 splicing in both non-silenced control shNS and AAG knockdown shAAG3 cells. (B – E) Quantification of mRNA levels after thapsigargin treatment for (B) BiP, (C) ATF4, (D) HERPUD and (E) CHOP by qPCR in shNS and shAAG3 cells. (F) Thapsigargin induces comparable BiP expression in cells stably transfected with pEGFP-C3 expressing the human AAG gene (GFP-AAG) or empty pEGFP-C3 plasmids (GFP). (G) BiP protein levels were quantified by immunoblotting in thapsigargin treated shNS and shAAG3 cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Supplemental Figure 6

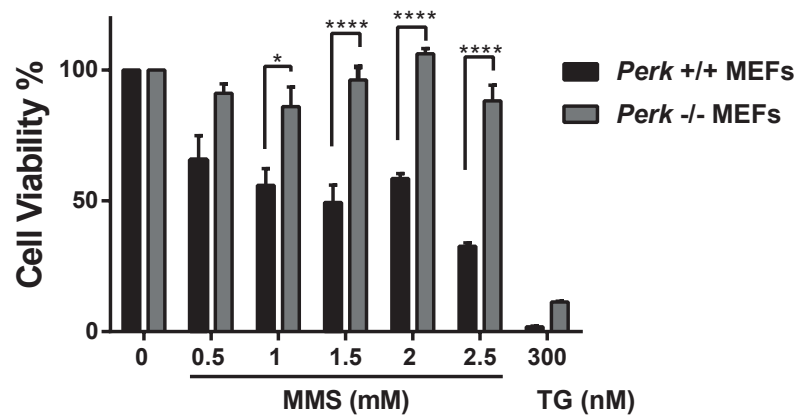


Fig. S6. *Perk* knockout protects cells from alkylation-induced cytotoxicity. Cell viability of *Perk*^{+/+} and *Perk*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) 72 hrs after MMS treatment was assessed by the MTS assay. **P* < 0.05 ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

Table S1. shRNA sequences used for silencing.

V3LHS_343111: ACAGCTTCATCCTGTGCCA
V3LHS_343113: TCATGCAGAAGTACATGCC
V3LHS_343114: CTAGCTGGTCGCTGCTTCT
V3LHS_343116: CATGCAGAAGTACATGCCG

Table S2. RT-qPCR primers.

<i>ACTB</i> (NM_001101)	Fwd 5' ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA 3' Rev 5' GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA 3'
<i>AAG</i> (NM_001015054)	Fwd 5' CCC CGC AAC CGA GGC ATG TT 3' Rev 5' AGC AAG ACG CAA GCC CCG TC 3'
<i>ATF4</i> (NM_001675)	Fwd 5' TTCTCCAGCGACAAGGCTAAGG 3' Rev 5' CTCCAACATCCAATCTGTCCCG 3'
<i>HSPA5</i> (NM_005347)	Fwd 5' CTGTCCAGGCTGGTGTGCTCT 3' Rev 5' CTTGGTAGGCACCACTGTGTTC 3'
<i>XBP1s</i> (NM_005080)	412–431 5' CCTTGTAGTTGAGAACCAGG 3' 834–853 5' GGGGCTTGGTATATATGTGG 3'
<i>HERPUD1</i> (NM_001010989)	Fwd 5' CCAATGTCTCAGGGACTTGCTTC 3' Rev 5' CGATTAGAACCAGCAGGCTCCT 3'
<i>DDIT3</i> (NM_004083)	Fwd 5' GGTATGAGGACCTGCAAGAGGT 3' Rev 5' CTTGTGACCTCTGCTGGTTCTG 3'
<i>Actb</i> (NM_007393)	Fwd 5' CATTGCTGACAGGATGCAGAAGG Rev 5' TGCTGGAAGGTGGACAGTGAGG
<i>Herpud1</i> (NM_022331)	Fwd 5' CCTCCAAAATGCCAGAAACCAGC Rev 5' GCCGTAAACCATCACTTGAGGAG
<i>Ddit3</i> (NM_007837)	Fwd 5' GGAGGTCCTGTCCTCAGATGAA Rev 5' GCTCCTCTGTCAGCCAAGCTAG

Additional dataset S1 (separate file)

Gene-set enrichment analyses

References

1. Roth RB, Samson LD (2002) 3-Methyladenine DNA glycosylase-deficient Aag null mice display unexpected bone marrow alkylolation resistance. *Cancer Res* 62(3):656–60.
2. Tamajusuku ASK, et al. (2010) Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *J Cell Biochem* 109(5):983–991.
3. Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1(5):2315–9.
4. Harding HP, et al. (2005) Bioactive small molecules reveal antagonism between the integrated stress response and sterol-regulated gene expression. *Cell Metab* 2(6):361–371.
5. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3(6):1101–1108.

5. CAPÍTULO III – “Enhancement of temozolomide cytotoxicity by pharmacological induction of endoplasmic reticulum stress occurs in an AAG-dependent manner”.

Neste artigo original, a ser submetido para publicação no periódico *Oncology reports*, exploramos a relação da AAG no UPR através do tratamento combinado de TMZ com a indução farmacológica do estresse de RE. Utilizando nosso painel de células de GBM com níveis de AAG modulados, reportamos aqui que a citotoxicidade induzida pelo tratamento combinado de salinomicina e TMZ ocorre através da ativação do UPR é dependente dos níveis de AAG. A combinação dos dois fármacos aparece como uma potencial estratégia para a quimioterapia em GBM e indica mais uma vez o envolvimento de AAG na ativação do UPR.

Oncology reports

Enhancement of temozolomide cytotoxicity by pharmacological induction of endoplasmic reticulum stress depends on the repair enzyme alkyladenine DNA glycosylase

Larissa Milano ^{1,3}, Caroline Vieira ¹, Guido Lenz ^{1,2}, Lisiane B. Meira ^{3#} and João Antonio P. Henriques ^{1,2#}

¹ Department of Biophysics and ² Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ³ Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK

#Contributed equally

Corresponding authors:

Lisiane B. Meira, Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, GU2 7XH, UK, email: l.meira@surrey.ac.uk

João Antonio P. Henriques, Department of Biophysics, Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, email: pegas.henriques@gmail.com

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly malignant brain tumour that is currently incurable. The alkylating agent temozolomide (TMZ) is the primary treatment for glioblastoma, in conjunction with ionizing radiation. While chemosensitivity to TMZ is chiefly mediated by the cellular ability to repair DNA damage, mechanisms activated in response to protein damage are increasingly recognised as pivotal for the overall survival to TMZ. Thus, targeting multiple stress response pathways may represent a viable strategy to improve GBM treatment. We have previously shown that alkylation treatment induces endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR), an intricate signaling cascade aiming to restore ER homeostasis, in a process dependent on the DNA repair protein alkyladenine DNA glycosylase (AAG). We therefore investigated if treatment with salinomycin (SLN), an ER stress-inducing agent, increases TMZ cytotoxicity in AAG expressing cells. Combination SLN and TMZ treatment resulted in UPR activation and increased cytotoxicity in AAG proficient cells, in comparison to single treatments. Conversely, AAG-deficient cells were resistant to SLN, singly or in combination with TMZ, and showed impaired UPR activation. Our data indicates that AAG-dependent UPR activation is necessary for the increased chemosensitivity of glioblastoma to pharmacological ER stress activation in combination with temozolomide. We suggest the combination of TMZ and SLN would be an effective strategy in GBM treatment.

Keywords: Temozolomide, salinomycin, DNA glycosylase, AAG/MPG, endoplasmic reticulum stress, unfolded protein response, autophagy, glioblastoma

Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common form of malignant brain tumour, considered as a devastating disease that still currently incurable (1). GBM patients undergo a rigorous standard treatment including surgery, concomitant radiation and chemotherapy using the oral alkylating agent temozolomide (TMZ), but median survival is only 14.6 months (2,3). The most frequent type of alkylation induced lesion by temozolomide is N7-methylguanine (7meG), accounting for 60-80% of the lesion burden, followed by the biologically significant lesion *O*⁶-methylguanine (*O*⁶meG) and N3-methyladenine (3meA) representing 5-10% and 10-20% of temozolomide-induced lesions, respectively (4). Two main repair pathways act on *O*⁶-meG and 3meA: direct reversion by *O*⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) and DNA base excision repair (BER) initiated by the enzyme N-methylpurine DNA glycosylase (MPG, also called alkyladenine DNA glycosylase or AAG). Both mechanisms are pivotal to the cellular responses to alkylation and affect the overall survival of GBM patients. Methylation of the MGMT promoter, which results in MGMT silencing and absence of *O*⁶meG repair, leads to better outcome for patients treated with temozolomide (5). On the other hand, higher expression of AAG and MGMT have been associated with resistance to temozolomide (6,7).

Overcoming resistance to temozolomide could significantly improve patient outcome and therefore alternative therapeutic strategies for temozolomide-resistant GBM are necessary. Combining alkylating agents to the modulation of other stress response pathways in the cell, such as the endoplasmic reticulum (ER) stress response, has emerged as one of the strategies to achieve this purpose (8,9).

Under adverse conditions, such as hypoxia, calcium misbalance, nutrient deprivation, misfolded and unfolded proteins accumulate in the ER generating stress (10). In order to maintain proteostasis, activation of the unfolded protein response (UPR) by ER stress induction leads to an orchestrated response to reduce the protein load and increase the

folding capacity in the ER. ER-resident transmembrane proteins initiate the UPR: inositol-requiring kinase 1 (IRE1 α), activating transcription factor 6 (ATF6) and protein kinase-like ER kinase (PERK). While these transducer proteins are negatively regulated by chaperones such as binding immunoglobulin protein (BiP) in healthy cells, increased ER dysregulation causes chaperone dissociation thus eliciting the response (11).

The UPR can promote an adaptive response and cell survival under moderate ER stress or, upon severe stress, it activates cell death (12). In addition to apoptotic cell death, activation of this pathway can also induce autophagy to remove the unfolded proteins from the ER (13). Furthermore, activation of the UPR contributes to cancer development and response to therapy (14).

One of the drugs shown to induce ER stress and synergize with TMZ increasing antitumoral activity is salinomycin (SLN), a K (+) /H (+) ionophore (8,15). The cell death mechanism induced by SLN is still poorly understood but has been reported to occur through apoptosis, autophagic cell death and necrosis (16–22).

In the current study, we set out to evaluate if modulation of the DNA repair enzyme AAG affects the enhancement of TMZ anti-tumoral activity by ER stress pharmacological induction. Our results demonstrate that cytotoxicity induced by SLN combined to TMZ occurs by UPR activation in an AAG-dependent manner in GBM cells. In addition, this combination also promotes cell death by excessive ER stress and impaired autophagic induction, but only in AAG-expressing cells. In our experimental system, AAG was at the crossroads of two different modalities of stress: DNA damage and ER stress. Therefore, understanding the biological underpinnings of AAG in UPR activation could shed light on the various processes involved, providing strong rationale for new approaches to improve GBM treatment.

Results

Lower levels of AAG provide resistance to ER stress-inducing drugs in GBM cells

Previously, we demonstrated that AAG modulation alters ER stress response upon alkylation treatment (23). Since ER stress-inducing drugs have been shown to enhance TMZ antitumour activity through modulation of DNA repair components (8), we decided to test it associated to AAG status. GBM T98G cells express higher endogenous AAG levels when compared to A172 cells, as previously shown (7,23). Firstly, we confirmed the higher alkylation sensitivity of cells with lower AAG levels by comparing cell viability in the A172 and T98G cells after treatment with TMZ and methyl methane sulfonate (MMS). A172 cells were slightly more sensitive to TMZ and MMS than T98G cells, although the difference in sensitivity between the cell lines was not significant (Figure 1A and B). To investigate whether pharmacological induction of ER stress also affects survival of T98G and A172 cells, cells were treated with the ER stress inducers thapsigargin (TG), an inhibitor of SERCA ATPases (24), or SLN (15). TG, reduced viability to 14% in T98G and 66% in A172 cells, after 5 days of 0.3 μ M treatment ($P \leq 0.0001$) while 0.1 μ M of SLN reduced viability in T98G and A172 cells to 71% and 89%, respectively (ns) (Figure 1C and D).

Next, to further interrogate whether AAG plays a role in the ER stress response in general and not only in response to alkylation treatment, a panel of GBM cells where AAG is either overexpressed or knocked down (23) were interrogated for their ability to survive increasing concentrations of SLN. Cells expressing AAG, T98G Ctrl and shNS (non-silencing control), were more sensitive to SLN, significantly reducing viability to 72% after 5 days of SLN (0.1 μ M) when compared to the untreated control ($P \leq 0.01$, Figure 1E). Similarly, A172 cells overexpressing AAG (AAG-GFP) were more sensitive than parental A172 cells to SLN, decreasing viability to 68% and 61% after 5 days of treatment with 0.01 μ M ($P \leq 0.01$) and 0.1 μ M of SLN ($P \leq 0.001$). Furthermore, when treated with SLN, AAG knockdown (shAAG) cells were more resistant compared to the treated T98G Ctrl and shNS (IC_{50} of shAAG=4.1 μ M, T98G Ctrl=0.8 μ M, shNS=0.9 μ M; $b=P \leq 0.01$ in

T98G Ctrl vs shAAG and shNS vs shAAG). A similar scenario was observed in A172 Ctrl and the transfection control (GFP) cells, when compared to cells overexpressing AAG (AAG-GFP), survival was significantly higher in both controls bearing lower levels of AAG treated with 0.01 μ M of SLN (92% in A172 Ctrl, 96% in GFP; $P \leq 0.01$, IC_{50} A172 Ctrl=1.18 μ M and GFP=0.33 μ M) when compared to AAG overexpressing cells (68%, $b= P \leq 0.01$ in GFP vs AAG-GFP, IC_{50} =0.18 μ M, Figure 1F). Next, we investigated if AAG levels affect the viability of GBM cells at lower doses of TMZ. Figure 1 G and H show that after 5 days of treatment, AAG expression in glioblastoma cells did not affect sensitivity when non-cytotoxic doses of TMZ were used.

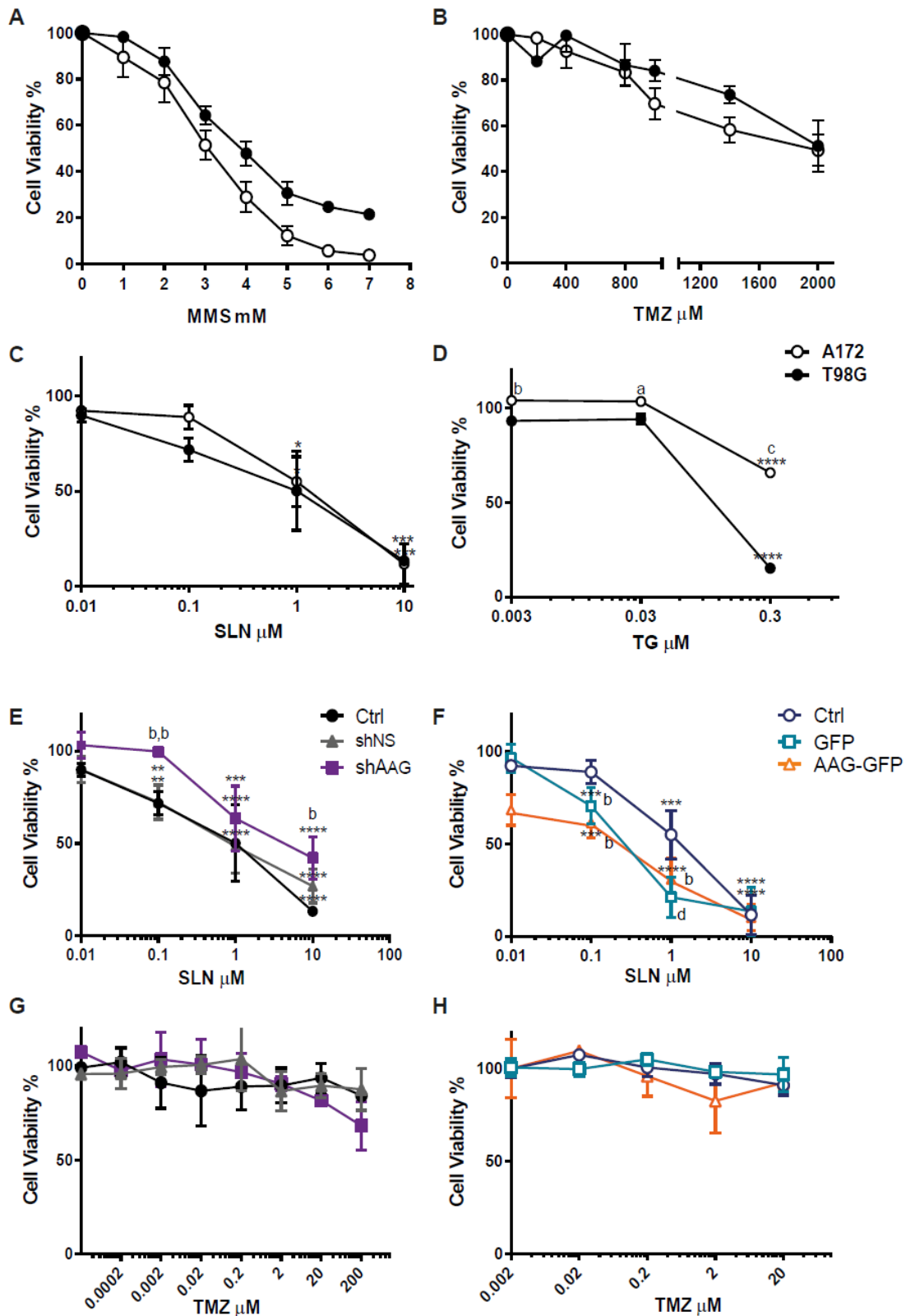


Figure 1. AAG lower levels confer resistance to ER stress-inducing drugs. (A and B) Viability using MTS assay for cells treated with 1h of MMS (1 to 7 mM) or 24h of temozolomide (TMZ, 0 to 2000 μ M). A172 cells were more sensitive than T98G cells to (A) MMS or (B) temozolomide. Cell viability of cells treated with (C) salinomycin (SLN) or (D) thapsigargin (TG) for 5 days. (E to H) MTS viability for knock down shAAG cells compared to wild type T98G (Ctrl) and shNS cells

and cells overexpressing AAG (GFP-AAG) compared to cells with low endogenous AAG expression (Cntl or GFP), treated with (E and F) SLN or (G and H) TMZ. *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001, b=P ≤ 0.01 in T98G Ctrl vs shAAG and shNS vs shAAG

Pharmacological induction of ER stress potentiates TMZ effect in an AAG-dependent manner

To investigate if AAG expression affects the cellular response to a combined treatment of SLN and TMZ, our panel of GBM cells was exposed to a pre-treatment with SLN, and then SLN associated to different doses of TMZ, as shown in Figure 2A. As previously reported in glioblastoma cells and *in vivo* (8), SLN combined with TMZ presents an enhanced antitumor effect compared to TMZ alone in T98G Ctrl and shNS, as shown by their IC₅₀ values (T98G WT TMZ=746.9 μM, SLN+TMZ=1.5 μM; shNS TMZ=1261 μM; SLN+TMZ=0.003 μM) (Figure 2B). However, AAG knockdown did not affect cellular viability to TMZ and SLN co-treatment up to 20 μM of TMZ (IC₅₀=185.8 μM) compared to both controls (Ctrl and shNS). Similarly, AAG overexpressing cells were more sensitive to SLN and TMZ co-treatment when compared to the control cell lines A172 Ctrl and GFP (Figure 2C, IC₅₀ of GFP-AAG=0.1 μM, A172 Ctrl=4.0 μM and GFP=5.7 μM). In order to assess if AAG is affecting cell survival via ER stress modulation and independently of its role in alkylation damage repair, the viability after tunicamycin or TG treatment, classical inducers of ER stress, was examined. As demonstrated in Figure 2 D, TG treatment decreased viability to 30% in T98G Ctrl cells, while AAG knockdown rescued this sensitivity. Likewise, tunicamycin significantly reduced viability in T98 Ctrl cells when compared to untreated control (P ≤ 0.0001), and AAG knockdown rescued this sensitivity (Figure 2E).

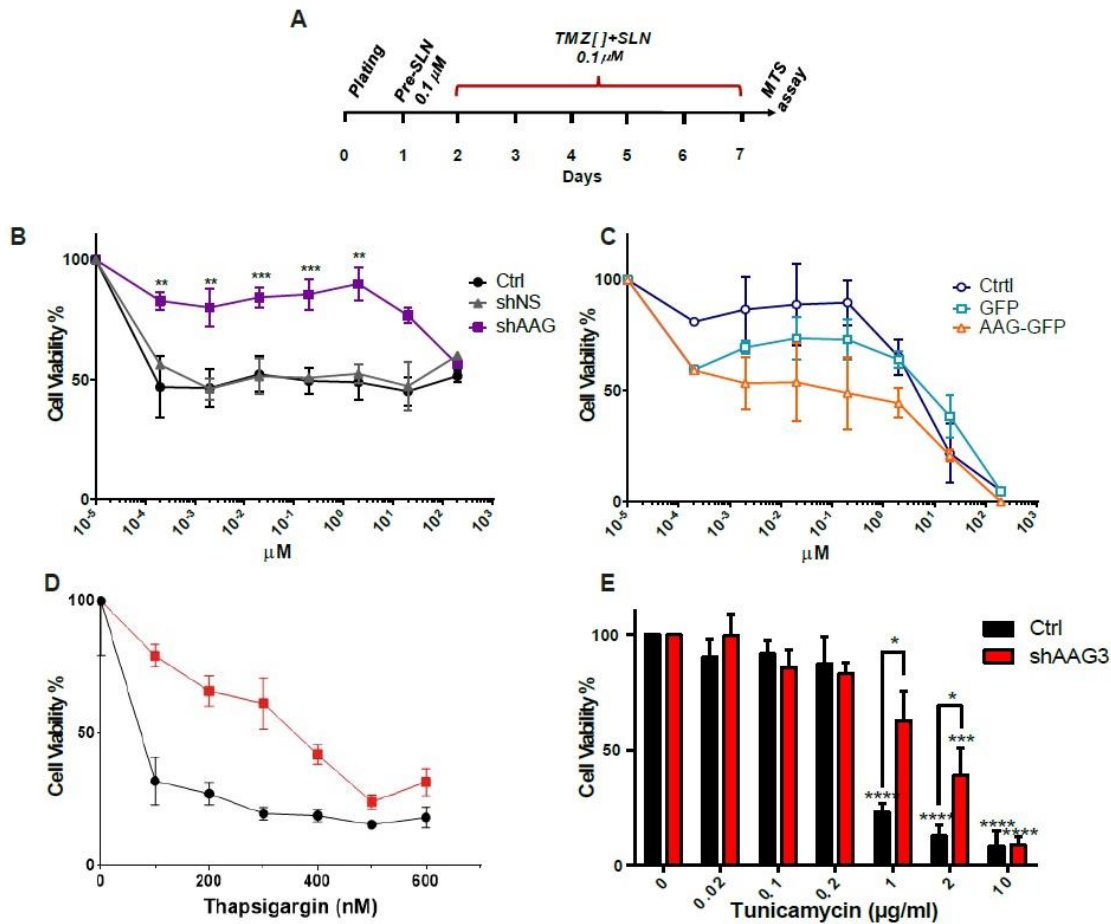


Figure 2. SLN treatment sensitizes glioblastoma cells to TMZ in AAG-expressing cells. (A) Combined treatment scheme, cells were pre-treated with 0.1 μM SLN for 24h and then exposed to a combination of SLN and different doses of TMZ for 5 days. (B and C) Cell viability for cells treated with SLN, 0.1 μM in combination with TMZ in the indicated doses. (B) shAAG cells were significantly different when compared to wild type T98G (Ctrl) and shNS cells at the same doses, (C) cells overexpressing AAG (GFP-AAG) compared to cells with low endogenous AAG expression (Ctrl or GFP). Viability was also measured after (D) thapsigargin (TG) and (E) tunicamycin. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

AAG is required for UPR activation upon combined TMZ and SLN treatment

To elucidate whether the combined SLN and TMZ treatment induces ER stress and activates UPR in this model, several UPR markers were measured after 24h of treatment. Upon stressful stimulus, UPR is initiated by activation of the three major ER-stress transmembrane sensors: PERK, IRE1 and ATF6 (14).

PERK decreases translation by phosphorylating eIF2 α , immunoblot analysis revealed increased total amounts of this protein in an AAG-dependent manner after all treatments,

however, this increase was not significant (Figure 3A). Interestingly, we observed that PERK protein levels were higher in AAG knockdown TG-treated cells compared to shNS, perhaps suggesting a more potent cellular response (Figure S1).

ATF4 is preferentially transcribed when eIF2 α is phosphorylated and is responsible for activating a number of UPR genes involved in antioxidant response, lipid metabolism and, in the case of an irreversible ER stress, apoptosis (25). Combined treatment of SLN and TMZ did not induce significant levels of ATF4 mRNA in either shNS or shAAG cells, when compared to vehicle control (DMSO). SLN treatment alone significantly increased ATF4 levels in a higher magnitude than the combined treatment (2.16-fold, $P \leq 0.05$) but only in shNS cells. shAAG cells had a slightly reduced induction of ATF4 but only significantly different from shNS after SLN treatment (Figure 3B)

DDIT3 (CHOP) is a transcription factor with proapoptotic activity, mainly regulated by the ATF4 signalling cascade but also by ATF6 and XBP1 (26). SLN or TMZ isolated treatments did not significantly alter CHOP mRNA levels when compared to the vehicle control in shNS and shAAG cells. However, after the combined treatment there was a significant difference between the two cell lines in the levels of CHOP ($P \leq 0.01$); in SLN+TMZ-treated shNS cells CHOP levels were significantly induced 24h post treatment when compared to the control (7.02- fold, $P \leq 0.01$) whereas there was no significant change in AAG knockdown cells (2.64- fold, Figure 3C).

In addition, ER stress activates the ATF6 axis, subsequently inducing the expression of genes as the ER chaperones BiP and Calnexin. BiP protein levels were increased (2.3-fold, $P \leq 0.01$) after the SLN and TMZ treatment in shNS cells, but no difference was observed in AAG knockdown cells under the same treatment when compared to the control (Figure 3D and E). A smaller magnitude of induction was detected in A172 GFP cells when compared to the A172 cells overexpressing AAG (AAG-GFP) cells expressing higher levels of AAG (Figure S2). Similar results were recapitulated at the mRNA levels,

where the induction was higher in shNS cells when compared to AAG knockdown ($P \leq 0.0001$), but only a slight additional induction was observed in the co-treatment when compared to SLN or TMZ isolated treatments (2.5- and 2.6fold, TMZ and SLN respectively, vs 3 SLN+TMZ, Figure 3F). Conversely, combined treatment of SLN and TMZ leads to a reduction in Calnexin levels in shNS cells, while TMZ and TG increased it (Figure 3A and S1B). In AAG knockdown cells, Calnexin levels were slightly increased after the combined treatment (Figure 3A).

In the presence of ER stress, the unconventional splicing of X-box binding protein 1 (*XBP1*) mRNA is triggered by the activation of IRE1 α . After a 26-nucleotide intron excision the spliced form (XBP1s) activates UPR target genes. Treatment with SLN resulted in the increase of XBP1s in shNS cells (2.5-fold), while AAG knockdown cells had an induction of 1.4-fold. A further increase was observed in shNS cells treated with a combination of SLN and TMZ (17-fold, $P \leq 0.05$) when compared to DMSO indicating a possible activation of the IRE1 α branch of the ER stress by this combination in GBM cells. Nevertheless, no induction was observed in AAG knockdown cells.

