

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

**Atividade antiviral e antitumoral do Dipiridamol:
uma abordagem de reposicionamento de fármaco**

Marcos Paulo Thomé
Orientador: Guido Lenz
Co-orientadora: Márcia Rosângela Wink

PORTO ALEGRE 2019

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

**Atividade antiviral e antitumoral do Dipiridamol:
uma abordagem de reposicionamento de fármaco**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutor
em Ciências: Biologia Celular e Molecular

Marcos Paulo Thomé
Orientador: Guido Lenz
Co-orientadora: Márcia Rosângela Wink

PORTO ALEGRE 2019

“Le hasard ne favorise que les esprits préparés”

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela bolsa de doutorado, e às demais agências financiadoras que proveram recursos para a realização desse trabalho e aos professores e funcionários do PPGBCM da UFRGS, em especial ao professor João Antonio Pêgas Henriques, coordenador do projeto CAPES-COFECUB, pela contribuição para a realização do doutorado sanduiche;

Aos colegas do LabSinal, com quem convivi nos últimos nove anos, pela troca de experiências e pela importante contribuição na minha formação. À Luiza, pela colaboração no trabalho e a quem tive o prazer de ensinar. Um agradecimento especial ao Eduardo, quem admiro pela qualidade do trabalho e otimismo, por ter contribuído na minha formação desde o início e estar sempre disponível;

Aos colegas de laboratório na França que auxiliaram na instalação ou na adaptação.

Agradeço, em especial, à Chloé pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho. Aos supervisores, Alexandre e Vincent, pela recepção no laboratório e, em especial, pela confiança e por concederem liberdade para a condução do trabalho;

Ao Guido, quem admiro pela inteligência, dedicação e modo de liderança proporcionando liberdade. Ao Guido e à Márcia agradeço pela confiança e compreensão e por todos ensinamentos, que foram e serão fundamentais para a minha carreira;

Aos meus amigos Alexandra, Giovana, Raquel, Flávio e Magnus, por estarem sempre presentes, compreenderem as dificuldades e contribuírem para superá-las;

Ao meu pai, Ademir, e a minha irmã, Franciele, pelo apoio, confiança e investimento na minha formação. Especialmente a minha mãe, Tânia (*in memoriam*), a quem devo os sentimentos mais sinceros de gratidão e admiração.

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado encontra-se estruturada em capítulos, conforme o seguinte formato:

Capítulo I

Introdução geral

Hipóteses de Trabalho

Objetivo Geral

Objetivos Específicos

Capítulo II

Manuscrito I

Capítulo III

Manuscrito II, cuja experimentação foi realizada durante o doutorado sanduíche na Sorbonne Université

Capítulo IV

Conclusões, discussão e perspectivas

Referências

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
CAPÍTULO I	12
Introdução.....	13
1. Autofagia	13
1.1 Mecanismos moleculares	14
1.2 Regulação da autofagia	20
1.3 Implicações e modulação da autofagia como alvo terapêutico em câncer de próstata	24
2 Vírus Epstein-Barr.....	28
2.1 Biologia molecular do EBV.....	29
2.2 Patogênese e estratégias terapêuticas.....	33
3 Reposicionamento de fármacos.....	37
3.1 Reposicionamento de fármaco em oncologia e doenças infecciosas virais.....	41
3.2 Dipiridamol	44
3.2.1 Transporte de nucleosídeos e metabolismo de nucleotídeos.....	48
Hipóteses.....	51
Objetivos	52
CAPÍTULO II	53
Manuscrito I	54
CAPÍTULO III	68
Manuscrito II	69
CAPÍTULO IV	99
Discussão e conclusões	100
Referências.....	113

RESUMO

O reposicionamento de fármacos aprovados é uma alternativa importante para a identificação e desenvolvimento de terapias, agilizando a aprovação de medicamentos com perfis de segurança e eficácia previamente estabelecidos em um contexto para novas aplicações terapêuticas. Novas indicações podem ser identificadas para moléculas de diferentes origens que mostram potencial de reposicionamento agindo sobre um alvo novo ou previamente conhecido. Nesta tese, abordamos aspectos de reposicionamento do dipiridamol em duas aplicações diferentes. O dipiridamol é um fármaco vasodilatador e antitrombótico e seus efeitos decorrem da sua atividade de inibição de transportadores de nucleosídeos e de fosfodiesterases. Primeiro, relatamos que em células de câncer de próstata o dipiridamol promove o aumento de marcadores da autofagia devido ao bloqueio do fluxo autofágico, interferindo no processo de maturação e/ou fechamento dos autofagossomos, prejudica a degradação de substratos da autofagia e reduz os níveis intracelulares de ATP. O bloqueio do fluxo autofágico mediado pelo dipiridamol pode ser revertido pelo tratamento com um inibidor de PKA, sugerindo que a inibição do fluxo autofágico resulta do aumento dos níveis intracelulares de cAMP. O tratamento com dipiridamol apresenta efeitos antiproliferativos *in vitro* isoladamente ou em combinação com quimioterápicos em linhagens celulares de câncer de próstata. Com isso, esse trabalho demonstra que o dipiridamol pode inibir o fluxo autofágico e pode ser útil na terapia antineoplásica onde a autofagia desempenha um papel pró-tumoral. Na segunda parte do trabalho abordamos o potencial antiviral da inibição do transporte de nucleosídeos com dipiridamol. A replicação viral é um evento que depende das fontes de nucleotídeos das células hospedeiras, os quais podem ser provenientes da reciclagem de nucleosídeos extracelulares através da via de salvamento. Mostramos que o dipiridamol inibe a reativação do vírus Epstein-Barr em linhagens de linfócitos B, reprimindo a transcrição gênica, a replicação do genoma viral e liberação de vírions, principalmente através de sua capacidade de inibir a captação de nucleosídeos. Considerando a segurança do seu uso clínico e perfil farmacológico bem conhecido, o reposicionamento do dipiridamol pode ser considerado para tratamento, isolado ou em combinação com outras terapias, para tratar

neoplasias e doenças relacionada à infecção pelo vírus Epstein-Barr e buscar aplicações para outras famílias de vírus.