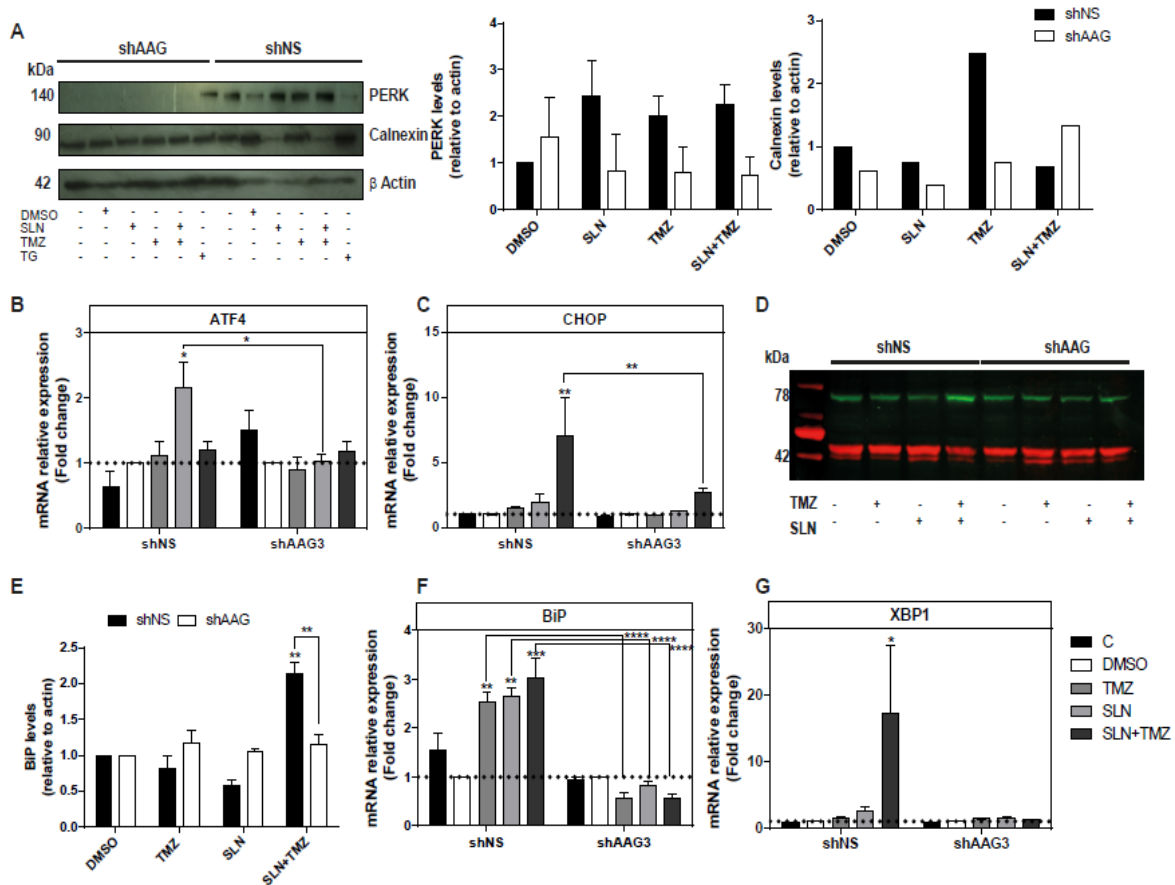


Figure 3. AAG modulates expression of UPR targets in glioblastoma cells after SLN and TMZ treatment. Cells were treated with 0.1 μ M SLN and 200 μ M TMZ, singly or combined or with 300 nM thapsigargin (TG), as indicated. (A) PERK and Calnexin protein levels measured by immunoblotting, quantification of protein levels were normalized to β actin and expressed relative to vehicle control (DMSO). Quantification of (B) ATF4, (C) CHOP, (F) BiP and (G) XBP1s mRNA levels by qPCR. (D and E) BiP protein levels in shNS and shAAG3 cells, quantification was normalized to β actin and expressed relative to DMSO *P < 0.05 **P < 0.01, ***P < 0.001.

Combination of SLN and TMZ results in an impaired autophagic flux in presence of AAG

In addition to ER stress induction, SLN has been reported to induce autophagy and protect cells from cell death in some studies while blocking the autophagic flux in others (18). We then investigated whether the viability differences observed upon combined SLN and TMZ treatment in cells with varied AAG expression levels could be the result in an imbalance in the autophagic flux. MAP1LC3 (LC3-I) conjugation to phosphatidylethanolamine and conversion into LC3-II is an early hallmark of the

autophagic process, while p62 binds to the autophagosome and its degradation serves as a marker of autophagic flux (27). SLN induces an accumulation of LC3-II form in shNS cells that were enhanced in the presence of TMZ (14.7-fold, $P \leq 0.05$). However, SLN alone or combined to TMZ had a minor effect on LC3-II levels in AAG knockdown (shAAG) cells (DMSO=0.5-fold, SLN=0.9-fold, SLN+TMZ=1-fold, Figure 4A and B). Figure 4C shows p62 accumulates in shNS cells after all treatments, although SLN alone or combined to TMZ had no significant effect in p62 levels. The increase in LC3-II levels with no p62 degradation in shNS cells could be associated with an inhibited degradation of the autophagic contents, as previously demonstrated by Yue et al. (2013) (16). In contrast, cells expressing lower AAG levels displayed lower p62 levels in all treatment conditions and the response in the AAG knockdown cells was significantly different from the control cells (shNS) in the combined treatment. Our data indicate that the combined SLN and TMZ treatment leads to an impairment of the autophagic degradation process that is not observed in AAG knockdown cells. That SLN treatment leads to an aberrant autophagic flux has already been observed by other authors, but up to now there was no evidence of a role for AAG in this process (16,28). In control shNS cells, TG treatment also increased LC3-II levels with no reduction in p62 levels, but no changes were observed in shAAG cells (Figure S3). Together, these results suggest that the impaired autophagic induction occurs as a result of UPR activation, and both are diminished in AAG knockdown cells (29).

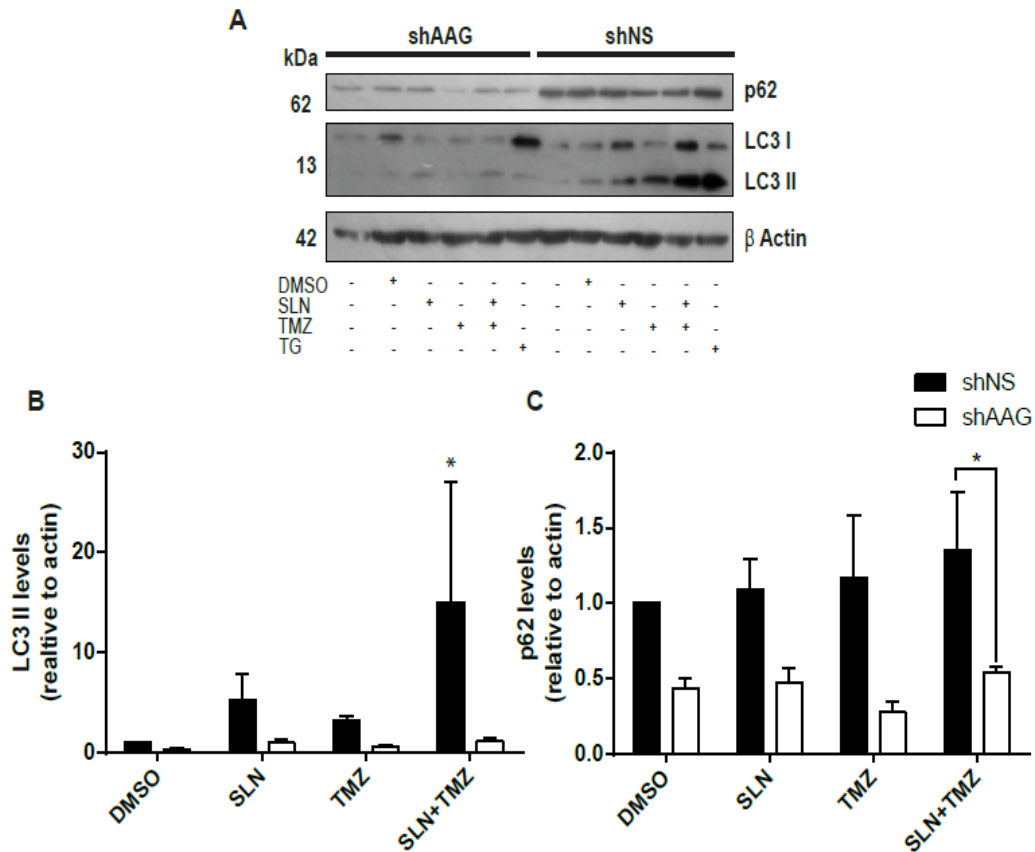


Figure 3. SLN and TMZ combined induce an aberrant autophagic flux in presence of AAG. Cells were exposed singly or combined to 0.1 μ M SLN and 200 μ M TMZ or to 300 nM thapsigargin (TG) as a positive control as indicated. (A) p62 and LC3I and II protein levels were measured by immunoblotting. Quantification was normalized to β actin and expressed relative to vehicle control (DMSO). *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001.

Discussion

Finding new strategies to improve the treatment of GBM is an urgent need. Since studies show that ER-stress inducing drugs are effective in enhancing cytotoxicity in combination with TMZ, understanding cellular outcomes of this combined therapy is a worthy avenue for exploration. In this work, we report a role for AAG in mediating the cytotoxicity induced by SLN and TMZ combination treatment through promotion of ER stress and inhibition of the autophagic flux.

ER stress activates the UPR, a pathway that is abnormally elevated in cancer cells and usually correlates with shorter survival in GBM patients (10,14,25,30). UPR can contribute towards chemotherapy outcomes in GBM either by an adaptive response promoting survival or by triggering cell death when a certain threshold of stress is

trespassed (31,32). In this context, Wang and Kauffman proposed that a modulation of basal UPR would improve the antitumoral response either by inhibiting the response or by exacerbating it. In many studies both strategies have reported promising results (25,33,34).

The indication of a therapeutic benefit from the association of SLN as an ER stress inducer to the alkylating agent TMZ has been reported to occur through the regulation of DNA repair enzymes (8). Here, we also observe the synergism between these two drugs increasing the cytotoxicity in GBM cells.

AAG is a DNA glycosylase that initiates BER for alkylated DNA bases, such as 3meA and 7meG generated by TMZ. Very briefly, the abasic site (AP) resulting from AAG-excision is removed and then filled in with a new base by DNA polymerase (4). Enzymatic steps following AAG-mediated repair initiation generate cytotoxic repair intermediates, such as AP and single strand breaks (35,36). However, although cells lacking AAG were more sensitive to alkylating agents alone (7,23), here they were more resistant to ER stress inducers alone or combined to TMZ. The promotion of cell death by the combined treatment could occur by an association of prolonged ER stress and accumulation of toxic intermediates AAG-mediated repair.

We have previously demonstrated that alkylation-induced UPR occurs in an AAG-dependent manner in mice and GBM cells, and involves at least the IRE1-XBP1 branch (23). Although previous studies have reported that SLN promotes ER stress when administered alone and has a synergistic effect when combined to TMZ, the exact UPR arms activated after this combined treatment were not elucidated (8,37). To investigate the effects of SLN+TMZ on ER stress induction and the role that AAG exerts in this scenario, we examined different markers of the UPR pathway providing evidence that the combined treatment stimulated the expression of UPR targets including BiP, CHOP and XBP1s. Although as yet not well understood, it has been proposed that the switch between the adaptive or cell death programs during prolonged stress could result from

CHOP mediation of several pro-apoptotic mechanisms and involve an attenuation of the IRE1 α branch (38–40). The results observed here could suggest a transition between the pro-survival and pro-death events at the assessed time (24h), but a time course analysis would be required to confirm this hypothesis.

It is important to note that SLN activation of several markers confirms ER stress induction in shNS cells. However, SLN associated to TMZ reduced levels of Calnexin, a molecular chaperone that ensures only properly folded proteins leave the ER (41). These results suggest that SLN induces ER stress but inhibits pathways that could ameliorate stress, this way allowing excessive ER stress and promotion of cell death. Once more, AAG levels were determinant for the response upon ER stress since an impaired induction of UPR markers was observed in AAG knockdown cells. The mechanism by which AAG is modulating the UPR induced either by alkylation or different sources of ER stress remain to be explained.

A variety of *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that the anticancer effects of SLN involves mitochondria-dependent and death receptor-mediated cell death, DNA damage induction and cell cycle arrest (18). Despite this, cell death independently of p53, CD95/CD95L system, caspase, and the proteasome is also mediated by SLN in cancer cells (42,43).

Furthermore, SLN enhances ROS production that could lead to a variety of ROS-mediated modified products, including oxidized bases, DNA strand breaks, DNA intra-strand adducts, and DNA–protein crosslinks (15,44). The excessive oxidative stress induction by SLN has been linked to ER stress and an aberrant autophagy, where the alleviation of ROS production by the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) is able to restore the normal autophagic process (45–47). Different authors have reported that SLN impairs the autophagic flux through inactivation of cathepsins and lysosomal

disfunction, and when combined to autophagy inhibition SLN enhances apoptosis levels (16,48).

The UPR promotes cell survival by increasing protein folding and engaging protein degradation systems such as autophagy (11,29). Our results revealed an impaired autophagic flux in cells that were able to induce UPR triggered by SLN treatment, although AAG knockdown resulted in reduced levels of p62 that could be a result of impaired UPR activation and consequently lack autophagy induction or even of a faster autophagic flux. Thus, it is hypothesized that the connection between AAG knockdown and increased survival in the combined treatment might be explained by the abrogated UPR and unaltered autophagy flux that allow cells to escape cell death. Further investigation is needed to fully characterize the cell death mechanisms that may be downstream of AAG and ER stress induction in GBM and the involvement of an altered cellular ROS regulation in this context.

As higher doses of SLN are associated with severe cytotoxicity (21,49), it is particularly important to identify drugs that can be used in combination with SLN to potentiate its antitumoral effect at reduced concentrations so as to minimize potential side effects. The alkylating agent TMZ seems well suited as nanomolar concentrations of SLN synergized with TMZ potentiating TMZ-induced cytotoxicity in GBM cells.

In tumours highly resistant to therapy, such as GBM, the association of prolonged ER stress and DNA damage induction appears as a potentially attractive clinical tool to improve patient survival rates. In summary, our data supports the concept that AAG is required for the cytotoxicity observed upon ER stress and alkylating damage. Additionally, it may be beneficial to combine this strategy with autophagy inhibition to improve therapy response in GBM patients. Further investigation at the molecular level of how AAG modulates the UPR and subsequent cell death mechanisms could reveal new therapeutic targets for this deadly malignancy.

Material and methods

Cell Lines and drugs. A172 and T98G cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown in DMEM low glucose containing 10% foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Life Technologies) at 37°C in 5% CO₂. Stable cell generation and characterization of AAG knockdown (T98G shAAG) and overexpressing cells (A172 AAG-GFP) was previously described (23).

Cells were exposed to varying concentrations of salinomycin, MMS (Sigma, St. Louis, MO, USA cat#S4526), temozolomide (Sigma, St. Louis, MO, USA cat#T2577) and thapsigargin (Sigma, St. Louis, MO, USA cat# T9033). Each of these reagents was prepared according to manufacturer's instructions.

Cell Viability Assay. Cell lines were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 96-well plate. Twenty-four hours later, T98G and A172 cells were exposed to a dose range from 1 to 7 mM of MMS for 1 h or from 200 to 2000 µM of TMZ for 24 h or treated as indicated in the figures and figure legends. Cell viability was determined after treatment using the MTS-based CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, #G3580).

mRNA Expression Analysis RNA was extracted using the PureLink RNA Mini kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) and first strand cDNA was synthesized using the Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA amplification was done using SYBR Green Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and quantitative real-time PCR was performed using QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, USA). All experiments were performed with biological and technical triplicates. Results were generated using the

comparative Ct method and are expressed as fold change relative to the untreated control (50). A complete list of primers used in this study is shown in Table S1.

Immunoblotting Cells were lysed with M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), supplemented with 1X Phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 1x protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Protein concentration was determined using the BCA assay (Pierce). Total protein lysates (20 µg) were separated under denaturing conditions in 4-20% True-PAGE (Sigma-Aldrich) gels. Proteins were then transferred onto PVDF membranes (Life Technologies). Membranes were blocked in 1% nonfat milk and incubated overnight with specific antibodies at 4 °C. Antibodies were as follows: β-actin (1:10,000 dilution; A2228, Sigma), BiP (1:1,000 dilution; 3183S, Cell Signaling), PERK(1:1000 dilution;5683T,Cell Signaling), Calnexin (1:1000 dilution; 2679T,Cell Signaling), LC3 (1:1000 dilution; 2775S, Cell Signaling), p62 (1:1000 dilution;88588S, Cell Signaling). After primary antibody incubation, membranes were washed and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit anti-mouse antibody (7074 and 7076, Cell Signalling) at 1:10,000, for 1 hour at room temperature. Chemiluminescence was detected using X-ray films (Kodak X-Omat, Rochester, NY). The films were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using Image J software (NIH).

Statistical analysis. Unless otherwise stated, results are presented as mean ± standard error of the mean and analyses are results of three or more independent experiments. Two-way ANOVA was used to determine significance, followed either by post-hoc Bonferroni or Tukey test for multiple comparisons when appropriate; significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical calculations were performed with GraphPad Prism software, Version 6.0.

Funding

Work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 400557/2013-4 and 207503/2015-0). LM is recipient of SwB studentships (CNPq). LBM was supported by an international visiting professorship grant (CNPq). The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lee JH, Lee JE, Kahng JY, *et al.*: Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560: 243–247, 2018.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.*: Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med* 352: 987–996, 2005.
3. Reardon DA, Rich JN, Friedman HS and Bigner DD: Recent Advances in the Treatment of Malignant Astrocytoma. *J Clin Oncol* 24: 1253–1265, 2006.
4. Fu D, Calvo JA and Samson LD: Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer* 12: 104–20, 2012.
5. Hegi ME, Diserens A-C, Godard S, *et al.*: Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 10: 1871–4, 2004.
6. Lee SY: Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis* 3: 198–210, 2016.
7. Agnihotri S, Gajadhar a. SAS, Ternamian C, *et al.*: Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *J Clin Investig* 122: 253–266, 2012.
8. Xipell E, Aragón T, Martínez-Velez N, *et al.*: Endoplasmic reticulum stress-

- inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. *Neuro Oncol* 18: 1109–19, 2016.
9. Weatherbee JL, Kraus J-L and Ross AH: ER stress in temozolomide-treated glioblastomas interferes with DNA repair and induces apoptosis. *Oncotarget* 7: 43820–43834, 2016.
 10. Obacz J, Avril T, Le Reste P-J, Urra H, Quillien V, Hetz C and Chevet E: Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. *Sci Signal* 10: eaal2323, 2017.
 11. Almanza A, Carlesso A, Chintia C, *et al.*: Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*, 2018.
 12. Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM and Piacentini M: Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol* 7: 78, 2017.
 13. Song S, Tan J, Miao Y and Zhang Q: Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol* 233: 3867–3874, 2018.
 14. Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E and Hetz C: Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends in cancer* 2: 252–262, 2016.
 15. Dewangan J, Srivastava S and Rath SK: Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumor Biol* 39: 101042831769503, 2017.
 16. Yue W, Hamaï A, Tonelli G, *et al.*: Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance. *Autophagy* 9: 714–29, 2013.
 17. Kim S-H, Choi Y-J, Kim K-Y, *et al.*: Salinomycin simultaneously induces apoptosis and autophagy through generation of reactive oxygen species in osteosarcoma

- U2OS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 473: 607–613, 2016.
18. Jiang J, Li H, Qaed E, *et al.*: Salinomycin, as an autophagy modulator-- a new avenue to anticancer: a review. *J Exp Clin Cancer Res* 37: 26, 2018.
 19. Li T, Su L, Zhong N, Hao X, Zhong D, Singhal S and Liu X: Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. *Autophagy* 9: 1057–1068, 2013.
 20. Qin L, Jia P, Zhang Z and Zhang S: ROS-p53-cyclophilin-D signaling mediates salinomycin-induced glioma cell necrosis. *J Exp Clin Cancer Res* 34: 57, 2015.
 21. Boehmerle W and Endres M: Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. *Cell Death Dis* 2: e168, 2011.
 22. Magrath JW and Kim Y: Salinomycin's potential to eliminate glioblastoma stem cells and treat glioblastoma multiforme (Review). *Int J Oncol* 51: 753–759, 2017.
 23. Milano, Larissa; F. Charlier, Clara; Andregueti, Rafaela;Aljohani, Abdullah; Healing, Eleanor; Thomé, Marcos P.; Elliott, Ruan; Samson, Leona D.;Lenz, Guido; Henriques,João Antonio P.; Nohturfft, Axel;Meira LB: A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress. *PNAS*.
 24. Bi M, Naczki C, Koritzinsky M, *et al.*: ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. *EMBO J* 24: 3470–81, 2005.
 25. Wang M and Kaufman RJ: The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat Rev Cancer* 14: 581–597, 2014.
 26. Ron D and Walter P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519–529, 2007.
 27. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, *et al.*: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: 1,

- 2016.
28. Xipell E, Gonzalez-Huarriz M, Martinez de Irujo JJ, *et al.*: Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. *Oncotarget* 7: 30626–41, 2016.
 29. Ogata M, Hino S, Saito A, *et al.*: Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26: 9220–31, 2006.
 30. Pyrko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC and Lee AS: The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Res* 67: 9809–9816, 2007.
 31. Johnson GG, White MC and Grimaldi M: Stressed to death: targeting endoplasmic reticulum stress response induced apoptosis in gliomas. *Curr Pharm Des* 17: 284–92, 2011.
 32. Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S and Samali A: Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol* 625: 234–246, 2009.
 33. Nagelkerke A, Bussink J, Sweep FCGJ and Span PN: The unfolded protein response as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 1846: 277–284, 2014.
 34. Wang M, Law ME, Castellano RK and Law BK: The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol* 127: 66–79, 2018.
 35. Calvo JA, Moroski-Erkul CA, Lake A, *et al.*: Aag DNA Glycosylase Promotes Alkylation-Induced Tissue Damage Mediated by Parp1. *PLoS Genet* 9: e1003413, 2013.
 36. Meira LB, Moroski-Erkul CA, Green SL, Calvo JA, Bronson RT, Shah D and Samson LD: Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal

- degeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 888–93, 2009.
37. Yu S-N, Kim S-H, Kim K-Y, Ji J-H, Seo Y-K, Yu HS and Ahn S-C: Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells. *Oncol Rep* 37: 3321–3328, 2017.
 38. Woehlbier U and Hetz C: Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death. *Trends Biochem Sci* 36: 329–337, 2011.
 39. Corazzari M, Gagliardi M, Fimia GM and Piacentini M: Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Front Oncol* 7: 78, 2017.
 40. Chen Y and Brandizzi F: IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol* 23: 547–555, 2013.
 41. McCaffrey K and Braakman I: Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem* 60: 227–235, 2016.
 42. Calzolari A, Saulle E, De Angelis ML, *et al.*: Salinomycin Potentiates the Cytotoxic Effects of TRAIL on Glioblastoma Cell Lines. *PLoS One* 9: e94438, 2014.
 43. Kim J-H, Chae M, Kim WK, Kim Y-J, Kang HS, Kim HS and Yoon S: Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *Br J Pharmacol* 162: 773–784, 2011.
 44. Apel K and Hirt H: REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373–399, 2004.
 45. Zhao S-J, Wang X-J, Wu Q-J, *et al.*: Induction of G1 Cell Cycle Arrest in Human Glioma Cells by Salinomycin Through Triggering ROS-Mediated DNA Damage In Vitro and In Vivo. *Neurochem Res* 42: 997–1005, 2017.

46. Zhang G, Wang W, Yao C, Ren J, Zhang S and Han M: Salinomycin overcomes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting Nrf2 level and promoting ROS generation. *Biomed Pharmacother* 91: 147–154, 2017.
47. Kim K-Y, Park K-I, Kim S-H, *et al.*: Inhibition of Autophagy Promotes Salinomycin-Induced Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-Dependent Signaling in Human Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 18: 1088, 2017.
48. Jiang J, Li H, Qaed E, *et al.*: Salinomycin, as an autophagy modulator-- a new avenue to anticancer: a review. *J Exp Clin Cancer Res* 37: 26, 2018.
49. Story P and Doube A: A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. *N Z Med J* 117: U799, 2004.
50. Schmittgen TD and Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108, 2008.

Table S1. RT-qPCR primers.

<i>ACTB</i> (NM_001101)	Fwd 5' ATT GCC GAC AGG ATG CAG AA 3' Rev 5' GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA 3'
<i>ATF4</i> (NM_001675)	Fwd 5' TTCTCCAGCGACAAGGCTAAGG 3' Rev 5' CTCCAACATCCAATCTGTCCCG 3'
<i>HSPA5</i> (NM_005347)	Fwd 5' CTGTCCAGGCTGGTGTGCTCT 3' Rev 5' CTTGGTAGGCACCACTGTGTTT 3'
<i>XBPIs</i> (NM_005080)	412–431 5' CCTTGTTAGTTGAGAACCAGG 3' 834–853 5' GGGGCTTGGTATATATGTGG 3'
<i>DDIT3</i> (NM_004083)	Fwd 5' GGTATGAGGACCTGCAAGAGGT 3' Rev 5' CTTGTGACCTCTGCTGGTTCTG 3'

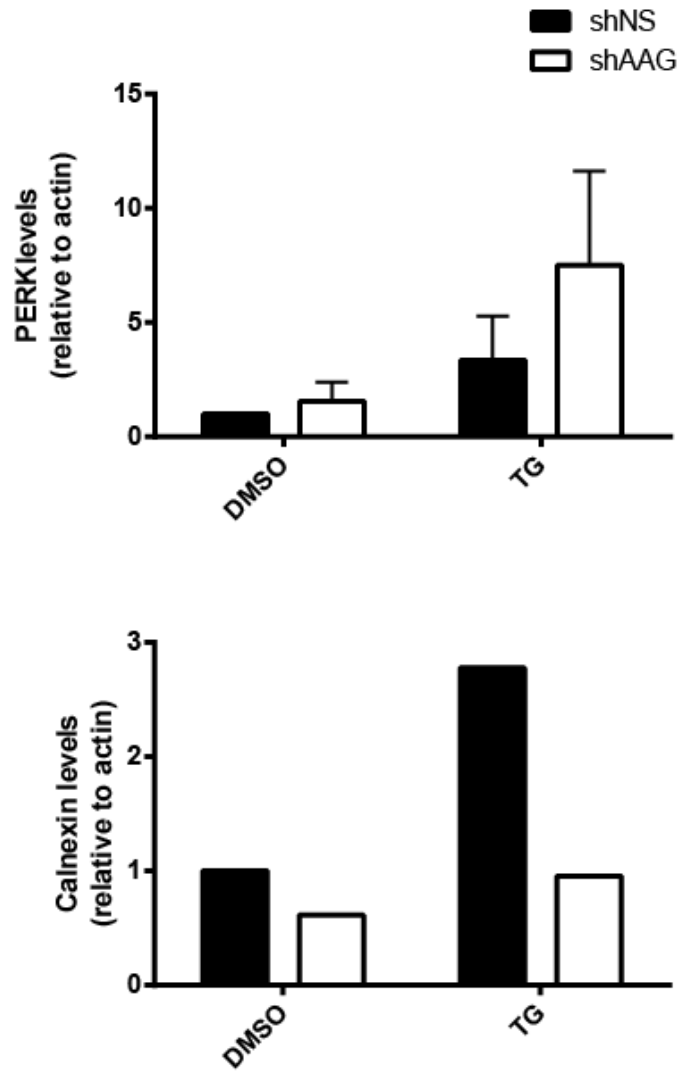


Figure S1. PERK and calnexin levels after TG treatment. Cells were treated with 300 nM thapsigargin (TG). PERK and Calnexin protein levels measured by immunoblotting, quantification of protein levels were normalized to β -actin and expressed relative to vehicle control (DMSO).