Palavras-chave: Dipyridamol; Reposicionamento de fármaco; Autofagia; Bloqueio do fluxo autofágico; Reativação do vírus Epstein-Barr; Terapia antiviral.

ABSTRACT

Repurposing approved drugs is an important approach to the identification and development of therapeutics for many applications, expediting the approval of effective and safe drugs. New indications can be identified for molecules of different origins showing repurposing potential by acting against a previously known or a new target. In this thesis, we approached aspects of dipyridamole repurposing for two different applications. Dipyridamole is a vasodilator and antithrombotic drug and its major effects involve the block of nucleoside uptake and phosphodiesterase inhibition. First, we report that in prostate cancer cells dipyridamole increases autophagic markers due to autophagic flux blockage, resembling autophagosome maturation and/or closure impairment. Treatment with dipyridamole results in an increased number of autophagosomes and autolysosomes and impairs degradation of autophagic substrates, reducing the intracellular ATP levels in cancer cells. Autophagic flux blockage could be prevented by treatment with a PKA inhibitor, suggesting that autophagic flux failure mediated by dipyridamole results from increased intracellular levels of cAMP. The treatment presents antiproliferative effects *in vitro* alone and in combination with chemotherapy drugs. Collectively, these data demonstrate that dipyridamole can impair autophagic degradation, by preventing the normal autophagosomes maturation, and might be useful in combination anticancer therapy where autophagy plays a pro-survival role. In the second work, we address the antiviral potential of targeting nucleoside transport with dipyridamole. The viral replication relies on the sources of nucleotides from the host cells and cellular nucleotide pools can be refueled by recycling extracellular nucleosides through the salvage pathway. We show that dipyridamole inhibits Epstein-Barr Virus reactivation from B-cell lines, repressing immediate early and early genes expression mostly through its ability to inhibit nucleoside uptake. Considering its wide clinical use, dipyridamole repurposing could shortly be evaluated, alone or in combination with other therapies, to treat cancer and EBV-related diseases or to investigate applications in other families of viruses.

Keywords: Dipyridamole; Autophagy; Autophagic flux blockage; Cancer biology; Drug repurposing; Epstein-Barr Virus reactivation; Antiviral.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP** – Adenosine diphosphate (Adenosina difosfato)
ADT – Androgen deprivation therapy (Terapia de privação androgênica)
Akt – AKT Serine/Threonine Kinase (AKT Serina/Treonina cinase)
AMBRA1 – Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1 (Molécula ativadora na autofagia regulada por beclina-1)
AMP – Adenosine monophosphate (Adenosina monofosfato)
AMPK – 5'AMP-activated Protein Kinase (Proteína cinase ativada por AMP)
AR – Adenosine receptor (Receptor de adenosina)
ATG – Autophagy-related protein (Proteína relacionada à autofagia)
ATP – Adenosine triphosphate (Adenosina trifosfato)
BECN1 – Beclin 1 protein (Proteína beclina-1)
CaMKK β – calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 β (Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina 2 β)
cAMP – Cyclic AMP (AMP cíclico)
cGMP – Cyclic GMP (GMP cíclico)
CNT – Concentrative nucleoside transporter (Transportador concentrativo de nucleosídeos)
CQ – Chloroquine (cloroquina)
CRPC – Castration resistant prostate câncer (Câncer de próstata resistente à castração)
DEPTOR – DEP-domain-containing mTOR- interacting protein (Proteína de interação a mTOR contendo domínio DEP)
EaD – Early antigen D
EBNA – Epstein-Barr virus nuclear antigen (Antígeno nuclear do EBV)
EBV – Epstein-Barr Virus (Vírus Epstein-Barr)
EMA – European Medicines Agency (Agência Europeia de Medicamentos)
ENT – Equilibrative nucleoside transporter (Transportador equilibrativo de nucleosídeos)
FDA – Food and Drug Administration
GMP – Guanosine monophosphate (Guanosina monofosfato)
GTP – Guanosine triphosphate (Guanosina trifosfato)
GTPase – GTP Hydrolase (Hidrolase de GTP)
HCQ – Hydroxychloroquine (Hidroxicloroquina)
HDAC – Histone deacetylase (Histona desacetilase)
Ig – Immunoglobulin (imunoglobulina)
IL – Interleukine (interleucina)
LAMP2A – Lysosome-associated membrane protein 2 (Proteína 2 de membrana associada ao lisossomo)
LC3 – ver MAP1LC3
LIR – LC3 interacting region (Região de interação a LC3)
LMP – Epstein-Barr virus latent membrane protein (Proteína latente de membrana do EBV)
MAP1LC3 – Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos)
MI – Mononucleose infecciosa
mTOR – Mammalian Target of Rapamycin (Proteína alvo da rapamicina em mamíferos)
mTORC – Mammalian Target of Rapamycin Complex (Complexo da proteína alvo da

rapamicina em mamíferos

NBMPR – Nitrobenzylthioinosine

NK – Natural killer

PAS – Phagophore Assembly Site (Sítio de montagem do fagóforo)

PCa – Prostate cancer

PDE – Phosphodiesterase (Fosfodiesterase)

PE – Phosphatidylethanolamine (Fosfatidiletanolamina)

PI3K – Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase (Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfato 3-
cinase)

PI3P – Phosphatidylinositol 3-phosphate (Fosfatidilinositol 3-fosfato)