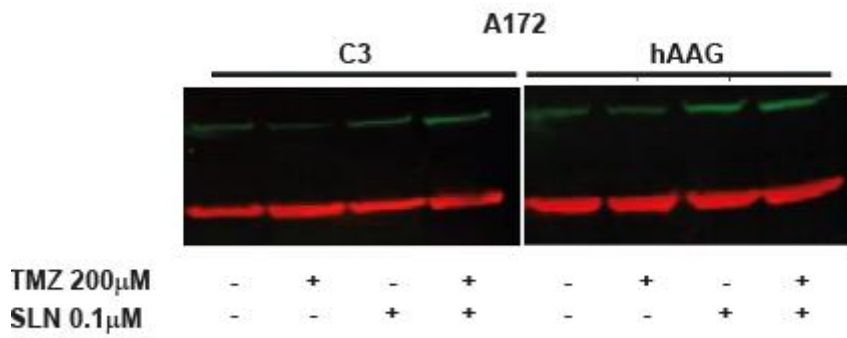


Figure S2. BiP induction in A172 cells. Cells were treated with 0.1 μ M SLN and 200 μ M TMZ, singly or combined, as indicated. BiP protein levels analyzed by immunoblotting, β -actin was used as loading control.

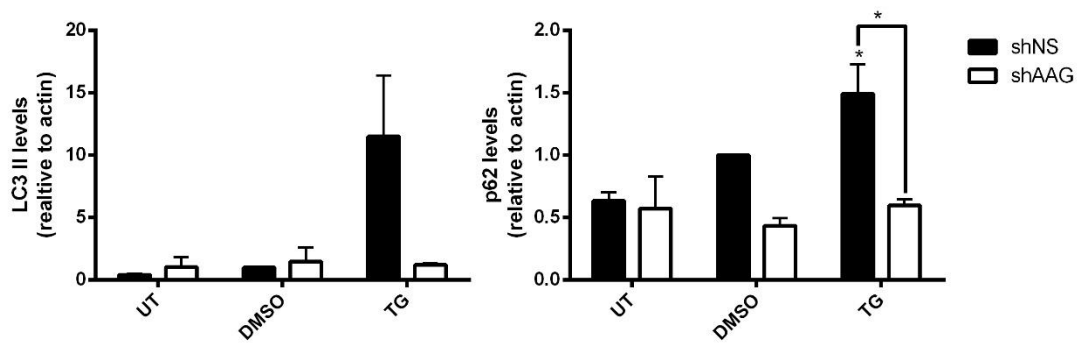


Figure S3. LC3-II and p62 levels induced by TG. Cells were treated with 300 nM thapsigargin (TG). LC3-II and p62 protein levels measured by immunoblotting, quantification of protein levels were normalized to β -actin and expressed relative to vehicle control (DMSO). UT, untreated control. * $P \leq 0.05$

6. CAPÍTULO IV — “Avaliação do perfil transcricional de marcadores/alvos da resposta de estresse ao retículo endoplasmático combinados ao reparo de DNA e seu impacto na sobrevivência de pacientes com glioblastoma”.

6.1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo explorou-se o impacto da expressão gênica das vias de UPR e BER na sobrevivência de pacientes com glioblastoma (GBM) tratados com agentes alquilantes, tendo em vista dar continuidade ao trabalho focando na investigação da potencial aplicação terapêutica destas vias. No Capítulo II, verificou-se que os agentes alquilantes MMS e TMZ em tratamentos isolados foram capazes de reduzir a sobrevivência de células silenciadas para AAG. Enquanto que no Capítulo III, demonstrou-se que a combinação de TMZ e SLN foi efetiva em sensibilizar as células T98G WT e A172 hAAG, as quais expressam a glicosilase AAG.

Como descrito anteriormente, é crescente o número de evidências demonstrando o envolvimento de UPR no desenvolvimento tumoral e sua relação com a aquisição de resistência a terapia (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2015), bem como a importância das vias de reparo de DNA para a resposta a agentes alquilantes utilizados na quimioterapia (DRABLØS et al., 2004; FU; CALVO; SAMSON, 2012; KAINA et al., 2001).

O desenvolvimento de tecnologias de “*High-throughput*” proporciona um novo conjunto de ferramentas que podem ser exploradas para abordagens mais individualizadas baseadas em perfis moleculares dos tumores. Além disso, a caracterização de possíveis biomarcadores por estas tecnologias permite a predição dos grupos de pacientes que melhor respondem a determinadas terapias (COLLINS; VARMUS, 2015).

Aqui, buscou-se entender se o desfecho observado na sobrevivência das linhagens celulares utilizadas neste trabalho é aplicável a pacientes de GBM. Desta

forma, se o papel desempenhado pela AAG na indução de UPR / estresse de retículo em resposta a agentes alquilantes for importante para a eficácia terapêutica, pacientes com baixos níveis de expressão de AAG e/ou de alvos de UPR deveriam correlacionar com um melhor desfecho clínico após tratamento com tais agentes.

Para avaliar tal possibilidade, primeiramente tentou-se identificar na literatura uma potencial meta assinatura transcricional da via de UPR. Na ausência desta, partiu-se para outra abordagem, utilizando um pequeno grupo de genes expressos durante a resposta de estresse ao retículo endoplasmático (ALMANZA et al., 2018; VACARU et al., 2014). Assim, investigou-se o impacto combinado ou não, de AAG e de um pequeno conjunto de genes alvos do UPR, nomeados: ATF6, DDIT3, HSPA5 e ATF4 – denominados daqui em diante apenas “set UPR”) na sobrevida global dos pacientes de GBM, através do uso de dados clínicos e expressão gênica gerados pelo Atlas Genômico do Câncer (TCGA - *The Cancer Genome Atlas*). Níveis de AAG e do set UPR foram estabelecidos no tecido tumoral retirado da cirurgia, antes do tratamento quimioterápico. Os resultados desta análise, demonstram que como esperado, a resposta observada nos pacientes é mais complexa do que o encontrado em linhagens celulares e a limitação dos dados obtidos leva a conclusões mais especulativas.

6.2. METODOLOGIA

Origem dos dados

Dados do TCGA foram obtidos utilizando a plataforma UCSC *Cancer Genome Browser* (www.genome-cancer.ucsc.edu, acessada em 18 de novembro, 2016). Foram utilizados os dados de expressão gênica em glioblastoma intitulados “*GBM gene expression* (AffyU133a)”. Os pacientes cujas informações clínicas eram ausentes foram excluídos. Desta forma, utilizou-se o número de 524 casos no presente estudo. Dados clínicos destes pacientes foram previamente publicados (PEREIRA et al., 2018).

Análise de Kaplan-meier

Pacientes foram censurados à sobrevivência de 1500 dias ou até a morte. A análise de Kaplan-meier foi realizada individualmente para cada gene (AAG) ou conjunto de genes (UPR) usando a mediana como corte (*cut-off*) entre os pacientes com expressão considerada baixa ou alta. Para a Kaplan-meier utilizando dois grupos, a análise foi realizada através da divisão em 4 grupos denominados: pacientes demonstrando ambos grupos de expressão acima da mediana, (High/High-HH), pacientes demonstrando ambos grupos de expressão abaixo da mediana (Low/Low-LL) e dois outros grupos combinando um grupo de expressão acima da mediana e o outro grupo abaixo, (High/Low-HL e Low/High-LH).

6.3. RESULTADOS

Impacto de AAG e UPR individualmente/isoladamente na sobrevida dos pacientes de GBM

Primeiramente, avaliou-se a variabilidade de expressão dos dois marcadores a serem investigados, AAG e UPR. Na Figura 1A, observou-se a distribuição dos níveis absolutos de AAG nos 524 pacientes utilizados neste estudo, variando entre 5,8 e 9, com mediana de 7, que foi usada como limiar entre alta (High) e baixa (Low) expressão de AAG. Enquanto a distribuição de UPR para os mesmos pacientes (Figura 1B), varia entre 7,5 e 10,8 resultando em 9 o valor de separação entre os grupos High e Low UPR.

Na próxima etapa analisou-se a relação da expressão de AAG ou UPR com a sobrevida dos pacientes de GBM em uma coorte independente do tipo de tratamento ao qual o paciente foi submetido. A Figura 1C, mostra que os níveis de AAG não impactam a sobrevida do paciente quando o tratamento recebido não é considerado. Por outro lado, pacientes com expressão elevada dos genes alvos de UPR apresentaram

sobrevivência significativamente reduzida comparados aos pacientes com níveis mais baixos de expressão de UPR ($p=0,007$, Figura 1B).

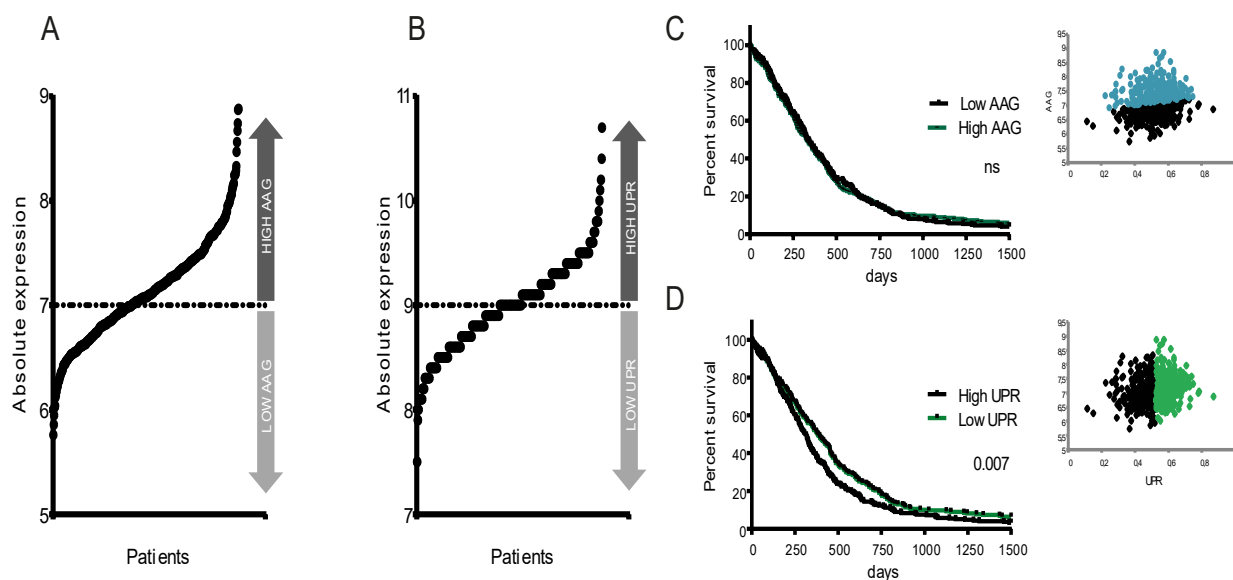


Figura 1. Impacto de AAG e UPR individualmente na sobrevivência. Expressão absoluta de A) AAG e B) UPR nos 524 pacientes incluídos neste estudo. O cut-off foi determinado baseado na mediana de expressão de AAG ou UPR. Plots de sobrevivência Kaplan-Meier dos dois marcadores/parâmetros, C) AAG e D) UPR, analisados independentemente do tratamento utilizado. Log rank significativa (Mantel-Cox) p value está indicado.

Baixos níveis individuais de AAG ou UPR correlacionam-se com aumento da sobrevida em pacientes submetidos ao tratamento com agente alquilante

Em seguida, os pacientes foram separados nos grupos: alquilantes positivos (*Alkylation plus*, Alk+), quando submetidos a terapia envolvendo um agente alquilante ou alquilantes negativos (*Alkylation minus*, Alk -) quando receberam qualquer outro tratamento que não envolvesse um agente alquilante. Testou-se então, o impacto dos níveis de AAG ou UPR (High ou Low) na sobrevida dos pacientes de acordo com o tratamento recebido.

Pacientes exibindo baixa expressão individual de AAG ou UPR antes do tratamento com o agente alquilante tiveram uma melhora significativa na sobrevida com o tratamento recebido (AAG $p=0,003$ e UPR $p=0,008$), sugerindo que um efeito similar desses dois marcadores nas chances de sobrevivência dos pacientes em resposta ao

agente alquilante (Figura 2 A e B). No entanto, não foi observada diferença significativa na sobrevivência dos pacientes que expressavam altos níveis de AAG ou UPR submetidos ao agente alquilante (Figura 2 C e D).

Quando levado em conta o tratamento alquilante, a expressão de UPR e AAG antes do tratamento parece ser igualmente relevante para sobrevivência, uma vez que pacientes que iniciaram o tratamento com níveis mais baixos de ambos tiveram uma pequena melhora na sobrevivência, mas não significativamente diferente daqueles com altos níveis (AAG $p=0,09$, UPR = 0,07, Figura 2 E e F).

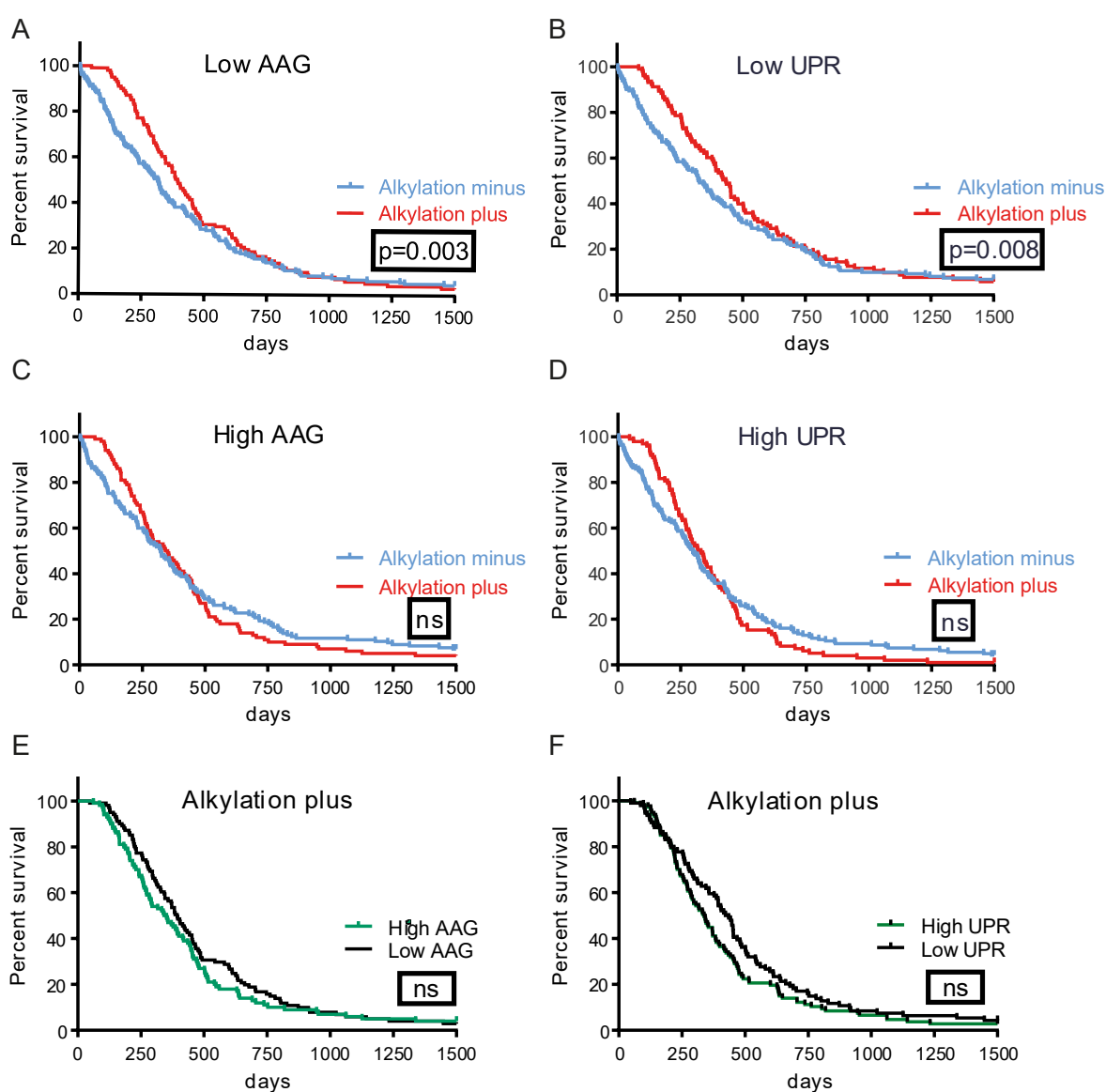


Figura 2. Níveis baixos de AAG e UPR aumentam a sobrevivência de pacientes tratados com agente alquilante. Curvas de Kaplan-Meier dos pacientes divididos de acordo com o tratamento recebido A) baixos níveis de AAG, B) baixos níveis de UPR, C) altos níveis de AAG, D) altos

níveis de UPR. Apenas os grupos com menores níveis dos marcadores apresentaram diferença significativa na sobrevida com o tratamento alquilantes. Não foi observada diferença significativa dentro do grupo de pacientes que receberam tratamento alquilante independentemente do nível de expressão de AAG ou UPR. Log rank significante (Mantel-Cox) p value está indicado.

Expressão de AAG é predominante para sobrevida dos pacientes em resposta ao tratamento alquilante

Na tentativa de entender se o efeito observado *in vitro* de AAG na ativação do UPR e seu desfecho na sobrevivência, também é relevante para eficácia terapêutica nos pacientes de GBM, investigou-se o impacto da expressão de UPR no prognóstico dos pacientes quando combinado à expressão de AAG. Nesta análise, os seguintes grupos foram incluídos: AAG High, UPR High (HH), AAG Low, UPR High (LH), AAG High, UPR Low (HL), AAG Low e UPR Low (LL) considerando-se ou não o tratamento com agente alquilante.

Ao avaliarem-se as expressões de AAG e UPR combinadas, os pacientes que possuíam baixos níveis de AAG antes do tratamento associados a alta (LH) ou baixa expressão (LL) de UPR, apresentaram sobrevida significativamente maior ao receberem terapia com agente alquilante quando comparados aqueles com o mesmo perfil submetidos a outros tratamentos (Figura 3, LH $p=0,04$, LL $p=0,02$). Pode-se notar ainda que após 500 dias do início do tratamento, as curvas Alk+ e Alk- do grupo LH praticamente se sobrepõem, enquanto no grupo LL continuam separadas até aproximadamente o dia 1000, sugerindo que o benefício dos pacientes LL é ainda maior. Não houve diferença significativa na sobrevida dos pacientes com expressão mais elevada de AAG, independente do tratamento recebido (Figura 3 A e B).

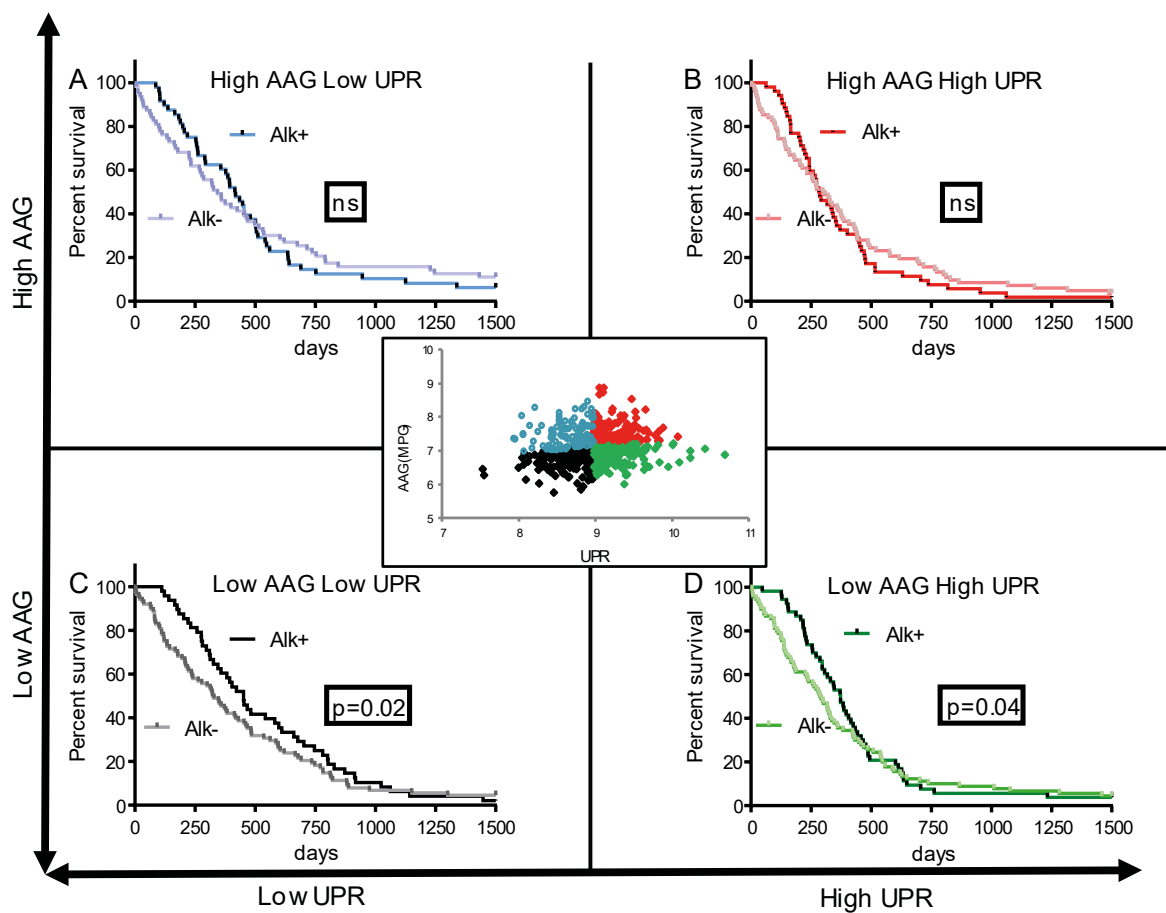


Figura 3. Expressão de AAG é predominante para sobrevida dos pacientes em resposta ao tratamento alquilante. Curvas de Kaplan-Meier dos pacientes divididos de acordo com a expressão combinada de AAG e UPR A) altos níveis de AAG e baixos de UPR (HL, azul), B) altos níveis de AAG e UPR (HH, vermelho), C) baixos níveis de AAG e UPR (LL, preto), D) baixos níveis de AAG e altos de UPR (LH, verde). Apenas os grupos com menores níveis de AAG apresentaram diferença significativa na sobrevida com o tratamento alquilantes. Alk+, tratamento com agente alquilante, Alk-, outro tratamento. Determinação do cut-off a partir das medianas de expressão de AAG e UPR (inserto). *Log rank* significativa (Mantel-Cox) *p* value está indicado.

Quando comparados os grupos sob tratamento alquilante, pacientes que possuem baixa expressão de ambos os marcadores (LL) apresentaram uma melhora na sobrevida em relação aos outros grupos (Figura 4 A, B e C).

Em pacientes com menor expressão de UPR, baixos níveis de AAG parecem ter um pequeno efeito aumentando a sobrevida em relação aos pacientes com níveis mais elevados de AAG, no entanto não há significância (LL vs HL, Figura 4 A). Da mesma forma, menores níveis de AAG associados com níveis mais baixos de UPR apresentam melhor desfecho em relação à pacientes com maiores níveis de UPR (LL vs LH, Figura 4 B).

A maior diferença foi encontrada em pacientes submetidos ao tratamento alquilante, onde pacientes com menores níveis de expressão dos dois marcadores correlacionaram-se com uma sobrevida mais longa ao serem comparados àqueles pacientes com dupla alta expressão (LL vs HH, $p=0,009$, Figura 4C).

Pacientes com AAG elevada parecem ter mais benefício do tratamento alquilante quando combinados a menores níveis de UPR do que aqueles que possuem também elevados níveis de UPR (HL x HH, $p = 0,04$, Figura 4E).

A sobrevida do grupo de pacientes com alta expressão de UPR não foi afetada pela expressão diferente de AAG (LH vs HH, Figura 4F). Assim como não houve diferença entre os grupos HL vs LH (Figura 4D) ou entre os grupos que não receberam tratamento alquilante (dados não mostrados).

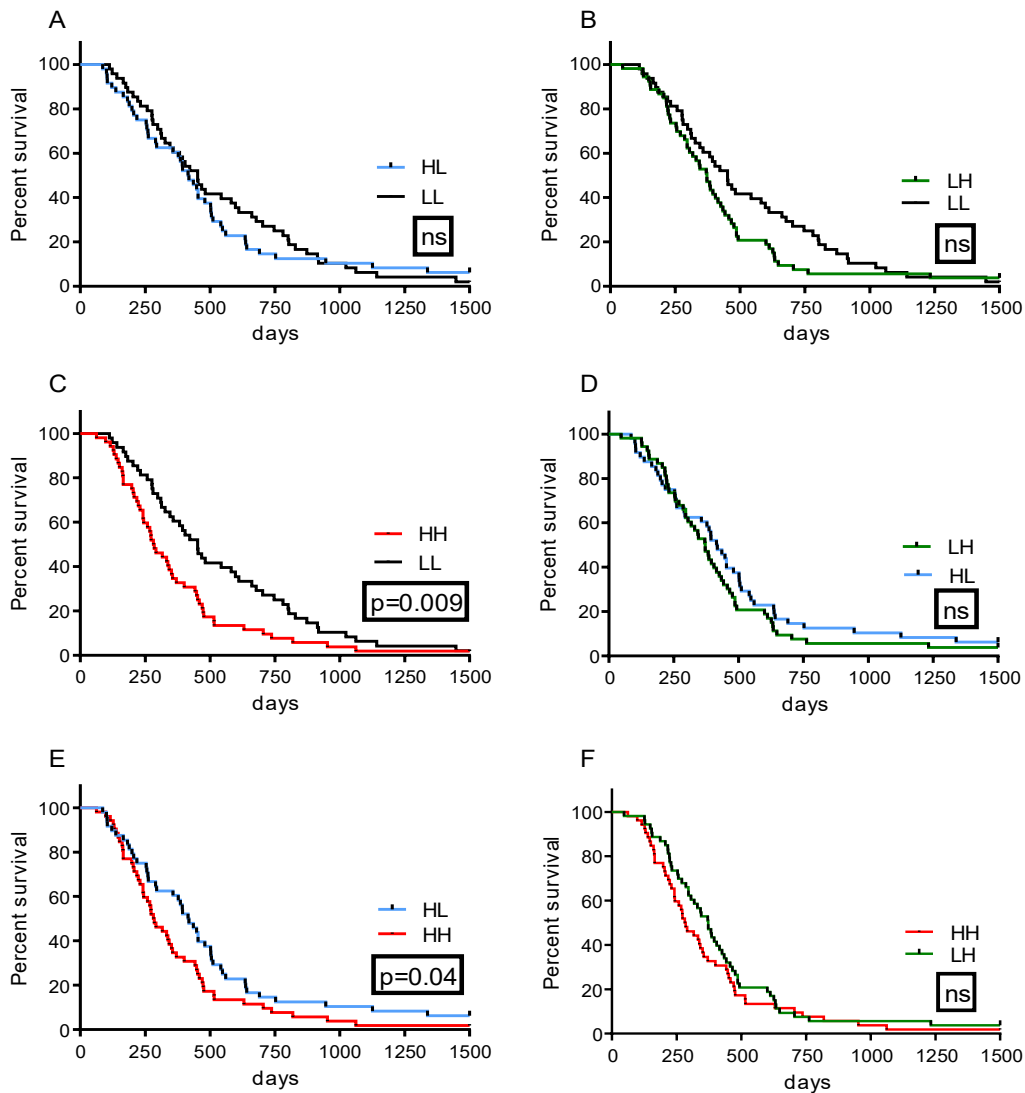


Figura 4. Menor expressão de AAG e UPR combinada responde melhor ao tratamento alquilante. Comparação dos grupos com melhor resposta ao tratamento alquilante. Curvas de Kaplan-Meier de acordo com a expressão combinada de AAG e UPR em pacientes que receberam tratamento alquilante, A) LL vs HL, B) LL vs LH, C) LL vs HH, D) LH vs HL, E) HH vs HL e F) HH vs LH. Log rank significativa (Mantel-Cox) *p* value está indicado.

6.4 DISCUSSÃO

Através da associação de diversos padrões de expressão gênica ao desfecho clínico observado nos pacientes, pode-se retratar em parte a complexidade da biologia tumoral e seu resultado no desenvolvimento da doença. A identificação de fatores que associados em diferentes contextos celulares afetem a resposta terapêutica, traz à tona novos potenciais alvos e biomarcadores para o manejo do câncer. No presente trabalho,

com a premissa dos dados experimentais observados complementados pela análise de dados clínicos, demonstrou-se que a combinação de diferentes níveis de expressão de dois componentes envolvidos em vias de resposta a diferentes tipos de dano/estresse, BER (AAG) e UPR, afetam o desfecho clínico do paciente em resposta ao tratamento alquilante, podendo servir como moduladores da resistência à quimioterapia em GBM.

O principal agente alquilante utilizado no tratamento do GBM é a TMZ, à qual gera O⁶-meG como lesão mais tóxica. Parte da resistência observada nos pacientes ao tratamento com TMZ é relacionada a reação suicida da MGMT que repara a lesão O⁶-meG. Contudo, TMZ produz N³-meA, outra lesão também tóxica às células que é reparada por AAG (ERASIMUS et al., 2016). Nos dados analisados neste trabalho, pacientes com expressão elevada de AAG obtiveram uma sobrevida significativamente pior quando submetidos ao tratamento alquilante. Não houve diferença para os níveis de AAG na coorte desconsiderando-se tratamento, tal resultado já era esperado uma vez que esta enzima é importante para reparar danos causados por agentes alquilantes.

O envolvimento de AAG no desfecho final do tratamento em pacientes de GBM já havia sido anteriormente demonstrado (AGNIHOTRI et al., 2012; FOSMARK et al., 2017; LIU et al., 2012). No estudo de AGNIHOTRI et al., (2012), o escore positivo de AAG, determinado através de imuno-histoquímica, nos pacientes que receberam tratamento padrão para GBM (cirurgia, seguida de radioterapia e TMZ) foi associado a uma sobrevivência menor quando comparado com pacientes que possuíam um escore AAG negativo. Resultados semelhantes foram também encontrados com dados da plataforma REMBRANT (*Repository of Molecular Brain Neoplasia Data* (REMBRANDT; <http://rembrandt-db.nci.nih.gov/>), de expressão de RNA. Quando a análise foi realizada em pacientes que foram tratados apenas com radioterapia e não receberam agente alquilante, a expressão de AAG não teve efeito na sobrevida dos pacientes. Em LIU et al., (2012), pacientes com AAG positiva, também determinada através de imuno-histoquímica, apresentaram sobrevivência significativamente mais curta do que aqueles

com AAG negativa. Entretanto, em FOSMARK et al., (2017), a associação encontrada foi oposta aos estudos anteriores. Apesar de AAG ter maiores níveis de expressão no grupo de pacientes com tumores mais agressivos (WHO IV), os achados demonstraram que pacientes com AAG positiva apresentavam melhor sobrevida comparados com pacientes com menor expressão (FOSMARK et al., 2017).

A ativação do UPR nas células tumorais pode ser decorrente de sua proliferação rápida e descontrolada que sobrecarrega a capacidade do RE levando ao acúmulo de proteínas mal dobradas nesta organela. Na tentativa de restaurar a homeostase perturbada pelo estresse do RE, o UPR atua através de uma cascata de sinalização para aumentar a capacidade de dobramento e degradação de proteínas não dobradas e diminuir a síntese proteica (LUO; LEE, 2013). Os resultados observados mostraram que quando elevado, o UPR afeta negativamente a sobrevivência, sugerindo para um provável papel desta via no desenvolvimento do tumor e na resistência ao tratamento (URRA et al., 2016). São ausentes na literatura dados referentes a uma assinatura transcricional da resposta de estresse do RE associados à sobrevida média de pacientes com GBM. Alguns estudos, no entanto, exploram a expressão individual de sensores e alvos da via de UPR e sua respectiva importância para sobrevida em diferentes tipos de tumores.

Em trabalhos utilizando diferentes modelos tumorais, incluindo GBM (PLUQUET et al., 2013), a expressão diminuída ou ausente de XBP1 foi correlacionada com uma melhor sobrevida do paciente (VIERI et al., 2015). Entretanto, a superexpressão deste marcador foi associada com sobrevida mais curta (HE et al., 2013; HSU et al., 2018; XIA et al., 2016), menor tempo livre de recorrências (CHEN et al., 2014; XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, 2015) e capaz de prever desfecho desfavorável para o paciente (KHARABI MASOULEH et al., 2014). Da mesma forma, expressão maior que a média de ERN1, também conhecido como IRE1 α - ativador de XBP1s, foi capaz de prever a falha na remissão completa dos pacientes (KHARABI MASOULEH et al.,

2014), servindo como preditor de mau prognóstico (SAKATANI et al., 2017). Tais trabalhos sugerem que a ativação da sinalização de IRE1 α e XBP1 correlaciona-se com uma menor sobrevida do paciente e com a agressividade do tumor, servindo como genes preditores de sobrevida (VIERI et al., 2015).

Além de XBP1, níveis elevados de ATF6 e GRP78 também estão correlacionados com sobrevida mais curta dos pacientes e pior prognóstico (EIGNER et al., 2017; GUO et al., 2018; MA et al., 2015; REN et al., 2017; XIA et al., 2014), quando comparados aqueles com menor expressão, possuindo potencial para marcador de progressão e prognóstico (ZHENG; GONG; ZHAO, 2017). A expressão de alvos a jusante da via de PERK, como os fatores de transcrição ATF4, ATF3 e CHOP também são associados à malignidade e negativamente a sobrevivência (DALTON et al., 2013; EIGNER et al., 2017; WOLFORD et al., 2013). No entanto, existem evidências contrárias associando expressão positiva de GRP78, ATF6, ATF4, ATF3, PERK e HERPUD com melhor desfecho clínico e tempo maior de sobrevida livre de doença em adenocarcinoma de pulmão, melanoma, mieloma, carcinoma de células esofágicas, câncer colorretal e de mama (EIGNER et al., 2017; NARITA et al., 2015; SAKATANI et al., 2017; THORNTON et al., 2013; XIE et al., 2014; YERUSHALMI et al., 2015).

O envolvimento da AAG na regulação do UPR parece ser uma função generalizada uma vez que marcadores dos diferentes ramos desta resposta foram afetados pelos níveis de expressão de AAG na análise *in vitro* e *in vivo*. Neste contexto, a estratégia empregada do conjunto de genes de UPR possibilitou a análise da participação de vários transcritos desta via na sobrevida dos pacientes de GBM. Ao associarem-se os níveis de AAG e UPR, observou-se que níveis diminuídos da enzima de BER predominam sobre os níveis de UPR para melhor sobrevida dos pacientes submetidos ao tratamento alquilante. Uma vez que a expressão gênica foi avaliada antes do tratamento, alterações em ambos os marcados pela exposição ao agente alquilante não podem ser determinadas. No entanto, podemos argumentar que a

melhora no desfecho clínico dos pacientes com menores níveis de AAG independentemente dos níveis iniciais de UPR é também consequência do papel desta enzima na indução de UPR pelo tratamento alquilante. Neste caso, níveis diminuídos de AAG poderiam impactar a sobrevivência celular por prevenir uma ativação adicional da resposta adaptativa desencadeada pelo estresse de RE e em vez disso direcionar as células tumorais para morte celular. Tal hipótese concorda com a indução prejudicada de UPR pelo MMS nas células T98G shAAG e redução de sobrevivência observada perante o tratamento alquilante com MMS ou TMZ. É importante ressaltar que elevados níveis de marcadores de UPR já foram descritos em células T98G WT quando comparados à células não tumorais (PYRKO et al., 2007), classificando-as dentro da coorte HH, enquanto que shAAG, enquadraria-se no grupo LH. Na análise comparativa dos grupos sob tratamento alquilante, evidencia-se o benefício do tratamento nos pacientes com menores níveis dos dois marcadores em relação àqueles com níveis elevados. Apesar da significância apenas ser observada na comparação de HH vs LL, nos demais grupos pode-se notar que a dupla baixa expressão apresenta uma tendência de melhor sobrevida.

A compreensão das vias que regulam as respostas ao tratamento bem como o desenvolvimento tumoral é fundamental para traçar táticas efetivas que superam a resistência tumoral proporcionando benefícios reais aos pacientes. Coletivamente, os dados apresentados indicam que AAG e seu papel no UPR são importantes determinadores para a sobrevivência do GBM. No entanto, esta análise é retrospectiva, sendo importante salientar que mais estudos preditivos e prospectivos devem ser realizados para determinar o papel de AAG no desenvolvimento do UPR e seu respectivo uso como ferramenta prognóstica. Dada a importância do UPR e do BER para a sobrevivência das células tumorais e para a resposta a terapia, nos propomos que a modulação destas vias poderia potencialmente melhorar uma resposta ao regime quimioterápico, sendo útil para estratificação dos pacientes que melhor se beneficiam

de uma terapia e como um alvo atrativo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

7. DISCUSSÃO INTEGRADA

A exposição a fatores externos, como luz UV, radiação ionizante e agentes genotóxicos e internos como subprodutos do metabolismo, perturba a homeostasia celular e induz estresse, podendo comprometer a função de proteínas, de membranas e do DNA. Diante destas condições adversas, as células evoluíram estratégias de sinalização que detectam e comunicam o estresse através da ativação temporária de programas que regulam a transcrição e a tradução, além do estado metabólico celular (VIHERVAARA; DUARTE; LIS, 2018).

Neste trabalho, descreveu-se o envolvimento da AAG (*alkyladenine DNA glycosylase*), uma DNA glicosilase integrante do BER, na mediação de um complexo conjunto de respostas direcionadas a reestabelecer a homeostase proteica após estresse no RE, em adição ao seu papel na manutenção da integridade genômica.

Tendo como substrato uma variedade de bases alquiladas, a AAG é responsável pelo reparo dos danos originados por uma gama de agentes incluindo subprodutos do metabolismo endógeno, dieta, poluição ambiental e fármacos utilizados na quimioterapia (GOLDMAN; SHIELDS, 2003; LEE et al., 2009; NAGY et al., 2013; SEDGWICK et al., 2007). A característica desta enzima pode ser observada nos diferentes desfechos de sua modulação em modelos experimentais. Dependendo do tipo de estímulo e do modelo experimental analisado, AAG pode atuar por um lado protegendo a integridade genômica e evitando um risco elevado de câncer, e por outro a cascata de reações iniciadas por sua atividade de reparo na presença do dano alquilante pode levar à degeneração tecidual (CALVO et al., 2013; EBRAHIMKHANI et al., 2014; ENGELWARD et al., 1996; MAOR-SHOSHANI et al., 2008; MEIRA et al., 2008, 2014).

No contexto dos GBMs, experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstram que AAG confere resistência à terapia com TMZ de forma similar e sinérgica àquela conferida

por MGMT. Da mesma forma, a perda de AAG levou ao aumento de morte celular frente ao tratamento com TMZ, sugerindo que as lesões N³meA e N⁷meG induzidas por esta droga medeiam a toxicidade celular. Além dos modelos experimentais, a elevada expressão de AAG também está correlacionada com uma piora na sobrevida de pacientes com GBM submetidos ao tratamento alquilante em conjunto com a radioterapia, salientando a potencial importância de avaliarem-se os níveis de AAG em conjunto aos de MGMT (AGNIHOTRI et al., 2012a; BOBOLA et al., 2007).

A relevância desta proteína para a resposta do GBM à terapia, fundamentou a construção das linhagens celulares apresentadas no Capítulo I. Utilizando duas linhagens celulares de GBM, cujos níveis de AAG foram explorados anteriormente na literatura, decidimos realizar a modulação de AAG através do silenciamento na linhagem T98G (níveis basais de AAG elevados) e da superexpressão na linhagem A172 (níveis basais de AAG reduzidos) (AGNIHOTRI et al., 2012b). Os resultados obtidos após exposição aos agentes alquilantes TMZ e MMS, demonstraram que células expressando níveis menores de AAG, basalmente ou por silenciamento, são mais sensíveis que células apresentando níveis maiores, quando avaliados para viabilidade e sobrevivência celular, de acordo com estudos previamente publicados (AGNIHOTRI et al., 2012b; BOBOLA et al., 2007). Sensibilidade similar foi também descrita em células embrionárias e HeLa, ambas deficientes em AAG (ELDER et al., 1998; ENGELWARD et al., 1996; PAIK et al., 2005).

O funcionamento adequado da via do BER controla a produção excessiva de intermediários tóxicos (i.e., sítios AP, 5'dRP, SSBs), que possibilita a sobrevivência celular e colabora para a agressividade tumoral, culminando em desfechos clínicos desfavoráveis (MAYNARD et al., 2008). Em contrapartida, a ocorrência de um desequilíbrio nesta via pode acarretar diferentes destinos celulares, uma vez que permite tanto o acúmulo de lesões citotóxicas como mutagênicas, dependendo da etapa em que este ocorre (PAIK et al., 2005; SOBOL et al., 2002). No caso de atividade

deficiente de um componente a montante, como uma DNA glicosilase, o começo da via do BER é prejudicado provocando o acúmulo de lesões (TANG et al, 2010).

No entanto, estudos em que AAG foi superexpressa exploram a possibilidade na qual a atividade de reparo adicional, ao contrário de conferir resistência e proteção aos agentes alquilantes, aumentaria a suscetibilidade aos mesmos. Nesse sentido, a elevada expressão desta enzima resultou em um aumento nas aberrações cromossômicas em modelos *in vitro* e *in vivo* e letalidade elevada em animais superexpressando *Aag* expostos ao MMS. Ainda, observou-se citotoxicidade em tipos celulares específicos como timo, baço, células β pancreáticas, células granulares do cerebelo, além de degeneração na retina (CALVO et al., 2013; COQUERELLE; DOSCH; KAINA, 1995; MEIRA et al., 2009a). Tal efeito tem sido associado ao reparo das lesões N⁷meG que apesar de inócuas *per se* geram intermediários tóxicos que sobrecarregam as enzimas subsequentes da via do BER, promovendo o acúmulo destas lesões e a citotoxicidade (CALVO et al., 2013, 2016; FU; CALVO; SAMSON, 2012; RINNE et al., 2005). Esta proposta tem sido explorada como uma possível estratégia terapêutica para aprimorar o tratamento tumoral através do aumento na morte celular (FISHEL et al., 2003, 2007; LEGUISAMO et al., 2017; RINNE; CALDWELL; KELLEY, 2004).

Esta variabilidade fenotípica salienta o quão refinada pode ser a resposta aos agentes alquilantes, uma vez que cenários contrastantes são observados em diferentes tecidos dentro de um mesmo organismo (CALVO et al., 2013; MEIRA et al., 2009b). Fatores como o estado replicativo e metabólico, além do microambiente celular e da expressão de outras proteínas do BER provavelmente tem papel na divergência destas respostas.

Buscando identificar possíveis fatores que contribuem para as diferentes respostas à alquilação, avaliou-se o perfil transcricional de animais *wild type* e *Aag* *-/-* expostos ao MMS. Nesta análise, um grupo de transcritos diferencialmente expressos

e relacionados ao estresse de ER foram identificados apenas nos animais proficientes em *Aag*. Estes dados corroboram trabalhos realizados em *Saccharomyces cerevisiae* nos quais o tratamento alquilante resultou na indução transcricional do UPR (JELINSKY et al., 2000; JELINSKY; SAMSON, 1999). Assim, o Capítulo II descreve a caracterização deste possível envolvimento de AAG na resposta ao estresse de RE induzido por agentes alquilantes. Através de diferentes marcadores do UPR, demonstrou-se que de fato a exposição ao agente alquilante MMS leva a indução do estresse no RE em fígados de camundongos e em células de GBM.

Usualmente utilizados por suas propriedades genotóxicas, outra faceta pouco explorada dos agentes alquilantes, é a sua capacidade de alquilar proteínas, preferencialmente em cisteínas, histidinas e valinas, o que pode ser responsável parcialmente pela indução do estresse de RE (BOFFA; BOLOGNESI; MARIANI, 1987; ZHANG et al., 2005). Além disso, ZANOTTO-FILHO et al. (2016) demonstraram que um dos fatores determinantes para a sobrevivência ao MMS é a ativação do UPR, onde a superexpressão da chaperona BiP foi capaz de promover resistência a este agente alquilante. Embora não tenha sido determinado pelos autores, estes propõem que proteínas nascentes alquiladas no RE estejam relacionadas ao mecanismo pelo qual agentes alquilantes desencadeiam o estresse no RE. Os mesmos autores também mostraram que a síntese de GSH (glutationa) regulada por NRF2 é responsável pela detoxificação do MMS, e que a ausência deste mecanismo permite a reação de agentes alquilantes com proteínas, perturbando a homeostase do RE (ZANOTTO-FILHO et al., 2016b).

A avaliação da resposta proteômica produzida pelo MMS apresenta não só o enriquecimento de proteínas relacionadas as respostas ao dano em DNA (DDR), mas também a componentes dos sistemas ubiquitina-proteassoma e proteassoma independente de ubiquitina. Estas vias poderiam estar relacionadas a identificação de

proteínas danificadas pelo agente alquilante como alvos para degradação (ASLANIAN; YATES; HUNTER, 2014; MAZUMDER et al., 2013; ROCHETTE et al., 2014).

Neste trabalho, não apenas demonstrou-se que o MMS foi capaz de desencadear UPR nos nossos modelos de estudo, como também a importância de AAG para suscitar tal resposta na presença deste agente alquilante. Adicionalmente, identificou-se o envolvimento do eixo IRE1 α /XBP1, embora o envolvimento dos demais ramos do UPR não possa ser excluído. Apesar da ativação de PERK não ter sido medida diretamente, apresentou-se no mesmo Capítulo resultados onde linhagens disruptadas (*knock-out*) em PERK são mais resistentes ao tratamento com MMS, destacando o papel desta proteína sensora na morte celular induzida pelo MMS.

No Capítulo II, demonstrou-se também que ao contrário do que ocorre com agentes alquilantes, na qual a indução de UPR necessita de AAG, a indução deste processo pela exposição a TG não parece depender desta enzima. Estes dados sugerem que as células deficientes em AAG não são impossibilitadas da ativação do UPR *per se* e sim que, a ativação completa do UPR induzido pelo tratamento alquilante não pode ser desencadeada quando AAG está ausente. Suportando esta hipótese, hidrato de morina, previamente identificado como inibidor de AAG, foi recentemente descrito por proteger células e camundongos da nefrotoxicidade induzida por cisplatina por notavelmente reduzir o estresse oxidativo induzido pelo estresse de RE e pela inflamação (DIXON et al., 2015; SINGH; CHAUHAN; KANG, 2018). Experimentos complementares utilizando um ensaio repórter de luciferase foram realizados para confirmar a indução do UPR. Embora ainda preliminares, estes resultados apresentados no ANEXO I (Figura 1), mostram que a indução do elemento repórter responsivo ao estresse de RE (que pode ser ativado por ATF6f e XBP1s) observado em células shNS tratadas com MMS é reduzida na ausência de AAG (Figura A).

Conquanto tenham-se apresentado dados que suportam o envolvimento de AAG na resposta ao estresse de RE, o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não foi elucidado. É possível que isto aconteça de forma dependente da atividade de AAG na detecção e/ou processamento de dano no DNA suscitando respostas de estresse celular ou que AAG tenha uma função independente do reparo necessária para ativação do UPR. Algumas das hipóteses geradas são discutidas a seguir:

i) A participação de AAG na resposta ao estresse do RE poderia ocorrer pela ativação consecutiva do UPR em resposta ao desequilíbrio gerado na inicialização do reparo pela AAG na presença do agente alquilante (ou agente que danifique DNA). Como mencionado anteriormente, o acúmulo de intermediários tóxicos gerados no reparo iniciado pela AAG pode ser prejudicial à sobrevivência celular (FU; CALVO; SAMSON, 2012). Tais intermediários poderiam acarretar em um bloqueio da transcrição, que levaria a tradução de transcritos errôneos em proteínas truncadas e/ou mal enoveladas, desencadeando o estresse do RE e ativação canônica do UPR (EDENBERG; DOWNEY; TOCZYSKI, 2014; WURTMANN; WOLIN, 2009). Neste modelo apresentado na Figura 8, a participação de AAG no UPR depende da atividade de reparo desta enzima, onde a ausência de AAG não formaria os intermediários tóxicos sem levar ao estresse no RE. Essa hipótese poderia ser aplicada também para os cenários nos quais AAG toma parte na degeneração tecidual (CALVO et al., 2013; MEIRA et al., 2009b). A diferença observada na ativação do UPR frente aos tratamentos de MMS e TG, na ausência de AAG, pode sugerir que a participação desta enzima na resposta ao estresse do RE acontece apenas na presença de danos no DNA. Assim, agentes como o MMS, clássico indutor de danos alquilantes no DNA (BERANEK, 1990), requerem a presença de AAG para a indução do UPR, enquanto outros agentes como TG, cujo mecanismo de ação conhecido não envolve a formação de danos no DNA (ANDERSEN et al., 2015; DOAN et al., 2015), não necessitam desta enzima. Complementando esta hipótese, também observou-se no Capítulo III, que a deficiência

de AAG também afeta a resposta ao estresse do RE induzida por SLN, um agente que induz estresse de RE e que também leva a formação de danos no DNA e ao estresse oxidativo (DEWANGAN; SRIVASTAVA; RATH, 2017).

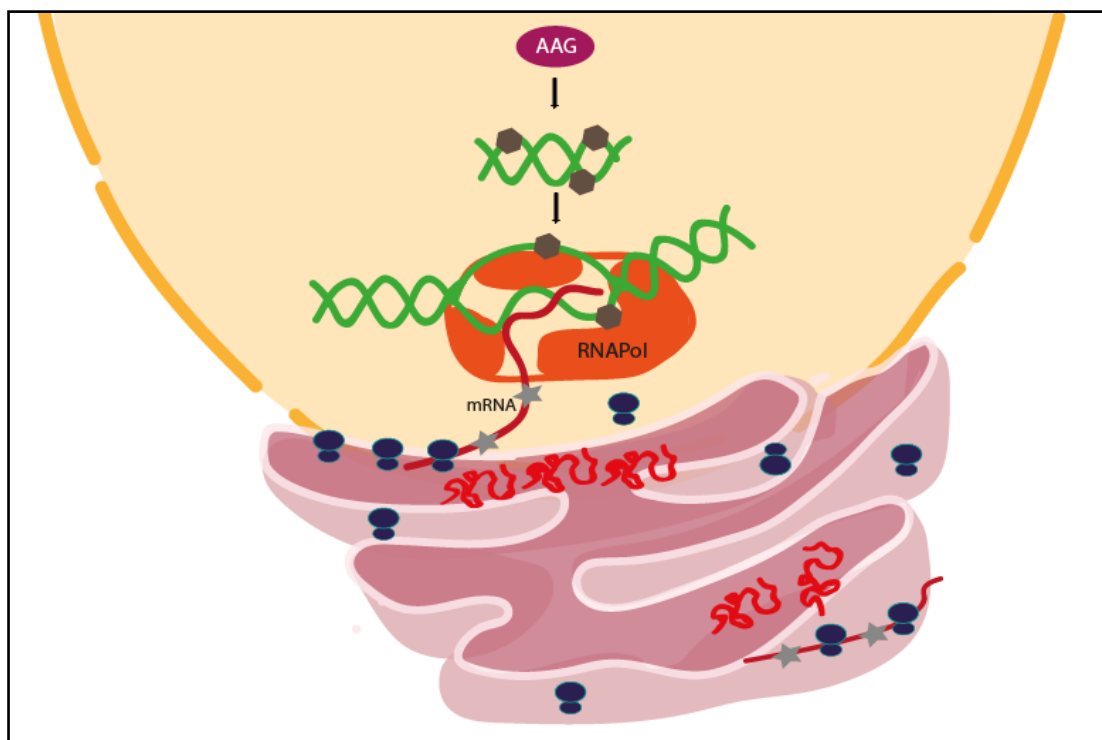


Figura 8. Hipótese de ativação do UPR reparo-dependente. O reparo iniciado pela AAG poderia gerar o acúmulo de intermediários tóxicos (marrom) levando ao bloqueio da transcrição e/ou a formação de mRNAs que seriam traduzidos em proteínas truncadas e/ou mal enoveladas, desencadeando o estresse a resposta de estresse no RE.

ii) Um dos fatores associados ao reparo conduzido pela Aag é a ativação de Parp-1 (CALVO et al., 2013), cuja hiperativação, pelo acúmulo de intermediários tóxicos resultantes do reparo iniciado pela AAG, pode causar uma depleção de NAD⁺ (Alhumaydhi, 2018, em preparação). A escassez de NAD⁺, reduz a taxa de produção de ATP, e por requerer ATP, a geração de NAD⁺ é ainda mais prejudicada por este desequilíbrio nos níveis de ATP (HOUTKOOPEr et al., 2010). A capacidade de enovelamento do RE também pode ser afetada pela depleção de ATP, desta forma o reparo iniciado pela AAG levaria a uma deficiência energética tendo como resultado o

acúmulo de proteínas não enoveladas adequadamente e a ativação do UPR (WANG; KAUFMAN, 2014b).

Adicionalmente, PARP-1 poderia ter papel similar ao da AAG na ativação do UPR. Por exemplo, na presença de dano oxidativo, PARP-1 promoveu a atividade do proteasoma 20S, contribuindo para a remoção de proteínas oxidadas (CATALGOL et al., 2010; ULLRICH et al., 1999). Em adição, PARP-1 poderia ter papel direto na ativação do UPR, e ausência dessa ativação na deficiência de AAG ocorrer pelo não recrutamento de PARP-1. Resultados preliminares apresentados no ANEXO I, Figura 2 B, indicam que células deficientes em PARP-1 também apresentam uma resposta de UPR comprometida na presença de MMS.

iii) No que tange uma função de AAG independentemente de sua atividade de reparo, esta proteína poderia estar interagindo direta ou indiretamente - através de parceiros, com componentes envolvidos na ativação da resposta ao estresse de RE ou na regulação da transcrição de forma geral. Neste cenário, AAG teria uma nova função que poderia ocorrer isoladamente ou de forma complementar ao papel desta glicosilase no reparo de bases.

Dentro os possíveis parceiros de AAG, esta glicosilase interage diretamente com proteínas como RAD23A e B humanas, p53, UHRF1 (*ubiquitin-like, PHD and ring finger-containing 1*), e receptor de estrogênio α (ER α/β), que possuem papel conhecido na regulação transcricional e/ou em vias proteolíticas mediadas por ubiquitina (LIANG et al., 2013; LIKHTE et al., 2004; MIAO et al., 2000). Sendo que o receptor de estrogênio, ER α/β , tem papel associado a uma resposta adaptativa do UPR (ANDRUSKA et al., 2015; PAPA; GERMAIN, 2011; RAJAPAKSA; THOMAS; GUSTAFSSON, 2016).