PKA – Protein kinase A (Proteína cinase A)

PTLD – Post transplant lymphoproliferative disorder (Desordem linfoproliferativa pós-
transplante)

RAPTOR – Regulatory-associated protein of mTOR (Proteína regulatória associada à mTOR)

ReDO – Repurposing Drugs in Oncology

SNAP – Synaptosomal-associated Protein (Proteína associada a sinaptossoma)

SNARE – Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment Receptor

SQSTM1/p62 – Sequestosome 1/proteína p62

STX – Syntaxin (Sintaxina)

TFEB – Transcription factor EB (Fator de transcrição EB)

TGF- β – Transforming Growth Factor β (Fator de crescimento transformador β)

ULK1/2 – unc-51-like Autophagy Activating Kinase 1/2

UVRAG – UV radiation resistance-associated gene (Gene associado a resistência à radiação
UV)

VAMP – Vesicle-associated membrane protein (Proteína de membrana associada à
vesícula)

ZEBRA – BamHI Z Epstein-Barr virus replication activator

ZTA – ver ZEBRA

CAPÍTULO I

Introdução

1. Autofagia

A homeostasia das células depende de uma fina regulação entre o anabolismo e catabolismo de seus componentes. As duas principais vias de degradação de componentes celulares em organismos eucariotos são a autofagia e a via da ubiquitina-proteassoma. A via do proteassoma elimina seletivamente proteínas anormalmente enoveladas ou danificadas que foram marcadas com ubiquitina e é a principal via para a degradação de proteínas de vida curta. Por outro lado, do ponto de vista de substratos, a autofagia é um processo mais abrangente, pelo qual ocorre a reciclagem de proteínas e organelas de vida longa, envolvendo a participação lisossomal (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011).

Em situações fisiológicas, a autofagia ocorre em níveis basais, assegurando a reciclagem contínua de conteúdos celulares envelhecidos, desnecessários ou danificados. A autofagia basal medeia uma função homeostática fundamental, operando constantemente como um sistema de controle de qualidade intracelular. Por outro lado, o processo pode ser regulado positivamente em resposta a uma ampla variedade de estímulos, incluindo estresse metabólico, oxidativo, patogênico e genotóxico, hipóxia e privação de fatores de crescimento, por exemplo. Muitas vezes, a autofagia induzida sustenta uma resposta adaptativa ao estresse, com função citoprotetora. E, de fato, a inibição farmacológica ou genética da autofagia geralmente limita a capacidade das células de lidar com o estresse e restaurar a homeostase (LEVINE; KROEMER, 2019).

O termo autofagia refere-se a um grupo de processos catabólicos, todos tendo em comum a entrega de componentes celulares aos lisossomos para degradação. Esses processos são classificados em três tipos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia envolve a formação de uma organela de membrana dupla, chamada autofagossomo, que promove o isolamento dos substratos a serem degradados. Os autofagossomos são direcionados para fusão com os lisossomos, quando ocorre a degradação da carga (FENG et al., 2014). A microautofagia refere-se à invaginação da membrana lisossomal ou endossomal, resultando no engolfamento direto de substratos subsequentemente degradados pelas enzimas lisossomais (LI; LI; BAO, 2012).

Já a autofagia mediada por chaperonas distingue-se das demais porque os substratos não são sequestrados por organelas delimitadas por membrana. Ao contrário, as proteínas endereçadas à degradação contêm um motivo conservado, KFERQ, reconhecido pela proteína chaperona HSC70, a qual promove a translocação desses alvos através da membrana lisossomal para o compartimento luminal envolvendo o reconhecimento pelo receptor de proteína de membrana 2A associado ao lisossomo (LAMP2A) (CUERVO; WONG, 2014). Dentre essas vias, a macroautofagia é a mais bem caracterizada e o termo autofagia utilizado daqui em diante refere-se a esse processo.

1.1 Mecanismos moleculares

Os mecanismos celulares e moleculares da autofagia têm interessado à pesquisa desde o final dos anos 1950, quando os lisossomos foram originalmente descritos por Christian de Duve. Alguns anos mais tarde, em análises de microscopia eletrônica, a presença de organelas citoplasmáticas envolvidas por vesículas de membrana dupla intrigaram os pesquisadores, quando, em 1963, o termo “autofagia” (do grego autós, “si mesmo, próprio” e fagein, “comer”) foi cunhado para descrever esse fenômeno (CASTRO-OBREGON, S, 2010).

Os achados fundamentais em estudos de levedura forneceram detalhes da via, em particular a identificação da maquinaria molecular (as proteínas relacionadas à autofagia – ATGs) e da progressão morfológica das organelas relacionadas à autofagia. E foram essas caracterizações que impulsionaram o interesse pelo estudo da autofagia. A maioria dos dados para a construção do conhecimento acerca da autofagia foi obtida em estudos de estresse induzido pela privação de aminoácidos, o que promove modificações das proteínas ATGs, tanto alterações subcelulares como modificações transcricionais e pós traducionais. Nesse sentido, tem grande importância na área os estudos desenvolvidos pelo pesquisador Yoshinori Ohsumi, quem recebeu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2016 por sua contribuição no estudo dos mecanismos de autofagia.

O curso normal da autofagia inicia com a formação do fagóforo, expansão e fechamento do autofagossomo com o sequestro de porções citoplasmáticas endereçadas

à degradação e é concluída com a digestão dos substratos após a fusão com os lisossomos e desmontagem da organela autofágica. A esse processo dá-se o nome de fluxo autofágico, cuja medida pode indicar de forma mais precisa a taxa de formação e de conclusão do processo (LOOS; DU TOIT; HOFMEYR, 2014). O processo pode ser morfológica e funcionalmente dividido em cinco eventos: indução, nucleação, expansão, fusão e degradação/reciclagem (Figura 1). Todas etapas são transitentes e extremamente dinâmicas, envolvendo controle e integração com diversas vias de sinalização.

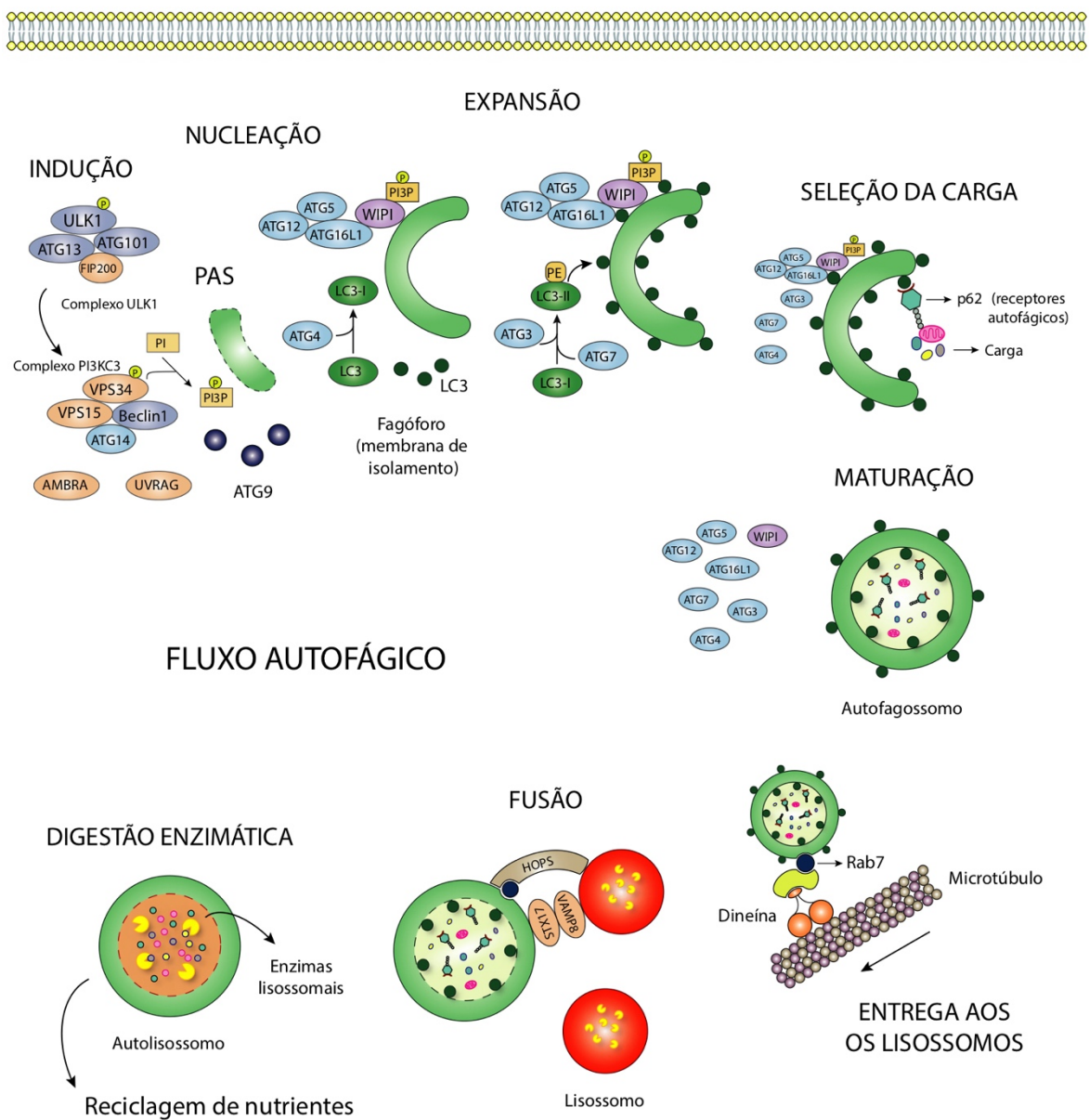


Figura 1 – Progressão morfológica e principais eventos moleculares da autofagia. A figura ilustra as diferentes etapas do fluxo autofágico (indução, nucleação, expansão, maturação, fusão e degradação) e as principais moléculas envolvidas no processo em mamíferos. Adaptado de ONZI, 2018.

A indução da autofagia resulta no recrutamento, montagem de complexos funcionais e ativação de proteínas ATGs em sítios subcelulares chamados de omegasomo (também chamado de sítio de montagem do fagóforo – PAS), onde inicia a montagem do fagóforo (também chamado de membrana de isolamento) e onde as proteínas do complexo do tipo quinase UNC51 (ULK) – que é composto de ULK1/ULK2, ATG13, FIP200 e ATG101 – são recrutadas para iniciar a formação do autofagossomo (HURLEY; YOUNG, 2017). A montagem desse complexo é crucial para a autofagia porque desempenha um papel no recrutamento de outras proteínas ATGs e na ativação de alvos a jusante através da fosforilação.