Além do enriquecimento de transcritos relacionados a resposta ao estresse no RE nos animais proficientes em AAG tratados com MMS, a análise dos dados de

microarranjo (depositada no GEO, GSE115254) mostra que dentre os transcritos diferencialmente expressos nos animais *Aag*^{-/-} tratados com MMS e comparados aos WT também tratados, estão *Gpx7* e *Parp16* (ANEXO I, Figura 3).

Gpx7 codifica uma peroxidase residente no RE que é capaz de detoxificar o H₂O₂ gerado como subproduto na formação de pontes dissulfeto pela família de proteínas Ero1 e na re-oxidação de PDIs (*Protein disulfide isomerase*), e quando adicionada a uma mistura de proteínas reduzidas e desnaturadas, resultou em um rápido enovelamento oxidativo (NGUYEN et al., 2011; WANG et al., 2014). A expressão dessa GPx do RE em células-β pancreáticas também foi capaz de reduzir o estresse de RE induzido por palmitato e proteger contra a apoptose gerada por este agente (MEHMETI et al., 2017). Ainda, em condições fisiológicas sugere-se que há uma competição entre os substratos de GPx7, GSH e PDI, onde a taxa de oxidação de PDI depende dos níveis de GSH (MAIORINO et al., 2015). Essa regulação dos substratos de GPx7 por GSH, vai de encontro ao modelo proposto por ZANOTTO-FILHO et al., 2016b, onde a redução dos níveis GSH após o tratamento com MMS desequilibra a homeostasia no RE.

iv) Não existem relatos na literatura de uma relação de AAG com a regulação de GPx7 ou GSH, mas a análise dos resultados indica uma redução do estresse de RE nos animais deficientes em *Aag* que poderia estar acontecendo pelo aumento da expressão de GPx7 possivelmente associado a regulação de PERK/NRF2 (Figura 9), ou ainda pela ativação de NRF2 de forma independente de PERK, como proposto por ZANOTTO-FILHO et al., (2016b).

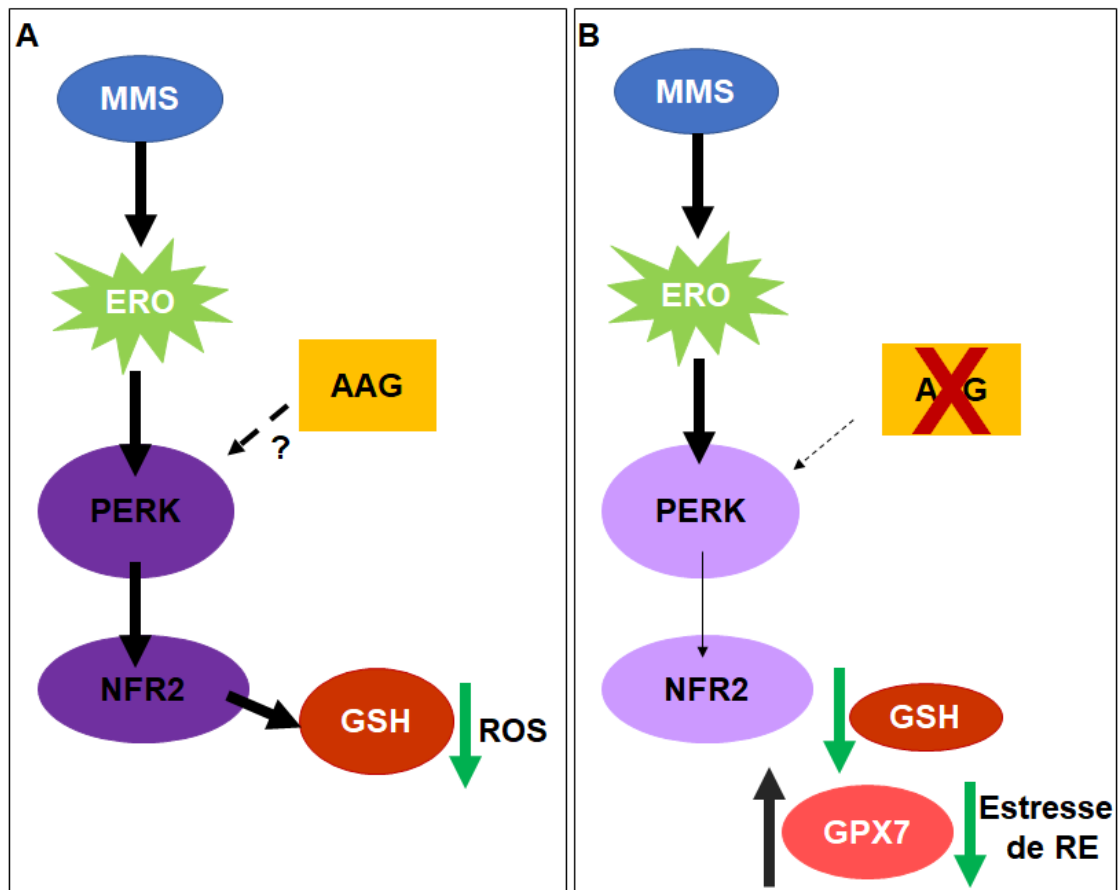


Figura 9. Níveis de Gpx7 são elevados pelo tratamento com MMS na ausência de AAG. A) O tratamento com MMS pode levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que ativariam a via da PERK e conseqüentemente seu alvo NRF2. NRF2 controla os níveis de GSH, que na presença do MMS são elevados para reduzir na formação de ERO. B) Na ausência de AAG, a via da PERK está debilitada impedindo o controle de NRF2 sobre os níveis de GSH. Em níveis reduzidos de GSH, Gpx7 atua preferencialmente re-oxidando PDIs e reduzindo o estresse no RE.

Suportando esta hipótese, estudos demonstraram que a exposição ao MMS elevou níveis intracelulares de ERO em *S. cerevisiae* e foi capaz de esgotar a glutathiona, induzir a peroxidação lipídica e a morte celular, processos esses que foram revertidos pela atividade antioxidante (ROSA et al., 2007; ROWE; DEGTYAREVA; DOETSCH, 2008; SALMON et al., 2004). Durante o envelhecimento proteico promovido pelo estresse no RE ocorre a formação de ERO, a via da PERK é então ativada induzindo NRF2, que por sua vez ativa a transcrição de GSH protegendo contra o estresse oxidativo. No entanto, a produção contínua de ERO também diminuiu a proteção antioxidante regulada por NRF2 (PERIYASAMY; SHINOHARA, 2017).

PARP-16 é uma proteína transmembrana ancorada no RE e necessária para a ativação dos sensores de estresse do RE, PERK e IRE1 α , sugerindo um papel na regulação do UPR (DI PAOLA et al., 2012; JWA; CHANG, 2012). Células deficientes em PARP-16 não parecem ser afetadas por outros estresses celulares como dano em DNA, uma vez que exibem níveis similares de γ H2AX, quando expostos a cisplatina. A porção luminal C-terminal da PARP-16 é necessária para a função da PARP-16 durante o estresse de ER e parece facilitar a dissociação de BiP dos domínios luminiais de PERK e IRE1 α na presença de estresse, sugerindo que a porção C-terminal transduza sinais de estresse para o domínio catalítico citoplasmático de PARP (JWA; CHANG, 2012). Os níveis elevados de PARP-16 nos animais deficientes em Aag podem sugerir algum mecanismo de retroalimentação (*feedback*), onde na resposta anormal apresentada pelos animais deficientes em Aag na presença de estresse no RE, a indução da expressão de PARP-16 tenta promover a ativação do UPR.

Com base nas evidências discutidas na introdução deste trabalho (item 1.2.6), fica claro o papel essencial do controle da proteostase do RE, pelos componentes do UPR, no processo de tumorigênese (CORAZZARI et al., 2017; URRÁ et al., 2016). Especificamente em GBMs, a superexpressão de BiP e XBP1 é associada a agressividade tumoral e pior prognóstico (MARTIN et al., 2013; PLUQUET et al., 2013; PRABHU et al., 2012; PYRKO et al., 2007). Ainda no mesmo ramo de XBP1, demonstrou-se que IRE1 α contribui para a infiltração e motilidade dos gliomas pela modulação de fatores pro-angiogênicos e citocinas pro-inflamatórias (DEJEANS et al., 2012; JABOUILLE et al., 2015; PLUQUET et al., 2013). Além disso, ATF6 também participa no desenvolvimento dos GBMs e na resistência a radioterapia (DADEY et al., 2016; TOLEDO et al., 2015), enquanto PERK está envolvido no crescimento e sobrevivência destes tumores (HAMED et al., 2010; HOU et al., 2015; YACOUB et al., 2010).

O UPR pode ter como desfecho respostas pró-sobrevivência, onde atua inibindo a síntese proteica, aumentando a capacidade de enovelamento do ER e degradando proteínas mal enoveladas. No entanto, o UPR pode falhar na recuperação da homeostase do RE na presença de um estresse prolongado na organela e desta forma mediar programas de morte celular (CORAZZARI et al., 2017).

A ativação de PERK e IRE1 α parece ser persistente ao longo do estresse duradouro no RE (Figura 10). A resposta inicial ao estresse no RE, ocorre a ativação de fatores iniciais como ATF4, XBP1 e ATF6. ATF6 e IRE1 são ativados de forma transiente e aguda na resposta citoprotetora (WANG et al., 2018). Nesta etapa, ATF4 aumenta a expressão de fatores pró-apoptóticos (PUMA e NOXA), que são eficientemente neutralizados pela expressão paralela de fatores anti-apoptóticos (MCL-1 e BCL-2). Ainda nesta fase, a atividade pro-apoptótica de CHOP também é inibida (CORAZZARI et al., 2017).

Embora a natureza do mecanismo de troca entre as vias de sobrevivência e morte celular ainda não tenha sido completamente elucidada, esta alternância parece envolver IRE1 α . Na fase adaptativa, IRE1 α aumenta a capacidade de enovelamento pelo processamento de XBP1, que atuará regulando os genes alvos do UPR. Durante a transição da fase adaptativa para a resposta apoptótica na presença do estresse prolongado, a sinalização mediada por IRE1 α /XBP1s começa a ser atenuada e ao mesmo tempo, ocorre a ativação de RIDD por IRE1 α que de forma contínua pode degradar transcritos de chaperonas do ER, reduzindo a capacidade de enovelamento.(CHEN; BRANDIZZI, 2013; WANG et al., 2018). Essa transição da resposta de sobrevivência/morte também é caracterizada pelo declínio da expressão de ATF4 e ativação de CHOP (CORAZZARI et al., 2017).

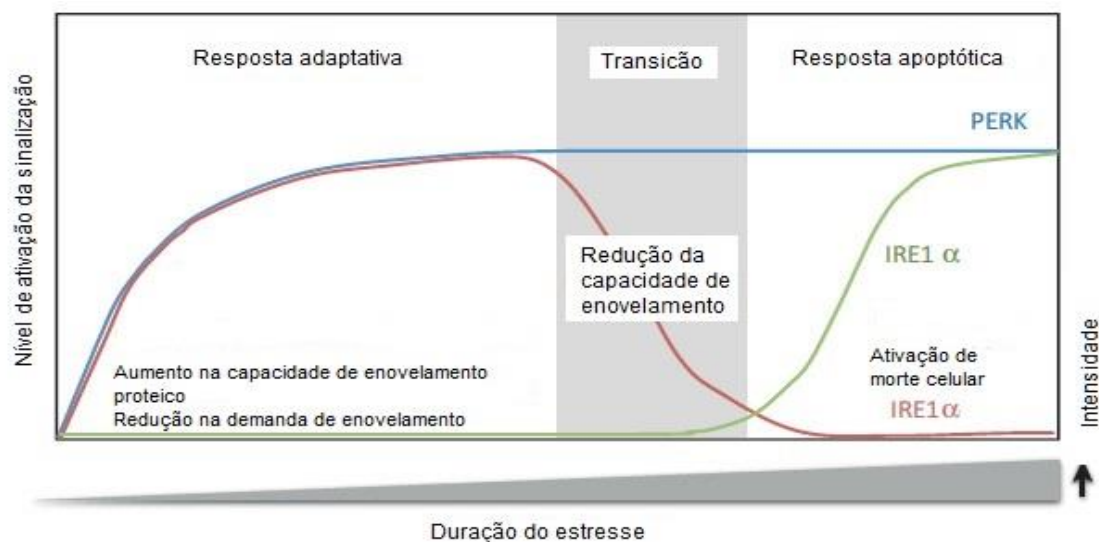


Figura 10. Modelo de ativação do UPR na determinação do destino celular na presença de estresse no RE. Na presença de estresse prolongado no RE, inicialmente uma resposta adaptativa é ativada pelas proteínas sensoras PERK e IRE1- α , a última pelo processamento de XBP1 (linha vermelha). Na fase de transição ocorre o declínio de XBP1 e a ativação de RIDD, também por IRE1 α (linha verde). Durante toda a resposta a via da PERK continua ativa, sendo que no desfecho apoptótico ocorre a elevação dos níveis de CHOP, enquanto ATF6 acompanha a primeira elevação de IRE1 (CHEN; BRANDIZZI, 2013).

No Capítulo III, tentamos explorar este novo papel de AAG na modulação do UPR como uma possível estratégia para melhorar o tratamento de pacientes com GBM. Uma das abordagens empregando a resposta de estresse ao RE no tratamento do câncer, visa o aumento de estresse que satura a capacidade do RE de funcionar. Este é o princípio do tratamento combinado de TMZ e SLN, cuja efetividade já havia sido demonstrada anteriormente (XIPELL et al., 2016b). Neste trabalho, demonstrou-se que o aumento na sensibilidade observado com a combinação de agente alquilante ao indutor farmacológico de estresse no RE é dependente da presença de AAG.

Diferentemente do que ocorre com agentes alquilantes isolados, onde a presença de AAG, confere resistência ao tratamento (Capítulo II, Figura 4), no tratamento combinado de TMZ e SLN células proficientes em AAG apresentam maior sensibilidade. Estes resultados sugerem que na presença do agente alquilante isoladamente, as células proficientes em AAG realizam a reparação dos danos (Figura

11 A) e ativam uma resposta do UPR moderada que permite adaptação e sobrevivência celular (Figura 11, painel da esquerda). No entanto, na ausência de AAG, o acúmulo das bases alquiladas somado a ausência da resposta adaptativa do UPR, desencadearia a morte celular. Esta morte celular ocorreria de forma independentemente do eixo PERK/CHOP, uma vez que não existe diferença significativa nos níveis de CHOP entre as células proficientes e deficientes em AAG frente a exposição ao MMS (Capítulo II, Figura 3).

No contexto do tratamento combinado de SLN e TMZ, além dos danos no DNA e um estresse mediano no RE gerados pelo agente alquilante, há um excesso de estresse no RE induzido pela SLN, nas células proficientes em AAG. Esse estresse combinado, excede a capacidade do RE e acaba ativando as vias de morte celular, como por exemplo, o eixo PERK (Figura 11, painel central). Concordando com esta hipótese, na presença do tratamento combinado há uma elevação nos níveis de CHOP na linhagem proficiente em AAG, não observada nas deficientes que são resistentes ao tratamento (Figura 11, direita). Somada a indução de estresse no RE, XIPELL et al., (2016b) demonstraram que SLN também atua reduzindo a expressão de proteínas de reparo de DNA como Rad51, MGMT e AAG após 24h de tratamento. Assim, não se pode excluir a possibilidade desta regulação também estar afetando a resposta frente o tratamento com SLN.

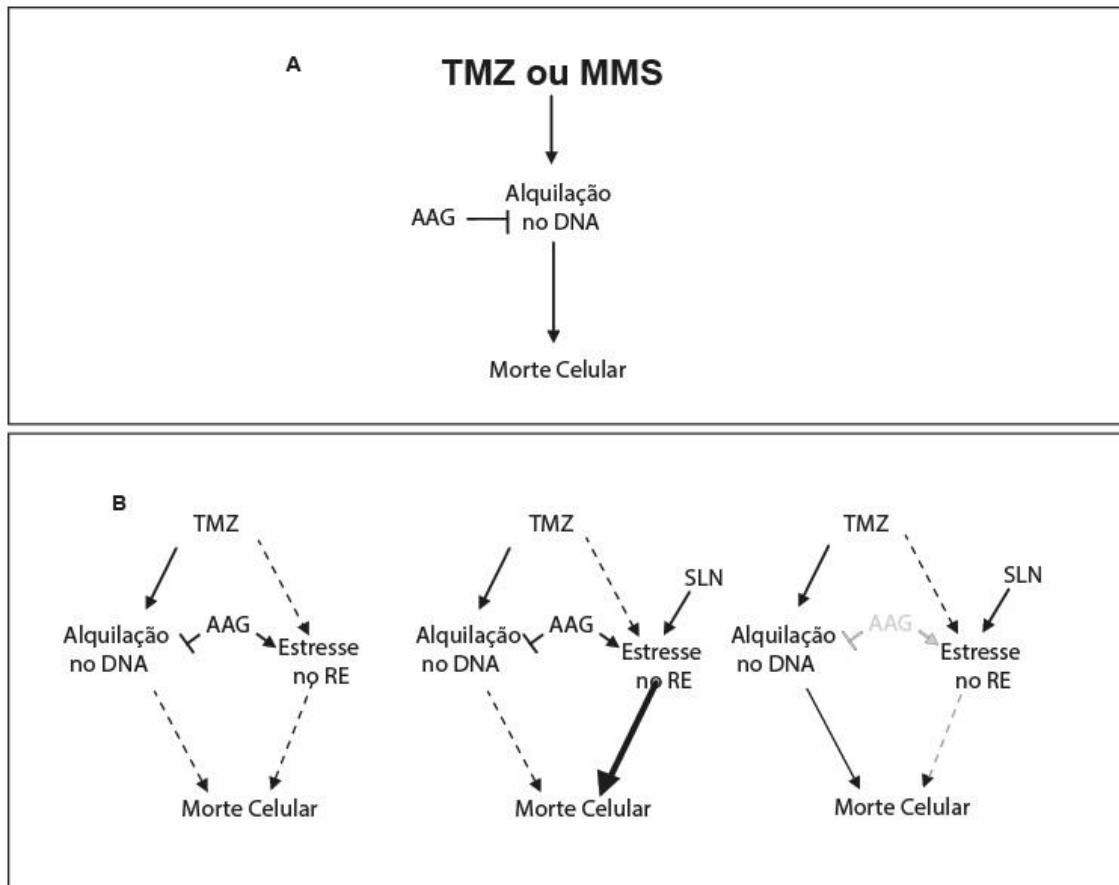


Figura 11. Modelo esquemático da participação de AAG na sobrevivência. A) Modelo clássico. Após tratamento com doses elevadas de um agente alquilante, na presença de AAG as lesões são reparadas e as células sobrevivem. Na ausência de AAG, ocorre o acúmulo das lesões e as células acabam morrendo. B) Painel da esquerda, na presença do agente alquilante, lesões são acumuladas no DNA e dependem da presença de AAG para evitar a morte celular, esse mesmo agente também é capaz de levar ao estresse no RE que ativa uma resposta adaptativa e também depende de AAG. Painel central, na presença de dano alquilante associado a indução farmacológica de estresse no RE com SLN, acontece uma indução exacerbada de estresse no RE que ativa as vias de morte celular controladas pelo UPR. No painel da direita, na ausência de AAG ocorre o acúmulo de lesões alquilantes no DNA que dependendo da intensidade do dano vão levar a morte celular. No entanto, não ocorre ativação da resposta ao estresse no RE que em conjunto com uma fraca indução de danos ao DNA pode permitir a sobrevivência.

Embora nossos resultados do Capítulo II demonstrem que AAG não afeta a indução dos marcadores de UPR após o tratamento com TG, após exposição a agentes indutores de estresse de RE - SLN, TG e TN (tunicamicina) - na presença de AAG, as células de GBM são mais sensíveis a estes fármacos. A discordância entre tais resultados pode ser decorrente dos diferentes tempos de tratamento com os fármacos utilizados para cada um dos ensaios e consecutivamente diferentes magnitudes de resposta. Análises de qPCR e western blot para avaliação dos marcadores de UPR

foram realizadas com exposição de 6 e 24h. Enquanto que, as análises de viabilidade foram feitas em tempos mais longos de tratamento (5 dias), indicando que AAG também afeta a sensibilidade mediada pela ativação do UPR, com agentes não alquilantes em tratamentos crônicos. Assim, as hipóteses apresentadas acima que dependem da atividade de reparo da AAG explicariam apenas parcialmente a resposta atenuada frente ao estresse de RE. Neste sentido, seria importante avaliar se o tratamento com estes indutores de estresse de RE resulta em diferentes níveis de danos no DNA entre células proficientes e deficientes em AAG.

Em trabalhos utilizando tratamento isolado de SLN, a indução do estresse de RE por este fármaco parece envolver IRE1 α , XBP1, CHOP, BIP além de ATF4 e P-eIF2 α (LI et al., 2013; XIPELL et al., 2016a; YU et al., 2017). No modelo estudado aqui, o tratamento combinado de SLN e TMZ promoveu a resposta de estresse no RE através dos marcadores BiP, CHOP e XBP1s, coincidindo com as vias previamente descritas. No entanto, não podemos excluir o envolvimento de outros componentes do UPR que não foram avaliados neste trabalho.

O tratamento isolado de SLN na linhagem shNS induziu níveis menores de XBP1 e CHOP que o tratamento combinado, indicando uma ação sinérgica na indução de estresse entre os dois agentes, enquanto, os níveis de ATF4 foram elevados significativamente apenas com SLN. A elevada expressão de CHOP associada a ausência de elevados níveis de ATF4 no tratamento combinado, de forma inversa ao observado no tratamento isolado e SLN, pode indicar que uma resposta mais rápida/e ou intensa aconteça na presença de SLN e TMZ que direciona as células para um desfecho de morte celular.

O tratamento isolado de SLN não foi capaz de elevar os níveis dos marcadores de UPR nas células deficientes em AAG, de forma semelhante aos observados em shNS. Essas observações tomadas em conjunto com os dados de sobrevivência

indicam que a ausência de AAG também afeta o UPR com agentes não alquilantes. Não obstante, devemos ser cautelosos em assumir tal premissa, uma vez que a indução de estresse de RE neste trabalho deu-se apenas de forma farmacológica e efeitos secundários como danos ao DNA não podem ser descartados.

Apesar dos níveis de PERK não terem apresentado diferença no tratamento combinado quando comparados aos tratamentos isolados de SLN e TMZ, a linhagem deficiente em AAG apresentou níveis menores do que a linhagem proficiente em todos os tratamentos. Em conjunto, esses resultados indicam que a deficiência de AAG afeta todos os ramos do UPR.

A atividade de SLN também está relacionada a formação de ERO (DEWANGAN; SRIVASTAVA; RATH, 2017), e parece conferir sensibilidade pela inibição de NRF2 e consecutivamente sua defesa antioxidante (ZHANG et al., 2017). Para averiguar melhor se esta resposta estaria relacionada ao envolvimento de AAG, níveis de ERO e NRF2 poderiam ser avaliados.

Durante a resposta ao estresse no RE o processo autofágico pode ser desencadeado e a ativação deste mecanismo parece proteger as células da apoptose induzida pelo UPR (LEI et al., 2017; RASHID et al., 2015). A formação de ERO resultantes do tratamento com SLN provoca um fluxo autofágico aberrante que pode culminar em necrose (XIPELL et al., 2016a; YUE et al., 2013). Na linhagem proficiente em AAG os níveis de LC3-II apresentam-se elevados, embora não haja uma redução de p62, indicando que estas células apresentam comportamento similar de fluxo autofágico aberrante como descrito anteriormente. No entanto, as células deficientes em AAG apresentam níveis reduzidos destes dois marcadores, o que sugere que o fluxo autofágico não é afetado da mesma forma.

Estes dados correlacionam-se com redução da viabilidade celular apresentada pelas células shNS frente ao tratamento combinado de SLN e TMZ, indicando que o bloqueio do fluxo autofágico permite o direcionamento para morte celular. Por outro lado, as linhagens deficientes em AAG são resistentes ao tratamento combinado, indicando que o não bloqueio do fluxo autofágico nestas células atua de forma citoprotetora e impede o desfecho de morte celular.

Experimentos incluindo inibidores e ativadores de autofagia seriam necessários para explorar o possível envolvimento de AAG neste balanço entre autofagia e morte celular, bem como a determinação do mecanismo de morte celular neste cenário. Apesar disso, os resultados do Capítulo III sugerem que abordagens empregando a modulação de autofagia, estresse de RE e reparo de DNA podem ser relevantes para aumentar a citotoxicidade no tumor. Adicionalmente, a redução na viabilidade celular, dependente dos níveis de AAG, no tratamento combinado de SLN e TMZ foi observada em baixas doses dos dois fármacos, surgindo como uma estratégia interessante para aumentar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos colaterais dos pacientes.

Dada a importância de AAG para a ativação do UPR na citotoxicidade causada pelo tratamento combinado de agente alquilante e indutor de estresse do RE, decidiu-se investigar se esse mecanismo seria relevante também para a sobrevida de pacientes com GBM. No Capítulo IV, utilizando dados de expressão e sobrevida do TCGA apresentamos a importância de AAG e um conjunto de transcritos do UPR para a sobrevida dos pacientes após tratamento com agente alquilante.

Os resultados apresentados sugerem que níveis reduzidos de AAG e UPR antes do tratamento foram importantes para uma melhor resposta ao agente alquilante, indicando que ambos os processos podem estar contribuindo para uma resposta adaptativa do tumor e conseqüentemente para a resistência. Desta forma, a

determinação dos níveis de expressão destes marcadores pode ser relevante para a escolha do tratamento.

Para inferir que níveis reduzidos de AAG impactem a sobrevida dos pacientes por impedir uma regulação adaptativa do UPR, a análise sistemática dos níveis destes dois marcadores e sua correlação antes e depois do tratamento deve ser realizada. Assim, uma possível abordagem como ferramenta indicadora de desfecho para classificar pacientes que respondem melhor às terapias adjuvantes e o potencial terapêutico da modulação destas vias em grupos específicos de pacientes, poderia ser determinada.

Indícios de uma cooperação entre vias de reparo de DNA e UPR em resposta a estresses celulares foram previamente reportados. Por exemplo, a indução de estresse de RE elevou a expressão de proteínas de reparo de DNA e sensoras de dano (ACOSTA-ALVEAR et al., 2007; WEATHERBEE; KRAUS; ROSS, 2016). Em particular, um dos subconjuntos de alvos de XBP1 são genes de reparo de DNA (ACOSTA-ALVEAR et al., 2007). Outros estudos demonstraram que a indução de estresse no RE pode levar a redução e expressão de proteínas de reparo, incluindo AAG, MGMT e Rad51 (WEATHERBEE; KRAUS; ROSS, 2016; XIPELL et al., 2016b; YAMAMORI et al., 2013). Além disso, a indução de estresse do RE combinada ao agente alquilante TMZ, foi capaz de elevar a morte celular em células de GBM quando comparada a TMZ sozinha (WEATHERBEE; KRAUS; ROSS, 2016; XIPELL et al., 2016b; YAMAMORI et al., 2013). Finalmente, demonstrou-se que o ramo PERK do UPR contribui para a regulação do reparo de DNA, através de NRF2, promovendo o reparo de quebras duplas e a radioproteção em células de câncer de mama, de carcinoma de esôfago, além de células epiteliais do cólon (BOBROVNIKOVA-MARJON et al., 2010; KIM et al., 2012; NAGELKERKE et al., 2013). Estes resultados implicam o estresse de RE na modulação do reparo de DNA e sugerem que as duas vias podem cooperar para determinar o desfecho celular ao estresse. No entanto, a caracterização desta relação permanece

em aberto e até o momento não haviam evidências de que uma enzima de reparo de DNA atuasse diretamente na modulação das respostas ao estresse de RE.