Em seguida, no estágio de nucleação, o complexo ULK ativado tem como alvo o complexo da fosfatidilinositol 3-quinase de classe III (PI3K classe III) – consistindo da subunidade catalítica VPS34 (também chamado PIK3C3), da subunidade regulatória VPS15 (também chamado PIK3R4), Beclina-1 e ATG14 ou UVRAG (UV radiation resistance-associated gene) (estas proteínas ligam a Beclina-1 de maneira mutuamente excludente). Várias proteínas que interagem com Beclina-1 podem ser recrutadas para esse complexo, incluindo AMBRA1 (*activating molecule in BECN1 regulated autophagy*), que em condições de disponibilidade de nutrientes se liga à Beclina-1 e VPS34 e promove a ligação do complexo ao citoesqueleto, por meio da interação com a proteína motora dineína. Sob privação de nutrientes, AMBRA1 é fosforilada por ULK1 e o complexo é liberado, favorecendo a atividade de VPS34 e a formação do fagóforo (RUSSELL; YUAN; GUAN, 2014). Em parte, o processo de nucleação pode ser visto como um evento de amplificação de sinal, que resulta no recrutamento de proteínas que são necessárias para a expansão do fagóforo, onde o complexo PI3K classe III promove a produção local de um pool de fosfatidil-inositol 3-fosfato (PI3P), a partir de fosfatidilinositol, o qual é essencial para a localização correta de proteínas ATGs na membrana do autofagossomo nascente (YU; LONG; SHEN, 2015).

No estágio de expansão, os membros da família WIPI (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) desempenham um papel importante no reconhecimento de PI3P no fagóforo nascente e recrutam os sistemas de conjugação de proteínas que promovem a expansão do autofagossomo (PROIKAS-CEZANNE et al., 2015). Existem dois sistemas de conjugação que envolvem um sistema de conjugação do tipo ubiquitina, assim chamado pela semelhança entre os processos, que contribuem para a expansão do fagóforo. No primeiro evento de conjugação, a proteína ATG12 é conjugada covalentemente a ATG5, de maneira dependente da atividade de ATG7 e ATG10. Em seguida, a proteína ATG16L liga-se a ATG5 de forma não covalente e promove a dimerização, formando o complexo ATG12-ATG5-ATG16L (WALCZAK; MARTENS, 2013, p. 8). Esse complexo associa-se ao fagóforo de forma transiente através da interação com WIPI, dissociando-se após o fechamento do autofagossomo (GENG; KLIONSKY, 2008, p. 12).

O segundo sistema de conjugação envolve a proteína Atg8, sendo o homólogo melhor caracterizado em mamíferos a cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos (MAP1LC3; também conhecida como LC3). A particularidade desse sistema está no fato de que em vez de se conjugar com outra proteína, a proteína LC3 é ligada ao fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE). Essa via começa com a clivagem da forma proLC3 pela protease ATG4, expondo um resíduo de glicina C-terminal, e o produto da clivagem é chamado de LC3-I. Em etapas subsequentes, com a atuação de ATG7, ATG3 e do complexo ATG12-ATG5-ATG16L, a LC3-I citosólica é conjugada covalentemente à PE, ancorada à membrana do autofagossomo, passando então a ser nomeada LC3-II (GENG; KLIONSKY, 2008, p. 12). Embora associada à membrana, LC3-II pode ser liberada como resultado de uma segunda clivagem mediada por ATG4. O mecanismo de regulação e função desse segundo processamento, conhecido como desconjugação, não é completamente compreendido, mas parece ter pelo menos dois papéis: permitir a reciclagem de LC3 e promover a expansão do autofagossomo e, concomitantemente, prevenir a fusão prematura do autofagossomo com lisossomo (NAIR et al., 2012; NAKATOGAWA et al., 2012, p. 4).

Embora diversos modelos têm sido usados para dissecar os mecanismos subjacentes à maturação de autofagossomos e fusão aos lisossomos, essas etapas são as menos compreendidas e a maior fonte de informações provém do estudo na levedura

Saccharomyces cerevisiae, devido à sua relativa simplicidade experimental e sua exploração inicial para identificar a maquinaria molecular da autofagia (NAKATOGAWA et al., 2009).

O alongamento gradual da membrana de isolamento resulta na expansão do fagóforo em uma esfera em torno de uma porção do citoplasma. O fagóforo então se fecha em uma organela de membrana dupla, denominada autofagossomo, limitando assim o material citoplasmático englobado que constitui a carga autofágica (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010; PARZYCH; KLIONSKY, 2014). A origem das membranas que contribuem para a formação de autofagossomos em células de mamíferos ainda é questão de debate. Existem evidências que suportam a ideia de que a nucleação da membrana de isolamento provém do retículo endoplasmático, de mitocôndrias, de endossomos ou da membrana plasmática (HAMASAKI et al., 2013; PURI et al., 2013; WEI et al., 2018).

Os autofagossomos recém-formados ainda possuem as proteínas ATG em sua superfície e tais proteínas podem atuar como inibidores no recrutamento e/ou ativação da maquinaria de fusão. Por isso, durante a maturação dos autofagossomos ocorre a remoção de PI3P e LC3 e esse evento leva à liberação das proteínas ATG associadas ao autofagossomo. A perda de proteínas ATG é provavelmente acompanhada pela aquisição da maquinaria de fusão, que precisa estar ativa no momento certo, ou seja, após o fechamento do fagóforo, para evitar a fusão prematura (REGGIORI; UNGERMANN, 2017).

Os autofagossomos são formados aleatoriamente em todo o citoplasma, ao passo que os lisossomos são predominantemente encontrados na região perinuclear. Dessa forma, os autofagossomos são transportados até os lisossomos através de microtúbulos (MONASTYRSKA et al., 2009). Atualmente, o conhecimento da maquinaria envolvida no processo de transporte e fusão está baseado principalmente no entendimento geral do tráfego intracelular de membranas, particularmente com relação a três conjuntos de famílias de proteínas: GTPases Rab, complexos de fixação de membrana e SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) (NAKAMURA; YOSHIMORI, 2017). As proteínas Rab, como a Rab7, localizam-se em membranas e recrutam as proteínas de ancoragem HOPS (*homotypic fusion and vacuolar protein sorting*), atuando como pontes e mantendo a proximidade das membranas das organelas a serem

fusionadas e, assim, dando suporte à fusão física das bicamadas lipídicas, mediada pelas SNAREs. Na autofagia, as SNAREs STX17 (*Syntaxin 17*) e SNAP29 (*synaptosomal-associated protein 29*) nos autofagossomos e as SNAREs VAMP7 e VAMP8 nos lisossomos já foram descritas por mediar a fusão dessas organelas (HIKITA; SAKANE; TAKEHARA, 2018).

Embora a fusão seja tratada como um evento único, sabe-se que a ancoragem e fusão são eventos regulados separadamente e dois diferentes tipos de fusão podem ocorrer: a fusão completa, onde uma organela híbrida é formada ou, mais frequentemente, a fusão do tipo “*kiss-and-run*”, isto é, ocorre a troca parcial e em múltiplos eventos do conteúdo autofagossômico e lisossômico e, além disso, evidências apontam que a troca de conteúdo de membrana é geralmente unidirecional, transferido de autofagossomos para lisossomos (JAHREISS; MENZIES; RUBINSZTEIN, 2008).

Após a fusão dos autofagossomos aos lisossomos ocorre a formação das organelas chamadas de autolisossomos, onde as enzimas lisossomais degradam a carga autofágica, concluindo o processo de reciclagem para posterior reutilização dos produtos. Os lisossomos contêm mais de 50 hidrolases ácidas – entre fosfatases, nucleases, glicosidases, proteases, peptidases, sulfatases e lipases – que são capazes de degradar virtualmente qualquer macromolécula celular, dentre as quais as mais conhecidas são as proteases da família das catepsinas (SETTEMBRE et al., 2013). As macromoléculas resultantes são liberadas de volta ao citosol através de permeases, originalmente presentes na membrana dos lisossomos, permitindo a reutilização (LIM; ZONCU, 2016).

Inicialmente, a autofagia era considerada um processo não seletivo de captura e degradação de componentes citoplasmáticos aleatórios, e isto provavelmente porque os primeiros estudos de autofagia foram conduzidos sob condições limitantes de nutrientes. No entanto, mais recentemente tem-se mostrado que a autofagia pode eliminar seletivamente o material celular supérfluo ou potencialmente nocivo e, de acordo com os componentes endereçados à degradação, a chamada carga autofágica, a autofagia pode receber nomes específicos, como mitofagia (mitocôndrias), nucleofagia (núcleo), pexofagia (peroxissomos), ribofagia (ribossomos), xenofagia (para patógenos), por exemplo (ANDING; BAEHRECKE, 2017).

A autofagia seletiva é mediada pelas proteínas chamadas receptores ou adaptadores de carga autofágica, através de ligação do seu domínio de reconhecimento de carga. Esses receptores possuem também um motivo designado por região de interação com LC3 (LIR), que medeia a sua ligação às proteínas LC3, promovendo o endereçamento da carga para dentro do autofagossomo. Desta forma, essas proteínas receptoras atuam como pontes moleculares que capturam a carga autofágica direcionando para degradação autofágica (GATICA; LAHIRI; KLIONSKY, 2018). Por exemplo, os receptores p62 (também conhecido como SQSTM1), NBR1 e HDAC6 possuem um domínio de ligação a ubiquitina e promovem a degradação seletiva de substratos ubiquitinados, como agregados proteicos ou bactérias intracelulares. Outro exemplo de mediador de autofagia seletiva, o receptor Nix/BNIP3L, é essencial para remoção de mitocôndrias danificadas ou durante a maturação de reticulócitos (JOHANSEN; LAMARK, 2011).

1.2 Regulação da autofagia

Dados os importantes papéis desempenhados pela autofagia na manutenção da homeostase celular e adaptação a condições de estresse, o nível e especificidade da autofagia devem ser finamente controlados, sendo ativados em momentos adequados e reprimida quando desnecessária. A maioria dos estudos descrevem como a autofagia é mantida em níveis basais em condições normais e como ela é ativada em diferentes circunstâncias estimuladoras. Menos bem compreendidos são os mecanismos que regulam negativamente e impedem a autofagia excessiva quando as células são mantidas sob condições de estresse.

Existem diversas formas de estresse, intra ou extracelulares, que desencadeiam a autofagia (direta ou indiretamente), incluindo, entre outros, quedas dos níveis de glicose, aminoácidos, acetil-CoA, ferro, desbalanços redox, acúmulo de lipídeos e amônia (GALLUZZI et al., 2014), além de sinais não metabólicos, como danos de DNA (ELIOPOULOS; HAVAKI; GORGOLIS, 2016) ou patógenos intracelulares (COLOMBO, 2005). Todos esses fatores podem ser genericamente chamados de sinais e diferentes sensores que interagem com a maquinaria autofágica evoluíram para detectar esses sinais. A maioria dos sinais

convergem para dois complexos de proteína cinase, mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) e AMPK (*AMP-activated protein kinase*), os quais serão discutidos a seguir. As cascatas de transdução de sinal que operam *downstream* a esses sensores são interconectadas para controlar uma resposta autofágica cronologicamente coordenada para manter ou reestabelecer a homeostasia (Figura 2).