Grandes esforços são realizados para entender como diferentes processos celulares contribuem para o câncer, no entanto, uma tarefa ainda mais árdua é a tradução destes conhecimentos em aplicações clínicas. Células tumorais sobrevivem sob a pressão de ambientes extremamente hostis e/ou quimioterapia. Neste contexto, é plausível imaginarmos que a estratégia adequada para eliminação do tumor afete as células tumorais em diferentes níveis, envolvendo uma combinação de terapias (WANG; KAUFMAN, 2014a).

A modulação do UPR em conjunto com agentes que danifiquem o DNA e/ou modulem vias de reparo surge como uma das vias estratégicas para conter a adaptação tumoral, sendo importante ressaltar que tais combinações também podem resultar em toxicidade. Entender melhor como estas vias interagem, bem como a compreensão dos pontos específicos para modulação destas vias pode fornecer novas perspectivas na patogênese do câncer e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e efetivas.

Embora algumas das nossas questões continuem não respondidas, nossos resultados demonstram um novo papel para a AAG na ativação do UPR (Figura 12). Essa nova função, acrescenta conhecimento nas respostas celulares a agentes alquilantes, uma classe de agentes amplamente utilizada na quimioterapia. A descrição mecanística detalhada desta nova intercomunicação (*crosstalk*) de respostas de estresse pode levar a um melhor entendimento de como a AAG afeta a resposta de estresse ao RE bem como dos desfechos celulares frente ao tratamento alquilante. Desta forma, moldando futuros avanços na prevenção e tratamento do câncer e outras doenças relacionadas ao envelhecimento.

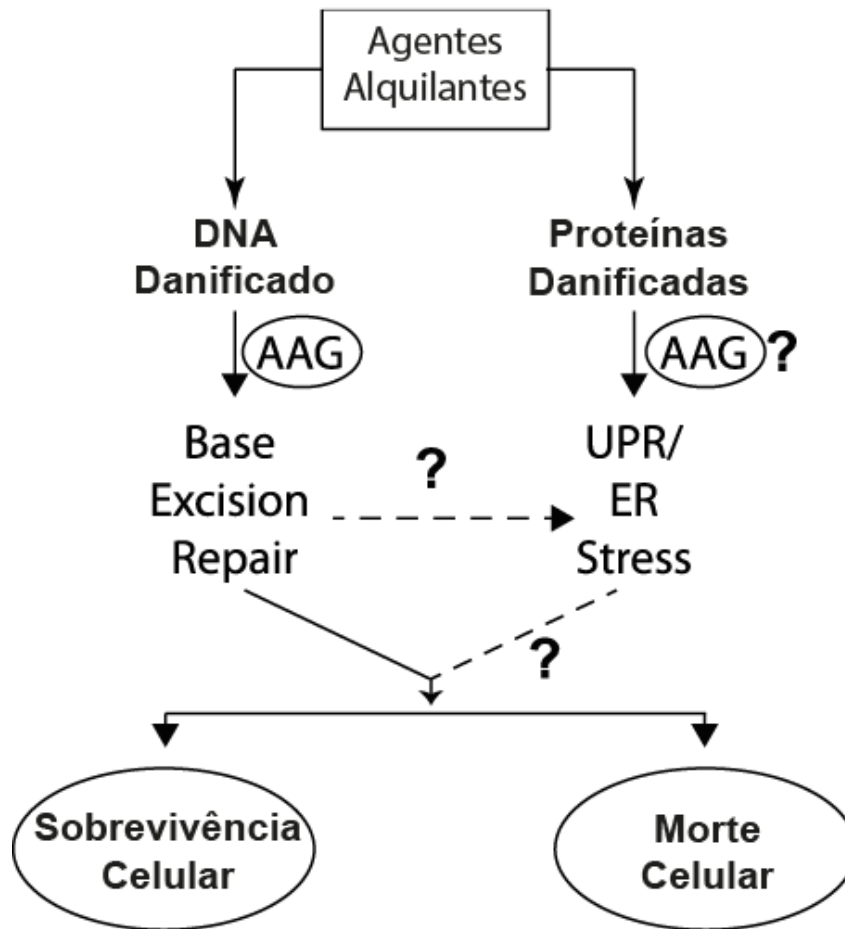


Figura 12. Modelo representativo da participação de AAG na ativação do UPR em resposta ao estresse no RE. Agentes alquilantes podem danificar tanto o DNA quanto proteínas. O provável papel da AAG na ativação da resposta ao estresse no RE poderia ocorrer pela iniciação do BER pela AAG, que levaria ao estresse no RE. Por outro lado, a ativação da resposta ao estresse no RE mediada pela AAG poderia acontecer pelo envolvimento desta na remoção de proteínas danificadas. Quando excessivo esse estresse poderia desencadear morte celular, na presença de um estresse mediano/fraco este levaria a uma resposta adaptativa e a sobrevivência celular.

8. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho podemos concluir que AAG é necessária para a ativação do UPR em resposta ao estresse de RE. Além disso, esta enzima demonstrou ser um importante determinador da sobrevivência em células de GBM. Em conjunto, os dados *in vitro* apresentados aqui sugerem que níveis de AAG podem potencialmente modular a resposta ao regime de quimioterapia. Ainda, a modulação do UPR em associação a agentes alquilantes pode ser proposta como uma possível estratégia terapêutica.

8.1. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- ❖ O tratamento alquilante com MMS induz uma complexa resposta transcricional;
- ❖ MMS é capaz de induzir a resposta de estresse ao RE em camundongos e em células de GBM;
- ❖ A redução dos níveis de AAG aumenta a sensibilidade frente ao tratamento alquilante nas linhagens celulares testadas;
- ❖ A resposta ao estresse de RE induzido por agentes alquilantes foi prejudicada em camundongos e células deficientes em AAG;
- ❖ O tratamento com TG é capaz de induzir o estresse de RE em GBM independentemente dos níveis de AAG;
- ❖ O envolvimento de AAG no UPR parece ocorrer de forma generalizada não depender de um ramo específico desta resposta;
- ❖ A sensibilidade conferida pelo tratamento com agentes indutores de estresse de RE combinados ou não com TMZ é dependente dos níveis de AAG;
- ❖ AAG é necessária para ativação do UPR no tratamento combinado de TMZ e SLN em células de GBM;
- ❖ A combinação de SLN e TMZ resulta em um fluxo autofágico anormal na presença de AAG;

- ❖ A expressão reduzida de AAG e um conjunto de transcritos do UPR está relacionada com um melhor prognóstico de pacientes de GBM que receberam tratamento alquilante.

9. PERSPECTIVAS

Este trabalho gerou várias questões quanto à natureza das contribuições da AAG para o UPR, portanto, para a compreensão completa do mecanismo deste processo até então inédito, experimentos adicionais são necessários.

- ❖ Complementar a linhagem shAAG com mutantes inativos cataliticamente, a fim de definir a participação do reparo de DNA nesta resposta;
- ❖ Avaliar o resgate do fenótipo após a complementação com AAG funcional e mutante;
- ❖ Examinar outros marcadores importantes do UPR como ATF6, IRE1 α e PERK, bem como a fosforilação destes;
- ❖ Analisar os marcadores de UPR em células deficientes em PARP-1 combinadas ou não à deficiência de AAG expostas aos agentes alquilantes;
- ❖ Medir os níveis de NRF2, GSH e a formação de ERO na presença de agentes alquilantes na presença e ausência de NAC (N-Acetil cisteína);
- ❖ Identificar modificações em proteínas pelo ensaio de DiBromobimano;
- ❖ Realizar experimentos de co-imunoprecipitação associados a espectrometria de massas para determinar possíveis alvos de interação;
- ❖ Avaliar a indução de danos no DNA nas células deficientes e proficientes em AAG após tratamento com TG, TN e SLN;
- ❖ Combinar o tratamento de TMZ com TG e avaliar a viabilidade celular e a indução de estresse de RE;
- ❖ Utilizar agentes não alquilantes que danifiquem DNA para verificar a resposta do UPR dependente de AAG.

10. BIBLIOGRAFIA

ABBOTTS, R.; THOMPSON, N.; MADHUSUDAN, S. DNA repair in cancer: emerging targets for personalized therapy. **Cancer management and research**, [s. l.], v. 6, p. 77–92, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3933425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8 abr. 2014.

ACOSTA-ALVEAR, D. et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. **Molecular cell**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 53–66, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612490>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

AGNIHOTRI, S. et al. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 253–266, 2012. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/59334?key=6384e1a132d67084e922>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

ALMANZA, A. et al. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. **The FEBS Journal**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14608>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

ALPHANDÉRY, E. Glioblastoma Treatments: An Account of Recent Industrial Developments. **Frontiers in pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 879, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30271342>>. Acesso em: 11 out. 2018.

ANDERSEN, T. et al. Thapsigargin—From Thapsia L. to Mipsagargin. **Molecules**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 6113–6127, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/4/6113>>. Acesso em: 24 out. 2018.

ANDRUSKA, N. D. et al. Estrogen receptor α inhibitor activates the unfolded protein response, blocks protein synthesis, and induces tumor regression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 15, p. 4737–4742, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825714>>. Acesso em: 8 out. 2018.

ANNOVAZZI, L.; MELLAI, M.; SCHIFFER, D. Chemotherapeutic Drugs: DNA Damage and Repair in Glioblastoma. **Cancers**, [s. l.], v. 9, n. 6, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587121>>. Acesso em: 11 out. 2018.

ASLANIAN, A.; YATES, J. R.; HUNTER, T. Mass spectrometry-based quantification of the cellular response to methyl methanesulfonate treatment in human cells. **DNA Repair**, [s. l.], v. 15, p. 29–38, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461736>>. Acesso em: 13 out. 2018.

AUF, G. et al. Inositol-requiring enzyme 1 α is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 35, p. 15553–8, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702765>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

AVRIL, T.; VAULÉON, E.; CHEVET, E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. **Oncogenesis**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. e373, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846078>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

BARBIN, A. et al. Increased formation and persistence of 1,N(6)-ethenoadenine in DNA is not associated with higher susceptibility to carcinogenesis in alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice treated with vinyl carbamate. **Cancer research**, [s. l.], v. 63,

n. 22, p. 7699–703, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633693>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

BAUER, N. C.; CORBETT, A. H.; DOETSCH, P. W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 43, n. 21, p. 10083–101, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26519467>>. Acesso em: 9 out. 2018.

BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation research**, [s. l.], v. 231, n. 1, p. 11–30, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2195323>>. Acesso em: 24 out. 2018.

BERTOLOTTI, A. et al. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 326–332, 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncb0600_326>. Acesso em: 17 jan. 2018.

BINET, F.; SAPIEHA, P. ER Stress and Angiogenesis. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 560–575, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413115003393?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 out. 2018.

BISWAS, T. et al. Binding of Specific DNA Base-pair Mismatches by N-Methylpurine-DNA Glycosylase and Its Implication in Initial Damage Recognition. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 320, n. 3, p. 503–513, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096906>>. Acesso em: 10 out. 2018.

BOBOLA, M. S. et al. Human Glioma Cell Sensitivity to the Sequence-Specific Alkylating Agent Methyl-Lexitropsin. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 612–620, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255284>>. Acesso em: 3 set. 2018.

BOBOLA, M. S. et al. Minimally Cytotoxic Doses of Temozolomide Produce Radiosensitization in Human Glioblastoma Cells Regardless of MGMT Expression. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1208–1218, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20457618>>. Acesso em: 3 set. 2018.

BOBOLA, M. S. et al. Repair of 3-methyladenine and abasic sites by base excision repair mediates glioblastoma resistance to temozolomide. **Frontiers in oncology**, [s. l.], v. 2, p. 176, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23230562>>. Acesso em: 3 set. 2018.

BOBROVNIKOVA-MARJON, E. et al. PERK promotes cancer cell proliferation and tumor growth by limiting oxidative DNA damage. **Oncogene**, [s. l.], v. 29, n. 27, p. 3881–3895, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2010.153>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

BOFFA, L. C.; BOLOGNESI, C.; MARIANI, M. R. Specific targets of alkylating agents in nuclear proteins of cultured hepatocytes. **Mutation research**, [s. l.], v. 190, n. 2, p. 119–23, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3821770>>. Acesso em: 13 out. 2018.

BORDIN, D. L. et al. DNA alkylation damage and autophagy induction. **Mutation research**, [s. l.], v. 753, n. 2, p. 91–9, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872363>>. Acesso em: 4 fev. 2014.

BRANDES, A. A. et al. Nitrosoureas in the Management of Malignant Gliomas. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 13, 2016. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s11910-015-0611-8>>. Acesso em: 11 out. 2018.

BRENERMAN, B. M. et al. Base excision repair capacity in informing healthspan. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 35, n. 12, p. 2643–52, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355293>>. Acesso em: 9 out. 2018.

BREWER, J. W.; DIEHL, J. A. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 97, n. 23, p. 12625–30, 2000. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.220247197>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

BURNS, N.; GOLD, B. The Effect of 3-Methyladenine DNA Glycosylase-Mediated DNA Repair on the Induction of Toxicity and Diabetes by the β -Cell Toxicant Streptozotocin. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 391–400, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098815>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

BUSH, N. A. O.; CHANG, S. M.; BERGER, M. S. Current and future strategies for treatment of glioma. **Neurosurgical Review**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10143-016-0709-8>>. Acesso em: 11 out. 2018.

CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 619–631, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18626472>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

CALVO, J. A. et al. DNA repair is indispensable for survival after acute inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 122, n. 7, p. 2680–2689, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684101>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

CALVO, J. A. et al. Aag DNA Glycosylase Promotes Alkylation-Induced Tissue Damage Mediated by Parp1. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e1003413, 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003413>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

CALVO, J. A. et al. Parp1 protects against Aag-dependent alkylation-induced nephrotoxicity in a sex-dependent manner. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 29, p. 44950–44965, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27391435>>. Acesso em: 8 out. 2018.

CAMPBELL, P. J.; MARTINOCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, [s. l.], v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 2015.

CASTILLO, K. et al. BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 α branch of the unfolded protein response. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 30, n. 21, p. 4465–78, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21926971>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

CATALGOL, B. et al. Chromatin repair after oxidative stress: Role of PARP-mediated proteasome activation. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 673–680, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20025963>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

CERDA, S. R. et al. Altered expression of the DNA repair protein, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in breast cancer. **FEBS letters**, [s. l.], v. 431, n. 1, p. 12–8, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684856>>. Acesso em: 2 set. 2018.

CHEN, X. et al. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. **Nature**, [s. l.], v. 508, n. 7494, p. 103–107, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670641>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

CHEN, Y.; BRANDIZZI, F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. **Trends in Cell**

Biology, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 547–555, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892413001013#fig0015>>. Acesso em: 2 out. 2018.

CHEVET, E.; HETZ, C.; SAMALI, A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis. **Cancer discovery**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 586–97, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977222>>. Acesso em: 14 fev. 2018.

COLLINS, F. S.; VARMUS, H. A New Initiative on Precision Medicine. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 372, n. 9, p. 793–795, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25635347>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

CONNOR, E. E.; WYATT, M. D. Active-site clashes prevent the human 3-methyladenine DNA glycosylase from improperly removing bases. **Chemistry & biology**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1033–41, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12323378>>. Acesso em: 10 out. 2018.

COQUERELLE, T.; DOSCH, J.; KAINA, B. Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair. **Mutation research**, [s. l.], v. 336, n. 1, p. 9–17, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528899>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

CORAZZARI, M. et al. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 7, p. 78, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2017.00078/full>>. Acesso em: 2 out. 2018.

CUBILLOS-RUIZ, J. R. et al. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. **Cell**, [s. l.], v. 161, n. 7, p. 1527–1538, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26073941>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

CUERVO, A. M. Autophagy and aging: keeping that old broom working. **Trends in genetics: TIG**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 604–12, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952508002795>>. Acesso em: 9 mar. 2014.

DADEY, D. Y. A. et al. The ATF6 pathway of the ER stress response contributes to enhanced viability in glioblastoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 2080–92, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26716508>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

DALTON, L. E. et al. The endoplasmic reticulum stress marker CHOP predicts survival in malignant mesothelioma. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 108, n. 6, p. 1340–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23412101>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

DE ROBLES, P. et al. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 776–83, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313193>>. Acesso em: 2 set. 2018.

DEJEANS, N. et al. Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1 -mediated cleavage of SPARC mRNA. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 125, n. 18, p. 4278–4287, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718352>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

DEWANGAN, J.; SRIVASTAVA, S.; RATH, S. K. Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 101042831769503, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317695035>>. Acesso em: 12 out. 2018.

DI CARLO, D. T. et al. Multiple high-grade gliomas: epidemiology, management, and outcome. A systematic review and meta-analysis. **Neurosurgical Review**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29138949>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

DI PAOLA, S. et al. PARP16/ARTD15 is a novel endoplasmic-reticulum-associated mono-ADP-ribosyltransferase that interacts with, and modifies karyopherin- β 1. **PLoS one**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e37352, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701565>>. Acesso em: 14 out. 2018.

DIANOV, G. L.; HÜBSCHER, U. Mammalian base excision repair: The forgotten archangel. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 3483–3490, 2013.

DIDERICH, K.; ALANAZI, M.; HOEIJMAKERS, J. H. J. Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. **DNA repair**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 772–80, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680258>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

DIGALEH, H.; KIAEI, M.; KHODAGHOLI, F. Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: Implication for proteasomal degradation and autophagy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 70, n. 24, p. 4681–4694, 2013.

DIOUFA, N. et al. p53 antagonizes the unfolded protein response and inhibits ground glass hepatocyte development during endoplasmic reticulum stress. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 237, n. 10, p. 1173–1180, 2012. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/ebm.2012.012140>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

DIXON, M. et al. Naturally occurring polyphenol, morin hydrate, inhibits enzymatic activity of N-methylpurine DNA glycosylase, a DNA repair enzyme with various roles in human disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 1102–11, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650313>>. Acesso em: 25 fev. 2018.

DIZDAROGLU, M.; COSKUN, E.; JARUGA, P. Repair of oxidatively induced DNA damage by DNA glycosylases: Mechanisms of action, substrate specificities and excision kinetics. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s. l.], v. 771, p. 99–127, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574216301363?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

DOAN, N. T. Q. et al. Targeting thapsigargin towards tumors. **Steroids**, [s. l.], v. 97, p. 2–7, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25065587>>. Acesso em: 24 out. 2018.

DODSON, M. L.; LLOYD, R. S. Mechanistic comparisons among base excision repair glycosylases. **Free radical biology & medicine**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 678–82, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937293>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

DOGLIOTTI, E. et al. The mechanism of switching among multiple BER pathways. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, [s. l.], v. 68, p. 3–27, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554307>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

DRABLØS, F. et al. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1389–1407, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156878640400148X>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

DUFHEY, E.; URRÁ, H. ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 33, p. 40–47, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X15000280?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 fev. 2018.

EBRAHIMKHANI, M. R. et al. Aag-initiated base excision repair promotes ischemia reperfusion injury in liver, brain, and kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 45, p. E4878-86, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25349415>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

EDENBERG, E. R.; DOWNEY, M.; TOCZYSKI, D. Polymerase Stalling during Replication, Transcription and Translation. **Current Biology**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. R445–R452, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24845677>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

EIGNER, K. et al. The unfolded protein response impacts melanoma progression by enhancing FGF expression and can be antagonized by a chemical chaperone. **Scientific reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 17498, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29235576>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

EISEN, J. A.; HANAWALT, P. C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. **Mutation research**, [s. l.], v. 435, n. 3, p. 171–213, 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3158673&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

ELDER, R. H. et al. Alkylpurine-DNA-N-glycosylase knockout mice show increased susceptibility to induction of mutations by methyl methanesulfonate. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 5828–37, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742100>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ELLSGAARD, L.; HELENIUS, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 181–191, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612637>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

ENGELWARD, B. P. et al. Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 945–52, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631315>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ENGELWARD, B. P. et al. Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 94, n. 24, p. 13087–92, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371804>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

ERASIMUS, H. et al. DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s. l.], v. 769, p. 19–35, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574216300151#fig0005>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

FAITOVA, J. et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Cellular & molecular**

biology letters, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 488–505, 2006. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/cmbled.2006.11.issue-4/s11658-006-0040-4/s11658-006-0040-4.xml>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

FAROOQI, A. A. et al. Anticancer drugs for the modulation of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 5743–52, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26188905>>. Acesso em: 10 out. 2018.

FISHEL, M. L. et al. Imbalancing the DNA base excision repair pathway in the mitochondria; targeting and overexpressing N-methylpurine DNA glycosylase in mitochondria leads to enhanced cell killing. **Cancer research**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 608–15, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12566303>>. Acesso em: 9 out. 2018.

FISHEL, M. L. et al. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 260–7, 2007. Disponível em: <<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1920>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

FOSMARK, S. et al. APNG as a prognostic marker in patients with glioblastoma. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. e0178693, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28662073>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

FRIEDBERG, E. C. et al. **DNA repair and mutagenesis**. [s.l.] : ASM Press, 2006. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=VAKsBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT41&ots=2uEqWSKYRj&sig=V1m49ZIUN_hTf2L3MnG7xmRJBQo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 24 ago. 2018.

FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature reviews. Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 104–20, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237395>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

GARCÍA DE LA CADENA, S.; MASSIEU, L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. **Apoptosis**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 763–777, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10495-016-1247-0>>. Acesso em: 10 out. 2018.

GOELLNER, E. M. et al. Overcoming temozolomide resistance in glioblastoma via dual inhibition of NAD⁺ biosynthesis and base excision repair. **Cancer research**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 2308–17, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21406402>>. Acesso em: 7 jan. 2018.

GOLDMAN, R.; SHIELDS, P. G. Food Mutagens. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 965S–973S, 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jn/article/133/3/965S/4688075>>. Acesso em: 8 out. 2018.

GUO, S. et al. PGK1 and GRP78 overexpression correlates with clinical significance and poor prognosis in Chinese endometrial cancer patients. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 680–690, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29416645>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

GUTENBERG, A. et al. MGMT promoter methylation status and prognosis of patients with primary or recurrent glioblastoma treated with carmustine wafers. **British Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 772–778, 2013. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02688697.2013.791664>>. Acesso em: 11 out. 2018.

GUTIÉRREZ, T.; SIMMEN, T. Endoplasmic reticulum chaperones tweak the mitochondrial calcium rheostat to control metabolism and cell death. **Cell Calcium**, [s. l.], v. 70, p. 64–75, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416017300799?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 out. 2018.

HAM, A.-J. L. et al. New immunoaffinity-LC-MS/MS methodology reveals that Aag null mice are deficient in their ability to clear 1,N6-etheno-deoxyadenosine DNA lesions from lung and liver in vivo. **DNA repair**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 257–65, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786403002490>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

HAMED, H. A. et al. OSU-03012 enhances Ad.7-induced GBM cell killing via ER stress and autophagy and by decreasing expression of mitochondrial protective proteins. **Cancer Biology & Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 526–536, 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/cbt.9.7.11116>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

HAN, D. et al. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. **Cell**, [s. l.], v. 138, n. 3, p. 562–75, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665977>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

HARDING, H. P. et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. **Molecular cell**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 897–904, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882126>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

HARDING, H. P. et al. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 11, p. 619–633, 2003. Disponível em: <[http://www.cell.com/molecular-cell/pdf/S1097-2765\(03\)00105-9.pdf](http://www.cell.com/molecular-cell/pdf/S1097-2765(03)00105-9.pdf)>. Acesso em: 19 dez. 2017.

HARRISON, J. F. et al. Altering DNA base excision repair: Use of nuclear and mitochondrial-targeted N-methylpurine DNA glycosylase to sensitize astroglia to chemotherapeutic agents. **Glia**, [s. l.], v. 55, n. 14, p. 1416–1425, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17674369>>. Acesso em: 10 out. 2018.

HE, L. et al. ATM blocks tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 583, n. 5, p. 903–908, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.02.002>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

HE, M. et al. Prognostic significance of the aggregative perivascular growth pattern of tumor cells in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 727–34, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482670>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

HEALY, S. J. M. et al. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 625, n. 1–3, p. 234–246, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299909008760?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

HEDGLIN, M.; O'BRIEN, P. J. Human Alkyladenine DNA Glycosylase Employs a Processive Search for DNA Damage †. **Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 44, p. 11434–11445, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18839966>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

HEDGLIN, M.; O'BRIEN, P. J. Hopping Enables a DNA Repair Glycosylase To Search Both Strands and Bypass a Bound Protein. **ACS Chemical Biology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 427–436, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201599>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

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

HENRY, K. A. et al. The Unfolded Protein Response Is Not Necessary for the G1/S Transition, but It Is Required for Chromosome Maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. e12732, 2010. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0012732>>. Acesso em: 10 out. 2018.

HETZ, C. **The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond**, 2012.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. **Molecular cell**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 169–181, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29107536>>. Acesso em: 30 abr. 2018.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 361, n. 15, p. 1475–85, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812404>>. Acesso em: 24 jan. 2014.

HOLLIEN, J.; WEISSMAN, J. S. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. **Science**, [s. l.], v. 313, n. 5783, p. 104–107, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16825573>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

HOLLIS, T.; LAU, A.; ELLENBERGER, T. Structural studies of human alkyladenine glycosylase and *E. coli* 3-methyladenine glycosylase. **Mutation research**, [s. l.], v. 460, n. 3–4, p. 201–10, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946229>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

HOMBACH-KLONISCH, S. et al. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016372581730267X?via%253Dihub>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

HOU, X. et al. PERK silence inhibits glioma cell growth under low glucose stress by blockage of p-AKT and subsequent HK2's mitochondria translocation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 9065, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep09065>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

HOUTKOOPER, R. H. et al. The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 194–223, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007326>>. Acesso em: 15 out. 2018.

HSU, H.-T. et al. Decreased cytoplasmic X-box binding protein-1 expression is associated with poor prognosis and overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinica Chimica Acta**, [s. l.], v. 479, p. 66–71, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898118300019?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

HURLEY, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 188–200, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc749>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

IYER, P. et al. Synthesis and characterization of DNA minor groove binding alkylating agents. **Chemical research in toxicology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 156–68, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23234400>>. Acesso em: 2 set. 2018.

JABOUILLE, A. et al. Glioblastoma invasion and cooption depend on IRE1 and XBP1 endoribonuclease activity. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 28, p. 24922–24934, 2015. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/4679>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. **Chromosoma**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 1–20, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048164>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

JARAMILLO, M.; ZHANG, D. The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes & development**, [s. l.], v. 27, p. 2179–2191, 2013. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/27/20/2179.short>>

JAUHAINEN, A. et al. Distinct cytoplasmic and nuclear functions of the stress induced protein DDIT3/CHOP/GADD153. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. e33208, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496745>>. Acesso em: 10 out. 2018.

JELINSKY, S. A. et al. Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 20, n. 21, p. 8157–67, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11027285>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

JELINSKY, S. A.; SAMSON, L. D. Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 4, p. 1486–91, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9990050>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296855>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

JUBIN, T. et al. The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival. [s. l.], 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/cpr.12268>>. Acesso em: 10 out. 2018.

JWA, M.; CHANG, P. PARP16 is a tail-anchored endoplasmic reticulum protein required for the PERK- and IRE1 α -mediated unfolded protein response. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1223–1230, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103912>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

KAINA, B. et al. BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. **Progress in nucleic acid research and molecular biology**, [s. l.], v. 68, p. 41–54, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11554312>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

KARDOSH, A. et al. Aggravated Endoplasmic Reticulum Stress as a Basis for Enhanced Glioblastoma Cell Killing by Bortezomib in Combination with Celecoxib or Its Non-Coxib Analogue, 2,5-Dimethyl-Celecoxib. **Cancer Research**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 843–851, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245486>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical Reviews in Toxicology**, [s. l.], v. 45, n. 9, p. 765–798, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10408444.2015.1074159>>. Acesso em: 23

ago. 2018.