A disponibilidade de aminoácidos regula a atividade de mTOR, o principal sensor dessas alterações que também detecta e integra diversos outros sinais extra e intracelulares, regulando o catabolismo e coordenando o crescimento celular. mTOR pode ser encontrado em dois complexos proteicos distintos – mTORC1 e mTORC2 – que podem ser distinguidos com base na sua sensibilidade à rapamicina, que inibe apenas o mTORC1. Os dois complexos respondem a diferentes sinais e produzem diferentes respostas. Enquanto o mTORC2 regula a organização do citoesqueleto e a sobrevivência celular, o principal papel celular do mTORC1 é a integração do controle do crescimento celular e autofagia (RABANAL-RUIZ; OTTEN; KOROLCHUK, 2017). mTORC1 é composto por mTOR e pelas proteínas PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate 40 KDa*), MLST8 (*MTOR-associated protein, LST8 homolog*), DEPTOR (*DEP-domain-containing MTOR- interacting protein*) e RAPTOR (*regulatory-associated protein of MTOR*), esta tendo papel importante na regulação da atividade do complexo por interagir com Rag e responder aos sinais de AMPK, conforme descrito a seguir.

Nas células de mamíferos, os níveis de aminoácidos são detectados no lúmen lisossomal. Em condições favoráveis, a quantidade de aminoácidos está elevada e ocorre o recrutamento de mTORC1 para a membrana dessas organelas. Esses sensores envolvem ATPases lisossomais, GTPases Rag e o ativador de mTORC1, RHEB (*Ras homolog enriched in brain*). Ao ser ativada, Rag promove o recrutamento de mTORC1 à membrana dos lisossomos, onde ocorre então sua ativação por RHEB (SANCAK et al., 2010). Nessas condições, mTORC1 associa-se ao complexo ULK1/2 e promove a fosforilação e inibição de ULK1/2 e ATG13, inibindo a autofagia. Em condições de redução de nutrientes ou tratamento com os inibidores de mTORC1, rapamicina ou Torin1, o mecanismo de ativação de mTORC1 é reprimido, ocorrendo a rápida defosforilação do complexo ULK, resultando

na ativação da atividade cinase desse complexo e concomitante indução da autofagia (PARZYCH; KLIONSKY, 2014; ZACHARI; GANLEY, 2017).

O estado energético de uma célula atua na modulação da autofagia em função dos níveis de ATP, ADP e AMP. Quando o ATP não é ativamente sintetizado, a carga energética diminui paralelamente ao acúmulo de AMP, uma condição que estimula a autofagia através da ativação da AMPK, o principal sensor da redução dos níveis de energia celular, como em situações de privação de nutrientes (especialmente glicose), hipóxia e exposição a drogas que inibem a respiração mitocondrial (HARDIE; ROSS; HAWLEY, 2012). A AMPK é um heterotrímero cuja ativação depende da fosforilação da subunidade catalítica na treonina-172 (Thr172) pelas quinases LKB1 (*liver kinase B1*) ou CaMKK β (calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 β). O AMP é capaz de modular diretamente a atividade da AMPK através de dois mecanismos distintos. Primeiro, o AMP pode estimular a fosforilação de Thr172, agindo diretamente nas quinases LKB1 e CaMKK β e, segundo, promover a ativação alostérica e prevenir a desfosforilação de Thr172 (GOWANS et al., 2013; OAKHILL et al., 2011).

A ativação de AMPK estimula a autofagia através da inibição indireta de mTORC1 via ativação do complexo TSC1/2 (*tuberous sclerosis 1/2*), um regulador negativo de mTORC1, e através da fosforilação negativa da subunidade RAPTOR (RUSSELL; YUAN; GUAN, 2014). AMPK também pode induzir autofagia de maneira direta, independente de mTOR, por meio da fosforilação e ativação de ULK1 (KIM et al., 2011), bem como componentes do complexo Beclin 1/VPS34, aumentando a atividade da PI3K classe III (YU; LONG; SHEN, 2015).

A regulação de ULK1 por mTORC1 e AMPK proporciona um mecanismo para a integração e balanço de sinais. Por exemplo, sob condições de limitação moderada de glicose e aminoácidos suficientes, é vantajoso que as células modulem o metabolismo, mas não iniciem autofagia. Sob tais condições, a ativação da AMPK deve alterar o metabolismo celular pela fosforilação de enzimas metabólicas para promover a utilização de aminoácidos para a produção de energia. Embora AMPK iniba mTORC1, esta não deve ser completamente inibida quando aminoácidos ainda estiverem disponíveis. A atividade residual de mTORC1 pode impedir a ativação de ULK1, minimizando assim a indução da

autofagia. Portanto, a fosforilação de ULK1 por mTORC1 e AMPK pode garantir que a autofagia não seja iniciada, a menos as células sejam expostas a condições severas ou prolongadas de privação (KIM et al., 2011).