KHARABI MASOULEH, B. et al. Mechanistic rationale for targeting the unfolded protein response in pre-B acute lymphoblastic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 111, n. 21, p. E2219-28, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821775>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

KIM, N. K. et al. Expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in astrocytic tumors. **Anticancer research**, [s. l.], v. 23, n. 2B, p. 1417–23, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820404>>. Acesso em: 3 set. 2018.

KIM, S. B. et al. Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 43, p. E2949-55, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045680>>. Acesso em: 24 fev. 2018.

KIM, Y.-J.; WILSON, D. M. Overview of base excision repair biochemistry. **Current molecular pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 3–13, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122461>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

KLAPACZ, J. et al. Frameshift Mutagenesis and Microsatellite Instability Induced by Human Alkyladenine DNA Glycosylase. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 37, p. 843–853, 2010.

KLAPACZ, J. et al. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. **Mutation research. Reviews in mutation research**, [s. l.], v. 767, p. 77–91, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27036068>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

KOKAME, K.; KATO, H.; MIYATA, T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 12, p. 9199–205, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11112790>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

KOUROKU, Y. et al. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 230–239, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4401984>>. Acesso em: 10 out. 2018.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. **Molecular cell**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 280–93, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127250&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

KROKAN, H. E.; BJØRÅS, M. Base excision repair. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. a012583, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23545420>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

KROKAN, H. E.; KAVLI, B.; SLUPPHAUG, G. Novel aspects of macromolecular repair and relationship to human disease. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, [s. l.], v. 82, n. 5, p. 280–97, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985856>>. Acesso em: 23 fev. 2014.

KUHNHENN, J. et al. Procarbazine, carmustine, and vincristine (PBV) for chemotherapy pre-treated patients with recurrent glioblastoma: a single-institution analysis. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 433–438, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-012-0913-5>>. Acesso em: 11 out. 2018.

LARSEN, E. et al. Organ and cell specificity of base excision repair mutants in mice. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 614, n. 1–2, p. 56–68, 2007.

LAU, A. Y. et al. Crystal structure of a human alkylbase-DNA repair enzyme complexed to DNA: mechanisms for nucleotide flipping and base excision. **Cell**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 249–58, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9790531>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

LE MERCIER, M. et al. A Simplified Approach for the Molecular Classification of Glioblastomas. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. e45475, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0045475>>. Acesso em: 11 out. 2018.

LEE, C.-Y. I. et al. Recognition and processing of a new repertoire of DNA substrates by human 3-methyladenine DNA glycosylase (AAG). **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 9, p. 1850–61, 2009. a. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi8018898>>. Acesso em: 8 out. 2018.

LEE, E. et al. Comparison of glioblastoma (GBM) molecular classification methods. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], 2018. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X18300415?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 out. 2018.

LEE, J. H. et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. **Nature**, [s. l.], v. 560, n. 7717, p. 243–247, 2018. b. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41586-018-0389-3>>. Acesso em: 10 out. 2018.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 198–210, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352304216300162>>. Acesso em: 11 out. 2018.

LEE, Y. et al. The genesis of cerebellar interneurons and the prevention of neural DNA damage require XRCC1. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 973–80, 2009. b.

LEQUISAMO, N. M. et al. Base excision repair imbalance in colorectal cancer has prognostic value and modulates response to chemotherapy. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 33, p. 54199–54214, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28903334>>. Acesso em: 9 out. 2018.

LEI, Y. et al. CHOP favors endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of autophagy. [s. l.], 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183680>>. Acesso em: 15 out. 2018.

LEITNER-DAGAN, Y. et al. N-Methylpurine DNA Glycosylase and OGG1 DNA Repair Activities: Opposite Associations With Lung Cancer Risk. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 104, n. 22, p. 1765–1769, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104324>>. Acesso em: 2 set. 2018.

LI, T. et al. Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. **Autophagy**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1057–1068, 2013.

LIANG, C. et al. Identification of UHRF1/2 as new N-methylpurine DNA glycosylase-interacting proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 433, n. 4, p. 415–419, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X1300483X?via%3Dihub>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

LIEBERMAN, F. Glioblastoma update: molecular biology, diagnosis, treatment,

response assessment, and translational clinical trials. **F1000Research**, [s. l.], v. 6, p. 1892, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29263783>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

LIKHITE, V. S. et al. Interaction of estrogen receptor alpha with 3-methyladenine DNA glycosylase modulates transcription and DNA repair. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 16, p. 16875–82, 2004.

LIN, Y.-H. et al. Multiple Gene Expression Classifiers from Different Array Platforms Predict Poor Prognosis of Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 498–507, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255271>>. Acesso em: 10 out. 2018.

LIU, C. et al. Aberrant expression of N-methylpurine-DNA glycosylase influences patient survival in malignant gliomas. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2012, p. 760679, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496614>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

LIU, Z.-M. et al. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 64, n. 11, p. 1428–1436, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-007-7107-x>>. Acesso em: 10 out. 2018.

LONGO, P. A. et al. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). In: **Methods in enzymology**. [s.l: s.n.]. v. 529p. 227–240.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00401-016-1545-1>>. Acesso em: 11 out. 2018.

LUO, B.; LEE, A. S. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. **Oncogene**, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 805–18, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22508478>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

MA, X. et al. Serum GRP78 as a Tumor Marker and Its Prognostic Significance in Non-Small Cell Lung Cancers: A Retrospective Study. **Disease markers**, [s. l.], v. 2015, p. 814670, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26265795>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. Herp Is Dually Regulated by Both the Endoplasmic Reticulum Stress-specific Branch of the Unfolded Protein Response and a Branch That Is Shared with Other Cellular Stress Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 14, p. 13792–13799, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14742429>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

MAIORINO, M. et al. Understanding mammalian glutathione peroxidase 7 in the light of its homologs. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 83, p. 352–360, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584915000830?via%3Dihub#bib31>>. Acesso em: 14 out. 2018.

MALAQUIN, N. et al. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. **Frontiers in genetics**, [s. l.], v. 6, p. 94, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25815006>>. Acesso em: 9 out. 2018.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? **Antioxidants & Redox Signaling**,

[s. l.], v. 9, n. 12, p. 2277–2294, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979528>>. Acesso em: 7 ago. 2018.

MAOR-SHOSHANI, A. et al. 3-Methyladenine DNA glycosylase is important for cellular resistance to psoralen interstrand cross-links. **DNA repair**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 1399–406, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786408001821>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

MARTEIJN, J. A.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; VERMEULEN, W. Check, Check ...Triple Check: Multi-Step DNA Lesion Identification by Nucleotide Excision Repair. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 885–886, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515007030>>. Acesso em: 9 out. 2018.

MARTIN, S. et al. Inducing apoptosis of cancer cells using small-molecule plant compounds that bind to GRP78. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 433–443, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23807168>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

MAUREL, M. et al. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. **Trends in biochemical sciences**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 245–54, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000414000334>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

MAYNARD, S. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 2–10, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18978338>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

MAZUMDER, A. et al. Genome-wide single-cell-level screen for protein abundance and localization changes in response to DNA damage in *S. cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. 20, p. 9310–9324, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt715>>. Acesso em: 13 out. 2018.

MCCAFFREY, K.; BRAAKMAN, I. Protein quality control at the endoplasmic reticulum. **Essays in biochemistry**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 227–235, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744338>>. Acesso em: 10 out. 2018.

MCCULLOUGH, K. D. et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 1249–59, 2001. Disponível em: <<http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.21.4.1249-1259.2001>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

MEHMETI, I. et al. ER-resident antioxidative GPx7 and GPx8 enzyme isoforms protect insulin-secreting INS-1E β -cells against lipotoxicity by improving the ER antioxidative capacity. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 112, p. 121–130, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584917307049?via%3Dihub#bib36>>. Acesso em: 14 out. 2018.

MEIRA, L. B. et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 118, n. 7, p. 2516–25, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18521188>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

MEIRA, L. B. et al. Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 888–93, 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19139400>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

MEIRA, L. B. et al. Repair of endogenous DNA base lesions modulate lifespan in mice. **DNA repair**, [s. l.], v. 21, p. 78–86, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24994062>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

MEIRA, L. B.; BURGIS, N. E.; SAMSON, L. D. Base excision repair. **Advances in experimental medicine and biology**, [s. l.], v. 570, p. 125–73, 2005.

MENONI, H. et al. Chromatin associated mechanisms in base excision repair - nucleosome remodeling and DNA transcription, two key players. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 107, p. 159–169, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584916311261?via%3Dihub#bib13>>. Acesso em: 23 ago. 2018.

MIAO, F. et al. 3-Methyladenine-DNA glycosylase (MPG protein) interacts with human RAD23 proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, p. 28433–28438, 2000.

MIRIAM SALVADOR, J. A. P. H. **Radicais Livres E a Resposta Celular Ao Estresse Oxidativo**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=7-GGjE62SAwC&pg=PA141&lpg=PA141&dq=glicos+de+timina&source=bl&ots=OLg5NuN83N&sig=LAVqOZ_88oBhVrvr0h1I3S_C88E&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwj8mPawzYPdAhUMI5AKHTuBCz0Q6AEwAHoECAAQAQ#v=onepage&q=glicos+de+timina&f=false>. Acesso em: 23 ago. 2018.

MITCHELL, J. R.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; NIEDERNHOFER, L. J. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. **Current opinion in cell biology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 232–40, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648680>>. Acesso em: 22 fev. 2014.

MUJICIC, H. et al. Hypoxic Activation of the PERK/eIF2 Arm of the Unfolded Protein Response Promotes Metastasis through Induction of LAMP3. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 19, n. 22, p. 6126–6137, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24045183>>. Acesso em: 10 out. 2018.

NAGEL, Z. D.; CHAIM, I. A.; SAMSON, L. D. Inter-individual variation in DNA repair capacity: A need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research. **DNA Repair**, [s. l.], v. 19, p. 199–213, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24780560>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

NAGELKERKE, A. et al. The PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response affects radioresistance by interfering with the DNA damage response. **Radiotherapy and Oncology**, [s. l.], v. 108, n. 3, p. 415–421, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891100>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

NAGY, K. et al. Susceptibility of lung epithelial cells to alkylating genotoxic insult. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [s. l.], v. 54, n. 8, p. 682–689, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/em.21800>>. Acesso em: 8 out. 2018.

NARITA, T. et al. Lower expression of activating transcription factors 3 and 4 correlates with shorter progression-free survival in multiple myeloma patients receiving bortezomib plus dexamethasone therapy. **Blood cancer journal**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. e373, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636288>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

NGUYỄN, D. T. et al. Nck-dependent Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase-1 and Regulation of Cell Survival during Endoplasmic Reticulum Stress. **Molecular Biology of the Cell**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 4248–4260, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15201339>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

NGUYEN, V. D. et al. Two Endoplasmic Reticulum PDI Peroxidases Increase the Efficiency of the Use of Peroxide during Disulfide Bond Formation. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 406, n. 3, p. 503–515, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283610013823#bb0090>>. Acesso em: 14 out. 2018.

NICKOLOFF, J. A. et al. Drugging the Cancers Addicted to DNA Repair. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 109, n. 11, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28521333>>. Acesso em: 10 out. 2018.

NIEDERNHOFER, L. J. et al. Nuclear Genomic Instability and Aging. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 295–322, 2018. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biochem-062917-012239>>

OBACZ, J. et al. Endoplasmic reticulum proteostasis in glioblastoma-From molecular mechanisms to therapeutic perspectives. **Science signaling**, [s. l.], v. 10, n. 470, p. eaal2323, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28292956>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

OIKAWA, D. et al. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 38, n. 18, p. 6265–73, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20507909>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

OJHA, R.; AMARAVADI, R. K. Targeting the unfolded protein response in cancer. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 120, p. 258–266, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104366181631413X?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 out. 2018.

OKU, M.; SAKAI, Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. **BioEssays**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1800008, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201800008>>. Acesso em: 10 out. 2018.

OLIVARI, S.; MOLINARI, M. Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 581, n. 19, p. 3658–3664, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499246>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

ONORATI, A. V. et al. Targeting autophagy in cancer. **Cancer**, [s. l.], v. 124, n. 16, p. 3307–3318, 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.31335>>. Acesso em: 10 out. 2018.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009–2013. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 18, n. suppl_5, p. v1–v75, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475809>>. Acesso em: 10 out. 2018.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 381–389, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14685163>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

PAIK, J. et al. Sensitization of Human Carcinoma Cells to Alkylating Agents by Small Interfering RNA Suppression of 3-Alkyladenine-DNA Glycosylase. **Cancer Research**, [s. l.], v. 65, n. 22, p. 10472–10477, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288039>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

PAOLILLO, M.; BOSELLI, C.; SCHINELLI, S. Glioblastoma under Siege: An Overview of Current Therapeutic Strategies. **Brain sciences**, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29337870>>. Acesso em: 11 out. 2018.

PAPA, L.; GERMAIN, D. Estrogen receptor mediates a distinct mitochondrial unfolded protein response. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 124, n. 9, p. 1396–1402, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486948>>. Acesso em: 15 out. 2018.

PARSONS, J. L.; DIANOV, G. L. Co-ordination of base excision repair and genome stability. **DNA Repair**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 326–333, 2013.

PEÑARANDA FAJARDO, N. M.; MEIJER, C.; KRUYT, F. A. E. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. **Biochemical pharmacology**, [s. l.], v. 118, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295216300478>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

PEREIRA, M. B. et al. Transcriptional characterization of immunological infiltrates and their relation with glioblastoma patients overall survival. **Oncolmmunology**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 1–10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1431083>>

PERIYASAMY, P.; SHINOHARA, T. Age-related cataracts: Role of unfolded protein response, Ca²⁺ mobilization, epigenetic DNA modifications, and loss of Nrf2/Keap1 dependent cytoprotection. **Progress in retinal and eye research**, [s. l.], v. 60, p. 1–19, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28864287>>. Acesso em: 14 out. 2018.

PETERMANN, E.; KEIL, C.; OEI, S. L. Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. **DNA repair**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 544–55, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568786405003551>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

PLUQUET, O. et al. Posttranscriptional regulation of PER1 underlies the oncogenic function of IRE α . **Cancer research**, [s. l.], v. 73, n. 15, p. 4732–43, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752693>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

POSTEL-VINAY, S. et al. The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 144–155, 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2012.3>>. Acesso em: 2 set. 2018.

PRABHU, A. et al. Targeting the Unfolded Protein Response in Glioblastoma Cells with the Fusion Protein EGF-SubA. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. e52265, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0052265>>. Acesso em: 21 fev. 2018.

PYRKO, P. et al. The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. **Cancer Res**, [s. l.], v. 67, n. 20, p. 9809–16, 2007. a.

PYRKO, P. et al. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. **Cancer research**, [s. l.], v. 67, n. 20, p. 9809–16, 2007. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942911>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

RAJAPAKSA, G.; THOMAS, C.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen signaling and unfolded protein response in breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 163, p. 45–50, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27045680>>. Acesso em: 15 out. 2018.

RANGANATHAN, A. C. et al. Functional coupling of p38-induced up-regulation of BiP and activation of RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase to

drug resistance of dormant carcinoma cells. **Cancer research**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 1702–11, 2006. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-3092>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

RASHID, H.-O. et al. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. **Autophagy**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 1956–1977, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389781>>. Acesso em: 15 out. 2018.

REIFENBERGER, G. et al. Advances in the molecular genetics of gliomas — implications for classification and therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 434–452, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrclinonc.2016.204>>. Acesso em: 2 set. 2018.

REN, P. et al. High expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78) is associated with metastasis and poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **OncoTargets and therapy**, [s. l.], v. 10, p. 617–625, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28228658>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

RINNE, M.; CALDWELL, D.; KELLEY, M. R. Transient adenoviral N-methylpurine DNA glycosylase overexpression imparts chemotherapeutic sensitivity to human breast cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 955–67, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15299078>>. Acesso em: 9 out. 2018.

RINNE, M. L. et al. N-methylpurine DNA glycosylase overexpression increases alkylation sensitivity by rapidly removing non-toxic 7-methylguanine adducts. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 33, n. 9, p. 2859–67, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15905475>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

ROCHETTE, S. et al. Modulation of the yeast protein interactome in response to DNA damage. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 100, p. 25–36, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24262151>>. Acesso em: 13 out. 2018.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 519–529, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565364>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

ROSA, R. M. et al. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 631, n. 1, p. 44–54, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507284>>. Acesso em: 14 out. 2018.

ROSZKOWSKI, K. Oxidative DNA damage--the possible use of biomarkers as additional prognostic factors in oncology. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. l.], v. 19, p. 808–17, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389225>>. Acesso em: 9 out. 2018.

ROTH, R. B.; SAMSON, L. D. 3-Methyladenine DNA glycosylase-deficient Aag null mice display unexpected bone marrow alkylation resistance. **Cancer research**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 656–60, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830515>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

ROWE, L. A.; DEGTYAREVA, N.; DOETSCH, P. W. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 8, p. 1167–1177, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708137>>. Acesso em: 14 out. 2018.

SAKATANI, T. et al. High expression of IRE1 in lung adenocarcinoma is associated with a lower rate of recurrence. **Japanese journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 543–550, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28334878>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

SALMON, T. B. et al. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 3712–3723, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15254273>>. Acesso em: 14 out. 2018.

SCHEWE, D. M.; AGUIRRE-GHISO, J. A. ATF6 -Rheb-mTOR signaling promotes survival of dormant tumor cells in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 30, p. 10519–10524, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650380>>. Acesso em: 10 out. 2018.

SCHMIDT, F. et al. PCV chemotherapy for recurrent glioblastoma. **Neurology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 587–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15477552>>. Acesso em: 11 out. 2018.

SEDELNIKOVA, O. A. et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [s. l.], v. 704, n. 1–3, p. 152–159, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060490>>. Acesso em: 9 out. 2018.

SEDGWICK, B. et al. Repair of alkylated DNA: Recent advances. **DNA Repair**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 429–442, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17112791>>. Acesso em: 8 out. 2018.

SETSER, J. W. et al. Searching for DNA Lesions: Structural Evidence for Lower- and Higher-Affinity DNA Binding Conformations of Human Alkyladenine DNA Glycosylase. **Biochemistry**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 382–390, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22148158>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

SEYSTAHL, K. ; WICK, W. ;; WELLER, M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma- An update. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 99, p. 389–408, 2016. Disponível em: <www.zora.uzh.ch/year:2016URL:https://doi.org/10.5167/uzh>. Acesso em: 11 out. 2018.

SINGH, M. P.; CHAUHAN, A. K.; KANG, S. C. Morin hydrate ameliorates cisplatin-induced ER stress, inflammation and autophagy in HEK-293 cells and mice kidney via PARP-1 regulation. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 56, p. 156–167, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576918300316>>. Acesso em: 25 fev. 2018.

SINGLETON, D. C.; HARRIS, A. L. Targeting the ATF4 pathway in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1189–1202, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2012.728207>>

SLUPPHAUG, G. et al. A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil–DNA glycosylase bound to DNA. **Nature**, [s. l.], v. 384, n. 6604, p. 87–92, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900285>>. Acesso em: 30 ago. 2018.

SOBOL, R. W. et al. Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 99, n. 10, p. 6860–6865, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983862>>. Acesso em: 8 out. 2018.

SOBOL, R. W. et al. Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 41, p. 39951–9, 2003.

SOLL, J. M.; SOBOL, R. W.; MOSAMMAPARAST, N. Regulation of DNA Alkylation Damage Repair: Lessons and Therapeutic Opportunities. **Trends in biochemical sciences**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 206–218, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816326>>. Acesso em: 24 ago. 2018.

SONG, S. et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 232, n. 11, p. 2977–2984, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25785>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

SRIDHAR, S. et al. Autophagy and disease: always two sides to a problem. **The Journal of pathology**, [s. l.], v. 226, n. 2, p. 255–73, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990109>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis Signaling. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 217–245, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10966458>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

STRIK, H. M. et al. Temozolomide Dosing Regimens for Glioma Patients. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 286–293, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437507>>. Acesso em: 11 out. 2018.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 352, n. 10, p. 987–996, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758009>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269895>>. Acesso em: 3 set. 2018.

STUPP, R. et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma. **JAMA**, [s. l.], v. 314, n. 23, p. 2535, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26670971>>. Acesso em: 11 out. 2018.

SUH, D. H. et al. Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1271, n. 1, p. 20–32, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23050960>>. Acesso em: 10 out. 2018.

TAMEIRE, F.; VERGINADIS, I. I.; KOUMENIS, C. Cell intrinsic and extrinsic activators of the unfolded protein response in cancer: Mechanisms and targets for therapy. **Seminars in cancer biology**, [s. l.], v. 33, p. 3–15, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25920797>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

TAMIMI, A. F.; JUWEID, M. **Epidemiology and Outcome of Glioblastoma**. [s.l.] : Codon Publications, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29251870>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

TANG, J. et al. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase β modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to temozolomide. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 471–486, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/neuro-oncology/article->

lookup/doi/10.1093/neuonc/nor011>. Acesso em: 20 jan. 2018.

THEVENOT, P. T. et al. The stress-response sensor chop regulates the function and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in tumors. **Immunity**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 389–401, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25238096>>. Acesso em: 10 out. 2018.

THORNTON, M. et al. The unfolded protein response regulator GRP78 is a novel predictive biomarker in colorectal cancer. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 133, n. 6, p. 1408–1418, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28137>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

THORPE, J. A.; SCHWARZE, S. R. IRE1alpha controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1. **Cell stress & chaperones**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 497–508, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12192-009-0163-4>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

TOLEDO, C. M. et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. **Cell reports**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 2425–2439, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26673326>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. **Nature cell biology**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 831–5, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-831>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

ULLRICH, O. et al. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 96, n. 11, p. 6223–8, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10339569>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

URANO, F. et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 287, n. 5453, p. 664–6, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10650002>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

URRA, H. et al. When ER stress reaches a dead end. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1833, n. 12, p. 3507–3517, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016748891300311X?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 fev. 2018.

URRA, H. et al. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. **Trends in cancer**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 252–262, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741511>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

VACARU, A. M. et al. Molecularly defined unfolded protein response subclasses have distinct correlations with fatty liver disease in zebrafish. **Disease models & mechanisms**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 823–35, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973751>>. Acesso em: 12 out. 2018.

VAN LAAR, T. et al. The novel MMS-inducible gene *Mif1/KIAA0025* is a target of the unfolded protein response pathway. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 469, n. 1, p. 123–131, 2000. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%252800%252901253-9>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

VAN LOON, B.; SAMSON, L. D. Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) localizes to mitochondria and interacts with mitochondrial single-stranded binding protein (mtSSB).

DNA Repair, [s. l.], v. 12, p. 177–187, 2013.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 700–714, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20823910>>. Acesso em: 31 ago. 2018.

VELIZ, I. et al. Advances and challenges in the molecular biology and treatment of glioblastoma-is there any hope for the future? **Annals of translational medicine**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 7, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705639>>. Acesso em: 11 out. 2018.

VELLAI, T. et al. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? **Trends in cell biology**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 487–94, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2755611&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

VEMBAR, S. S.; BRODSKY, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 944–57, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002207>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

VESSONI, A T. et al. Autophagy and genomic integrity. **Cell death and differentiation**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 1444–54, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933813>>. Acesso em: 17 jan. 2014.

VIERI, M. et al. Deregulated expression of the HSP40 family members Auxilin-1 and -2 is indicative of proteostasis imbalance and predicts patient outcome in Ph(+) leukemia. **Experimental hematology & oncology**, [s. l.], v. 5, p. 5, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862466>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

VIHERVAARA, A.; DUARTE, F. M.; LIS, J. T. Molecular mechanisms driving transcriptional stress responses. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], p. 1, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41576-018-0001-6>>
<<http://dx.doi.org/10.1038/s41576-018-0001-6>>

WALLACE, S. S. Base excision repair: A critical player in many games. **DNA Repair**, [s. l.], v. 19, p. 14–26, 2014.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 334, n. 6059, p. 1081–6, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1209038>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

WANG, H. et al. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. **Molecular cell**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 817–28, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684017>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

WANG, L. et al. Glutathione Peroxidase 7 Utilizes Hydrogen Peroxide Generated by Ero1 α to Promote Oxidative Protein Folding. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 545–556, 2014. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2013.5236>>. Acesso em: 14 out. 2018.

WANG, M. et al. The unfolded protein response as a target for anticancer therapeutics. **Critical reviews in oncology/hematology**, [s. l.], v. 127, p. 66–79, 2018. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29891114>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 581–597, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3800>>

WANG, M.; KAUFMAN, R. J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. **Nature**, [s. l.], v. 529, n. 7586, p. 326–335, 2016.

WANG, Q. et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. **Cancer cell**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 42–56.e6, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28697342>>. Acesso em: 11 out. 2018.

WANG, X. et al. The unfolded protein response in ischemic heart disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [s. l.], v. 117, n. 2017, p. 19–25, 2018. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.02.013>>

WANG, Y. Bulky DNA Lesions Induced by Reactive Oxygen Species. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 276–281, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18189366>>. Acesso em: 9 out. 2018.

WEATHERBEE, J. L.; KRAUS, J.-L.; ROSS, A. H. ER stress in temozolomide-treated glioblastomas interferes with DNA repair and induces apoptosis. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 28, p. 43820–43834, 2016. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/9907>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

WELLER, M. et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma--are we there yet? **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 4–27, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23136223>>. Acesso em: 11 out. 2018.

WESTPHAL, M. et al. Gliadel® wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. **Acta Neurochirurgica**, [s. l.], v. 148, n. 3, p. 269–275, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482400>>. Acesso em: 11 out. 2018.

WHITAKER, A. M. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. l.], v. 22, p. 1493–1522, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28199214>>. Acesso em: 9 out. 2018.

WOLFE, A. E.; O'BRIEN, P. J. Kinetic Mechanism for the Flipping and Excision of 1, N^6 -Ethenoadenine by Human Alkyladenine DNA Glycosylase. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 48, p. 11357–11369, 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi9015082>>. Acesso em: 10 out. 2018.

WOLFORD, C. C. et al. Transcription factor ATF3 links host adaptive response to breast cancer metastasis. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 123, n. 7, p. 2893–906, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921126>>. Acesso em: 4 jul. 2018.

WURTMANN, E. J.; WOLIN, S. L. RNA under attack: cellular handling of RNA damage. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 34–49, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089684>>. Acesso em: 15 out. 2018.

XIA, F. et al. Glucose-regulated protein 78 and heparanase expression in oral squamous cell carcinoma: correlations and prognostic significance. **World journal of surgical oncology**, [s. l.], v. 12, p. 121, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766948>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

XIA, T. et al. XBP1 induces MMP-9 expression to promote proliferation and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma. **American journal of cancer research**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 2031–2040, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27725908>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

XIE, J.-J. et al. ATF3 functions as a novel tumor suppressor with prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 5, n. 18, p. 8569–82, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25149542>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

XIPELL, E. et al. Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 21, p. 30626–41, 2016. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27121320>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

XIPELL, E. et al. Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1109–19, 2016. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26951384>>. Acesso em: 22 ago. 2017.

XIWEI ZHENG, CONG BI, MARISSA BROOKS, And D. S. H. HHS Public Access. **Anal Chem.**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 368–379, 2015.

YACOUB, A. et al. PERK-dependent regulation of ceramide synthase 6 and thioredoxin play a key role in mda-7/IL-24-induced killing of primary human glioblastoma multiforme cells. **Cancer research**, [s. l.], v. 70, n. 3, p. 1120–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20103619>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

YAMAMORI, T. et al. ER stress suppresses DNA double-strand break repair and sensitizes tumor cells to ionizing radiation by stimulating proteasomal degradation of Rad51. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 587, n. 20, p. 3348–3353, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2013.08.030>>. Acesso em: 22 fev. 2018.

YAMAMOTO, K. et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. **Developmental cell**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 365–76, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17765680>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

YANG, C.-G.; GARCIA, K.; HE, C. Damage detection and base flipping in direct DNA alkylation repair. **Chembiochem : a European journal of chemical biology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 417–23, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19145606>>. Acesso em: 9 out. 2018.

YERUSHALMI, R. et al. Cell surface GRP78: A potential marker of good prognosis and response to chemotherapy in breast cancer. **Oncology letters**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 2149–2155, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26622810>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

YONEDA, T. et al. Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER Stress. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 17, p. 13935–13940, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278723>>. Acesso em: 17 ago. 2018.

YOSHIDA, H. et al. XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. **Cell**, [s. l.], v. 107, p. 881–891, 2001. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674\(01\)00611-0.pdf](http://www.cell.com/cell/pdf/S0092-8674(01)00611-0.pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2018.

YOSHIMOTO, K. et al. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 2, p. 186, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2012.00186/abstract>>. Acesso em: 11 out. 2018.

YU, S.-N. et al. Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 3321–3328, 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5615>>. Acesso em: 20 set. 2018.

YUE, W. et al. Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance. **Autophagy**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 714–29, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23519090>>. Acesso em: 11 maio. 2018.

ZAIŘ, Z. M. et al. Diagnostic correlation between the expression of the DNA repair enzyme *N*-methylpurine DNA glycosylase and esophageal adenocarcinoma onset: a retrospective pilot study. **Diseases of the Esophagus**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 644–650, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/dote/article-lookup/doi/10.1111/dote.12003>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Combined Gene Expression and RNAi Screening to Identify Alkylation Damage Survival Pathways from Fly to Human. **PloS one**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e0153970, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0153970&type=printable>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

ZANOTTO-FILHO, A. et al. Alkylating Agent-Induced NRF2 Blocks Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis via Control of Glutathione Pools and Protein Thiol Homeostasis. **Molecular cancer therapeutics**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 3000–3014, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638861>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

ZHANG, F. et al. Differential adduction of proteins vs. deoxynucleosides by methyl methanesulfonate and 1-methyl-1-nitrosourea in vitro. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 438–448, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655799>>. Acesso em: 13 out. 2018.

ZHANG, G. et al. Salinomycin overcomes radioresistance in nasopharyngeal carcinoma cells by inhibiting Nrf2 level and promoting ROS generation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 91, p. 147–154, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217305474?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 out. 2018.

ZHANG, J.; F.G. STEVENS, M.; D. BRADSHAW, T. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 102–114, 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1874-4672&volume=5&issue=1&spage=102>>

ZHENG, H.-C.; GONG, B.-C.; ZHAO, S. The meta and bioinformatics analysis of GRP78 expression in gastric cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 42, p. 73017–73028, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29069845>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

11. ANEXO I

Neste anexo são apresentadas figuras complementares que suportam os resultados discutidos ao longo desta tese. A metodologia também é descrita para aqueles experimentos que não foram introduzidos previamente no trabalho.

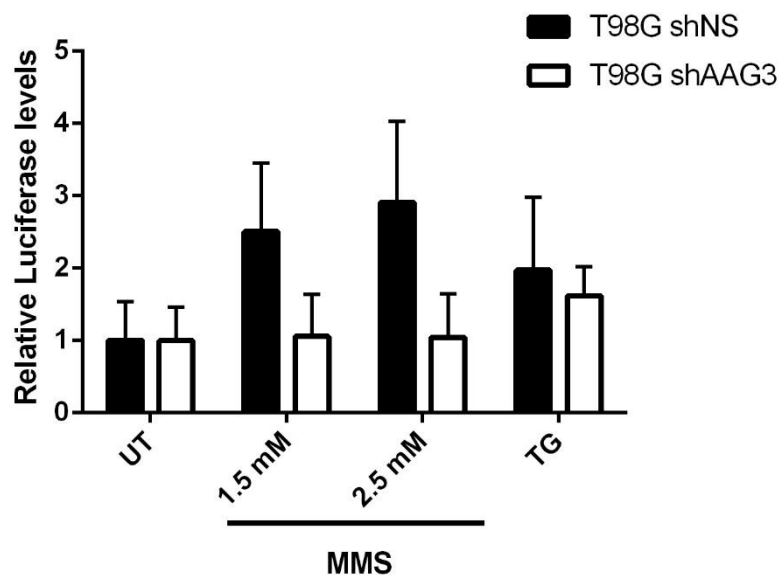


Figura 1. Indução de luciferase responsiva ao ERSE. Ao serem expostas ao MMS, células shNS aumentam a expressão de luciferase do ERSE para 2,5 e 2,9-fold nas doses de 1,5mM e 2,5mM, respectivamente, em relação ao controle não tratado, enquanto células shAAG não apresentam diferença em relação ao controle não tratado.

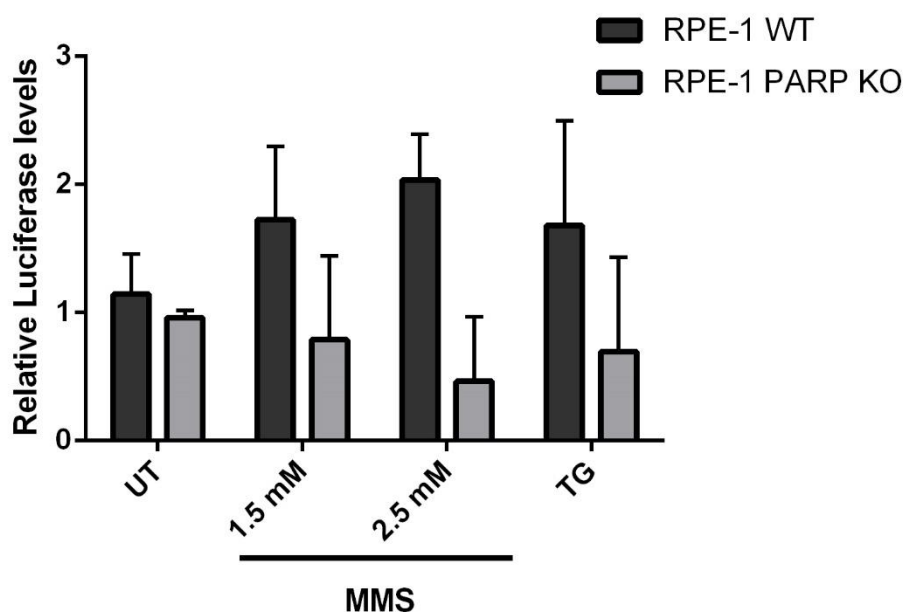


Figura 2. Indução de luciferase responsiva ao ERSE em células deficientes em PARP-1. Ao serem expostas ao MMS, células RPE-1 WT aumentam a expressão de luciferase do ERSE para 1,7 e 2-fold nas doses de 1,5mM e 2,5mM, respectivamente, em relação ao controle não tratado, enquanto células RPE-1 PARP-1 *knockout* (KO) não apresentam diferença em relação ao controle não tratado.

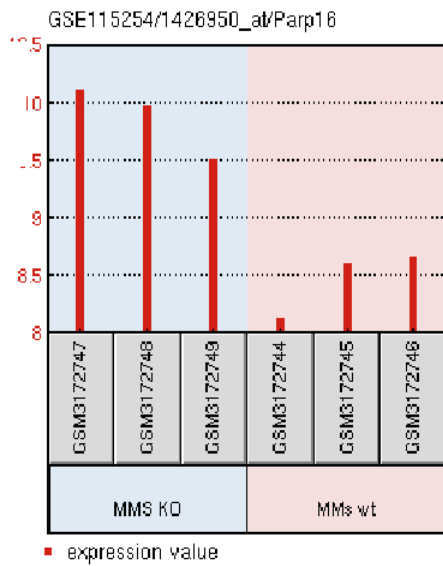
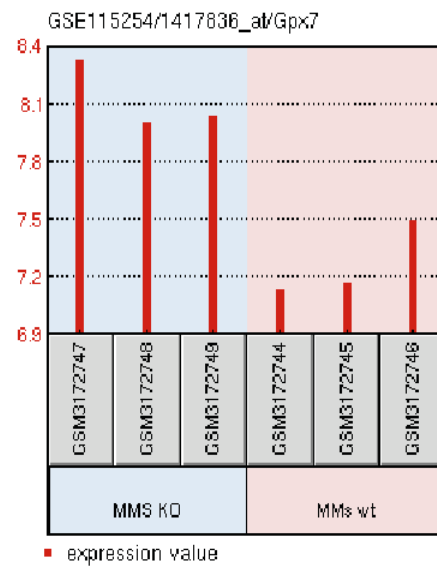
A.**B.**

Figura 3. Mudanças na expressão gênica após tratamento com MMS em animais Aag^{-/-}. Transcritos do fígado de animais proficientes e deficientes em Aag expostos ao MMS foram catalogados e quantificados. Expressão gênica foi avaliada em amostras extraídas após 6h do tratamento com MMS. Resultados são a representação da comparação entre os dois grupos tratados utilizando GEO2R. Animais Aag^{-/-}: GSM3172747, GSM3172748, GSM3172749; Animais WT: GSM3172744, GSM3172745, GSM3172746. Barras vermelhas representam valores de expressão de **A.** Parp-16 e **B.** Gpx7.

Metodologia das figuras 1 e 2 do ANEXO I, não descritas anteriormente na tese.

Ensaio de repórter de luciferase. Células foram transfectadas com dois plasmídeos repórteres expressando luciferase firefly (p5xATF6-Luc2P) ou Renilla (pRL-CMV). Neste caso, o gene da luciferase firefly estava sob o comando de um elemento ERSE-5 repeat (*ER stress responsive element*) que pode ser induzido por transdutores de sinal do estresse no RE como ATF6f e XBP1s. A indução de transcrição de luciferase firefly foi diretamente medida pelo aumento da luminescência e normalizada pela lucifera de Renilla constitutivamente expressa. Após 6h de tratamento com as doses indicadas de MMS as células foram lisadas com tampão de lise (Tris 20mM [pH7,6], glicerol 10%, Triton-X 100 0,5%) suplementado com coquetel inibidor de protease 1x (Thermo Fisher Scientific) e DTT 1mM (Sigma). As placas foram então incubadas em gelo por 30 min e

então 10 μ l foram transferidos para uma placa branca de 96 poços. Os níveis de luciferase foram medidos pelo kit *Dual-gluo Luciferase Assay System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

12. ANEXO II

CURRÍCULO LATTES



Larissa Milano de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2309157253920721>
Última atualização do currículo em 09/11/2018

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Mestre em Biologia Celular e Molecular pela mesma universidade (PPGBCM/UFRGS) Atualmente, é bolsista de Doutorado Cnpq pelo programa de pós-graduação em em Biologia Celular e Molecular / UFRGS, no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariontes, no Departamento de Biofísica da mesma universidade, sob orientação dos professores Guido Lenz e Joao Henriques, com co-orientação da professora Lisiane Meira na University of Surrey. Desenvolve atividades relacionadas à biologia celular e molecular de células humanas deficientes no Reparo por Excisão de Nucleotídeos e de Bases (NER e BER) e drogas antitumorais, bem como o envolvimento de proteínas destas vias em processos celulares como autogagia, senescencia e unfolded protein response (UPR). É colaboradora em projetos que envolvem suplementação de nutrientes em culturas celulares, avaliação danos de DNA em funcionários de serviços hospitalares, avaliação de toxicidade de aparelhos ortodonticos, entre outros. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Larissa Milano de Souza
Nome em citações bibliográficas	SOUZA, L. M.;Milano, L.;SOUZA, LARISSA M.;DE SOUZA, LARISSA M.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica. AC Campus da UFRGS - prédio 43422 sala 210 Agronomia 91501970 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (51) 33087602
------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Formação acadêmica/titulação

2014	Doutorado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 7). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. com período sanduíche em University of Surrey (Orientador: Lisiane Meira). Orientador: Guido Lenz e Joao Henriques. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: AAG; BER; ER stress; UPR.
2012 - 2014	Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 7). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Título: Avaliação da indução de autofagia e senescência em fibroblastos humanos deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos tratados com Doxorubicina, Ano de Obtenção: 2014. Orientador: Jenifer Saffi. Coorientador: Guido Lenz. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: NER; Autofagia; Senescência; Doxorubicina. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Biofísica Molecular.
2008 - 2011	Graduação em biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Título: Avaliação da Indução de Senescência e Apoptose pelo Tratamento com Antraciclinas em Fibroblastos Humanos Deficientes no Reparo por Excisão de Nucleotídeos. Orientador: Guido Lenz. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2006 interrompida	

Formação Complementar

2009	Extensão universitária em Curso presencial: Alemão. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2009 - 2009	Extensão universitária em Diversidade viral:Porque os vírus emergem e mutam. (Carga horária: 5h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil.
2009 - 2009	Reparo no DNA:mecanismos e formas de estudo. Mutagen - Brasil, MUTAGEN, Brasil.
2008 - 2008	Extensão universitária em Monitoria:Métodos Análise em Lab Análises Clínicas. (Carga horária: 67h). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
2008 - 2008	Extensão universitária em Genética na UFRGS:pesquisa ensino ao alcance todos. (Carga horária: 30h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2008 - 2008	Extensão universitária em Células-Tronco Mesenquimais Curso teórico prático. (Carga horária: 24h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2008 - 2008	Interpretações laboratoriais toxicologia clínica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2008 - 2008	Ferramentas de Bioinfo Desenvolvimento de vacinas. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2007 - 2007	Percepção de Risco em Laboratório Clínico. (Carga horária: 4h). Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
2007 - 2007	Cuidados no Manejo de Animais de Laboratório. (Carga horária: 13h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Atuação Profissional

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

Vínculo institucional

2008 - 2012 Vínculo: Bolsista IC, Enquadramento Funcional: Bolsista Iniciação Científica, Carga horária: 20

SIDI Diagnóstico por Imagem, SIDI, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - 2012 Vínculo: Estagiário/Biomédica, Enquadramento Funcional: Biomédica, Carga horária: 36
Outras informações Atuando em Tomografia Computadorizada, na reconstrução e processamento de imagens.

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Bolsista IC, Enquadramento Funcional: Bolsista Iniciação Científica, Carga horária: 20

Outras informações

Lab. de Neuroquímica & Neurofisiologia da Memória - Centro de Pesquisa da Memória
Instituto de Pesquisa do Cérebro

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ISCMPA, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagio Voluntário

Atividades

2008 - 2009 Estágios , Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, .
Estágio realizado
Observação e execução de atividades relacionadas aos exames de tipagem de HLA, prova cruzada pré-transplante, imunofenotipagens de leucemias e linfomas por citometria de fluxo e demais atividades do setor..

University of Surrey, SURREY, Inglaterra.

Vínculo institucional 2016 - 2017

Vínculo: Contrato por hora, Enquadramento Funcional: Monitor de aulas praticas/teoricas, Carga horária: 20

Outras informações

Monitoria de aula pratica na University of Surrey/UK nos modulos de: Methods in Molecular Biology, Cell Biology, Lab Induction semester one, Chemistry and Maths for Biosciences, Biochemistry: Building Blocks of Life, Biochemistry - A Conceptual Overview, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY AND CHEMISTRY, MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS - GENES AND THEIR FUNCTION, Introduction to Immunology, Practical and Biomedical Bacteriology, Introduction to Principles of Physiology and Practical Skills, Invigilation 2017.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Mutagenese.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Biofísica Celular.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Radiologia e Fotobiologia.

Idiomas

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

Prêmios e títulos

2014	Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, UFRGS.
2014	Keystone Symposia Travel Award - S2 Cell Death Signaling in Cancer, Keystone Symposia.
2012	Awards for young scientists - XVII ALEXANDER HOLLANDER COURSE/ Uruguay, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)/ XVII AHC.
2011	Destaque do XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS -apresentação oral e pôster, PROPESQ/UFRGS.
2011	Título - Bacharel em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Produções

Produção bibliográfica


Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. FURTADO-FILHO, ORLANDO V. ; BORBA, JULIANA B. ; MARASCHIN, TATIANA ; **SOUZA, LARISSA M.** ; HENRIQUES, JOÃO A. P. ; MOREIRA, JOSÉ C. F. ; Saffi, Jenifer . Effects of chronic exposure to 950 MHz ultra-high-frequency electromagnetic radiation on reactive oxygen species metabolism in the right and left cerebral cortex of young rats of different ages. International Journal of Radiation Biology (Print) **JCR**, v. 91, p. 1-7, 2015.
2. BORTOLOTTI, IRANEZ ; BRUM, ANA PAULA S. ; **DE SOUZA, LARISSA M.** ; TRINDADE, CRISTIANO ; GUECHEVA, TEMENOUGA N. ; LUIZ, FABIANO M ; DE PAULA-RAMOS, ANA LIGIA L ; CONSIGLIO, ANGELICA R. . DNA damage Evaluation in a Nursing Team Occupationally Exposed to Ionizing Radiation. Brazilian Journal of Radiation Sciences, v. 3, p. 10.15392/bjrs.v, 2015.

Resumos publicados em anais de congressos

1.  **Milano, L.**; ANDREGUETTI, R. ; THOME, M. ; LENZ, G. ; HENRIQUES, J. A. P. ; MEIRA, L. . ?CHARACTERIZING A NOVEL ROLE FOR A DNA REPAIR PROTEIN INDUCING THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE TO ALKYLATION TREATMENT?. In: FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, 2017, Figueira da Foz, Portugal. EBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, 2017. v. 1.

Apresentações de Trabalho

1. **Milano, L.**. Introdução à genotoxicidade. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- 2.

- Milano, L.**; ANDREGUETTI, R. ; THOME, M. ; SAMSON, L.D. ; LENZ, G. ; HENRIQUES, JOÃO A. P. ; NOHTURFFT, A. ; MEIRA, L. . ALKYLADENINE DNA GLYCOSYLASE (AAG/MPG) IS NECESSARY FOR UPR ACTIVATION IN RESPONSE TO ALKYLATING AGENTS. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. ★ **Milano, L.**; ANDREGUETTI, R. ; THOME, M. ; LENZ, G. ; HENRIQUES, J. A. P. ; MEIRA, L. . ?CHARACTERIZING A NOVEL ROLE FOR A DNA REPAIR PROTEIN INDUCING THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE TO ALKYLATION TREATMENT?. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 4. **Milano, L.**; ANDREGUETTI, R. ; LENZ, G. ; HENRIQUES, J. A. P. ; MEIRA, L. . Elucidating the role of alkylation DNA damage repair in the response of glioblastoma cells to radiotherapy. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 5. **Milano, L.**; ANDREGUETTI, R. ; THOME, M. ; LENZ, G. ; HENRIQUES, J. A. P. ; MEIRA, L. . Elucidating the role of AAG in the response of glioblastoma cells. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
 6. **Milano, L.**; Guescheva T. ; AGNOLLETO, M. ; MENCK, C. ; Henriques J.A.P. ; Saffi, Jenifer . Repair kinetics and oxidative damage induction in NER-deficient human fibroblasts treated with Doxorubicin. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 7. **Milano, L.**; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . Cinética de Reparo e Indução de Dano Oxidativo pela Doxorubicina em Fibroblastos Humanos Deficientes em Reparo por Excisão de Nucleotídeos.. 2010. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
 8. Guescheva T. ; **Milano, L.** ; AGNOLLETO, M. ; Henriques J.A.P. ; MENCK, C. ; SARASIN, A. ; Saffi, Jenifer . . The role of oxidative damage and DNA adducts formation on the doxorubicin induced cytotoxicity in NER-deficient human fibroblasts. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 9. **Milano, L.**; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . Danos oxidativos e estudo do reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) na indução de lesões induzidas pela doxorubicina em fibroblastos humanos. 2010. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 10. **SOUZA, L. M.**; Viau C. ; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer ; Henriques J.A.P. . Induction of Fpg and Endo III Sensitive Sites in V79 Fibroblasts by Stannous Chloride. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 11. **Milano, L.**; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . Indução de danos oxidativos no DNA de células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos tratadas com Doxorubicina.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 12. **Milano, L.**; AGNOLLETO, M. ; Guescheva T. ; Batista L. Z., ; Henriques J.A.P. ; MENCK, C. ; Saffi, Jenifer . The role of oxidative damage on the doxorubicin induced cytotoxicity in XPD-deficient fibroblasts. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
 13. **Milano, L.**; Guescheva T. ; Saffi, Jenifer . INDUÇÃO DE DANOS OXIDATIVOS NO DNA DE CÉLULAS DEFICIENTES EM REPARO POR EXCIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS TRATADAS COM DOXORRUBICINA. 2009. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 14. ★ Saffi, Jenifer ; **SOUZA, L. M.** . O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-frequência sobre o peso de ratos neonatos.. 2008. (Apresentação de Trabalho/Outra).
 15. **Milano, L.**. Rio Grande do Sul - Divisão do Espaço Agrário e Atividade Industrial. 2005. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Outras produções bibliográficas

1. ★ **SOUZA, L. M.**; Saffi, Jenifer ; Borba, Juliana ; Furtado, Orlando . AÇÃO INIBIDORA DO EXTRATO DAS FLORES DE *H. tiliaceus* L. SOBRE STRESS OXIDATIVO CAUSADO POR CAMPO ELETROMAGNÉTICO DE ULTRA-ALTA-FREQÜÊNCIA 2008 (14º Encontro Nacional de Química Analítica/João Pessoa - PB).

Demais tipos de produção técnica

1. **Milano, L.**. Curso de Férias -edição: A Célula. 2015. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. **Milano, L.**. Curso de Férias - Você conhece a célula?. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. FHMS Festival of research.Elucidating the role of alkylation DNA damage repair in the response of glioblastoma cells to therapy. 2016. (Encontro).
2. Frontiers in DNA Repair Symposium.Elucidating the role of AAG in the response of glioblastoma cells. 2016. (Simpósio).
3. Responses to DNA damage: from molecule to disease. Elucidating the role of alkylation DNA damage repair in the response of glioblastoma cells to radiotherapy. 2016. (Congresso).
4. 23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. AUTOPHAGY, SENESENCE AND MITOCHONDRIAL CONTENT IN NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR DEFICIENT CELLS TREATED WITH DOXORUBICIN. 2015. (Congresso).
5. Best of ASCO. 2015. (Encontro).
6. Keystone Symposium on Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System.Autophagy and senescence induced by doxorubicin in nucleotide excision repair deficient cells. 2014. (Simpósio).
7. 11th International Conference on Environmental Mutagens. Doxorubicin cytotoxicity and autophagy induction in DNA repair deficient cells. 2013. (Congresso).
8. FEBS DNA REPAIR WORKSHOP.Cellular responses induced by doxorubicin in human fibroblasts deficient in nucleotide excision repair. 2013. (Oficina).
9. Mathematical modeling of the DNA damage response.The nuclear morphometry analysis (NMA) as a tool for evaluation of senescence in human fibroblasts deficient in Nucleotide Excision Repair. 2013. (Oficina).
10. V FARM - DNA V Fundamental aspects of DNA Repair and Mutagenesis.Doxorubicin cytotoxicity and autophagy induction in DNA repair deficient cells. 2013. (Encontro).

11. 10th International Congress on Cell Biology. Citotoxic effects of anthracyclines in human fibroblasts deficient in nucleotide excision repair. 2012. (Congresso).
12. Workshop Cell Stress. The nuclear morphometry analysis (NMA) as a tool for evaluation of senescence in human fibroblasts deficient in Nucleotide Excision Repair. 2012. (Oficina).
13. XVII Alexander Hollaender Course. The nuclear morphometry analysis (NMA) as a tool for evaluation of senescence in human fibroblasts deficient in Nucleotide Excision Repair. 2012. (Outra).
14. IV Semana Científica da UFCSPA e I semana de Tecnologia e Inovação. Avaliação da Indução de Senescência celular induzida por antraciclina em fibroblastos humanos deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos. 2011. (Outra).
15. XIII Reunião Anual PPGBCM/UFRGS. Efeitos citotóxicos de antraciclina em fibroblastos deficientes em NER. 2011. (Encontro).
16. XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Efeitos citotóxicos de antraciclina em fibroblastos deficientes no reparo por excisão de nucleotídeos. 2011. (Outra).
17. I Simpósio dos programas de pós-graduação da UFCSPA e I Mostra Científica dos Programas de Pós-Graduação em Saúde. Cinética de Reparo e Indução de Dano Oxidativo pela Doxorubicina em Fibroblastos humanos deficientes em Reparo por Excisão de Nucleotídeos. 2010. (Simpósio).
18. IV Semana acadêmica de Biomedicina da UFRGS. 2010. (Outra).
19. XIV Congresso Latino Americano de Genética. Repair kinetics and oxidative damage induction in NER-deficient human fibroblasts treated with Doxorubicin. 2010. (Congresso).
20. XXII Salão de Iniciação Científica UFRGS. Danos oxidativos e estudo do reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) na indução de lesões induzidas pela doxorubicina em fibroblastos humanos. 2010. (Outra).
21. Congresso Brasileiro da SBMCTA. The role of oxidative damage on the doxorubicin induced cytotoxicity in XPD-deficient fibroblasts. 2009. (Congresso).
22. II Ciclo de Palestras em Imunologia: Um olhar sobre a Imunoterapia. 2009. (Outra).
23. II Congresso Internacional de Bioanálises, V Congresso Sul-brasileiro de Biomedicina e IX Semana Gaúcha de Biomedicina. 2009. (Congresso).
24. III Semana acadêmica de Biomedicina da UFRGS. 2009. (Outra).
25. V Jornada Acadêmica do Curso de Biomedicina e I Simpósio sobre Habilitações da Biomedicina da UFCSPA. 2009. (Simpósio).
26. XXI Salão de Iniciação Científica UFRGS. Indução de danos oxidativos no DNA de células deficientes em reparo por excisão de nucleotídeos tratadas com Doxorubicina. 2009. (Outra).
27. Congresso Sul de Toxicologia Clínica Laboratorial - ToxSul. 2008. (Congresso).
28. II Semana acadêmica de Biomedicina da UFRGS. 2008. (Outra).
29. V Jornada Acadêmica do Curso de Biomedicina ULBRA. 2008. (Outra).
30. XIV Salão de Iniciação Científica da ULBRA 2008. O efeito do campo eletromagnético de ultra-alta-frequência sobre o peso de ratos neonatos. 2008. (Outra).
31. IV Jornada Acadêmica de Biomedicina ULBRA. 2007. (Outra).
32. II Fórum FTEC- Gestão de competências profissionais. 2006. (Outra).
33. I Salão Iniciação Científica da UFRGS Alegrete. Rio Grande do Sul - Divisão do Espaço Agrário e Atividade Industrial. 2005. (Outra).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Caroline Vieira. AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA AAG NA RESPOSTA DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA AO TRATAMENTO DE COM TEMOZOLAMIDA EM COMBINAÇÃO COM AGENTES FARMACOLÓGICOS INDUTORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO. Início: 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Rafaela Rafognatto Andregueti. DNA repair enzyme Alkyl Adenine Glycosylase (AAG) levels modulates Unfolded Protein Response (UPR). 2016. Iniciação Científica - University of Surrey, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Orientador: Larissa Milano de Souza.

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. **Milano, L.** Introdução à genotoxicidade. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

Cursos de curta duração ministrados

1. **Milano, L.** Curso de Férias - Você conhece a célula?. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. **Milano, L.** Curso de Férias -edição: A Célula. 2015. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).