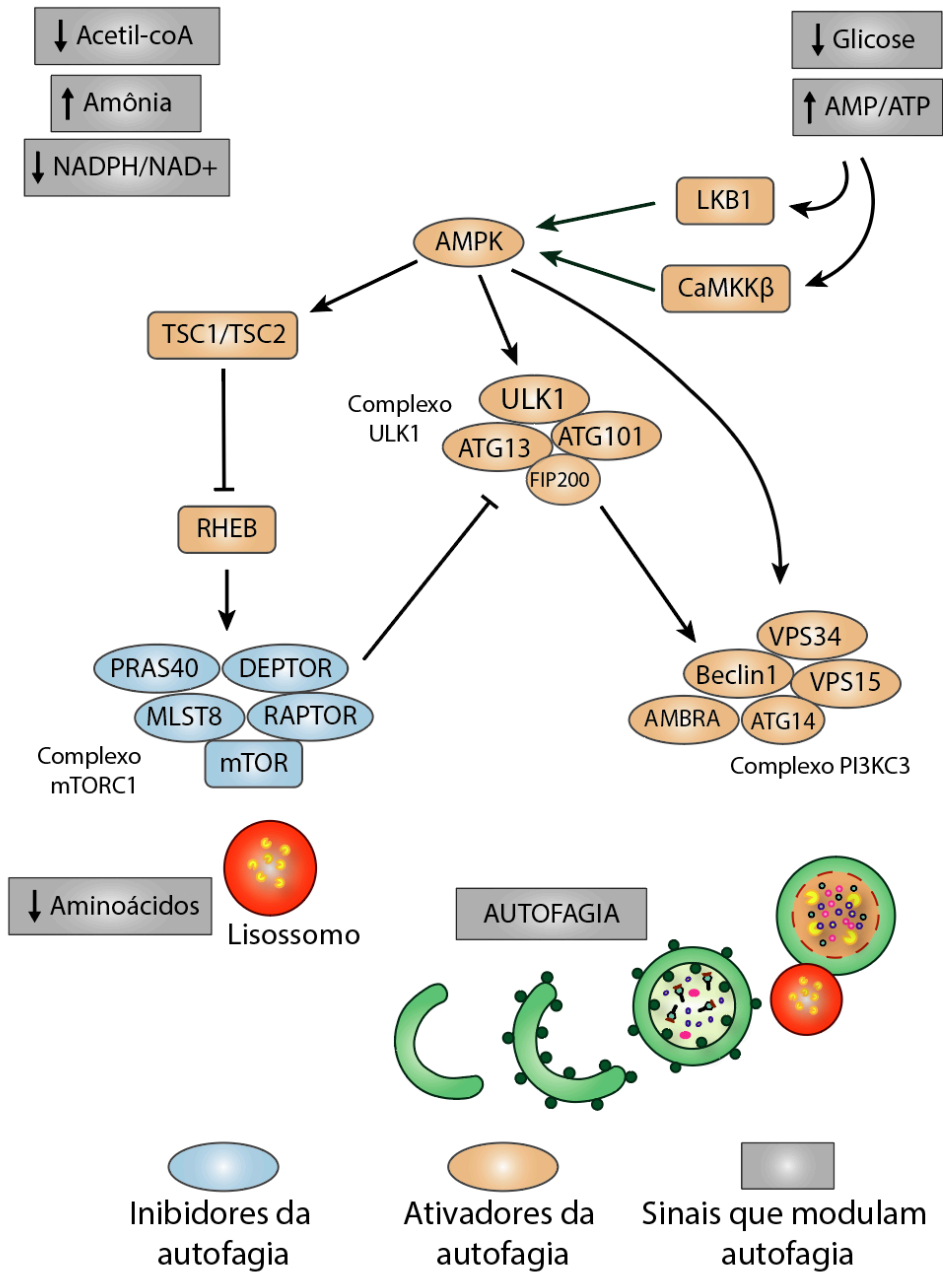


Figura 2 – Principais vias de sinalização no controle da autofagia. A figura ilustra os principais sinais intra e extracelulares que modulam a autofagia e as proteínas sensores que respondem e integram esses sinais. Flechas indicam ativação e barras indicam inibição.

1.3 Implicações e modulação da autofagia como alvo terapêutico em câncer de próstata

No contexto da biologia do câncer, a autofagia pode estar envolvida tanto na sobrevivência celular e resistência a tratamentos quanto na supressão tumoral, dependendo do tipo celular, contexto genético e estágio de desenvolvimento do tumor. Por um lado, a autofagia pode inibir a transformação maligna, refletindo sua capacidade de limitar o acúmulo de componentes celulares tóxicos potencialmente oncogênicos, preservando a estabilidade genômica (GALLUZZI et al., 2015). Por outro lado, como um mecanismo de favorecimento da sobrevivência e resistência, a autofagia pode ser usada por células tumorais para se adaptarem ao microambiente hipóxico e com baixo suprimento metabólico, especialmente na fase tardia da carcinogênese em regiões internas do tumor, onde há pouca vascularização (DEGENHARDT et al., 2006). Os mecanismos pelos quais a autofagia relaciona-se com esses múltiplos aspectos são discutidos a seguir.

O processo de tumorigênese inicia-se a partir de alterações genéticas progressivas que levam ao aumento da capacidade proliferativa das células e que são causadas pelo acúmulo de danos celulares. Nessa situação, a autofagia é particularmente importante na supressão tumoral por contribuir para a manutenção da integridade celular, atuando para prevenir que tais danos se tornem demasiadamente acentuados ou irreversíveis ao ponto de favorecer a transformação maligna das células e essas conclusões são suportadas por duas linhas de evidências. Primeiramente, mutações que ativam oncogenes (por exemplo PI3K e Akt) promovem a inibição da autofagia, enquanto que proteínas supressoras tumorais (por exemplo PTEN, TSC1 e TSC2) estimulam a resposta autofágica (GALLUZZI et al., 2015). Segundo, por meio da relação existente entre a perda de função de genes que participam do processo autofágico – como Beclin1 (LIANG et al., 1999, p. 1), ATG4 (MARIÑO et al., 2007), AMBRA (CIANFANELLI et al., 2015), ATG5 e ATG7 (TAKAMURA et al., 2011) – e o desenvolvimento de diversos tipos de tumores.

Em contraste com o papel antitumoral durante etapas iniciais da tumorigênese, a autofagia possui uma atuação pró-tumoral nos tumores já desenvolvidos, suportando a alta demanda metabólica das células e o crescimento e reduzindo a sensibilidade a estímulos intrínsecos e do microambiente que normalmente desencadeariam a morte das

células (WHITE; MEHNERT; CHAN, 2015). Essa conclusão é suportada por dados que indicam que defeitos na maquinaria da autofagia geralmente reduzem a proliferação, disseminação e potencial metastático (MOWERS; SHARIFI; MACLEOD, 2017). Além disso, diversos tumores avançados geralmente exibem um fluxo autofágico aumentado, correlacionando com um fenótipo mais invasivo, metastático e pior prognóstico (LAZOVA et al., 2012) e frequentemente associado à resistência terapêutica em diversos tipos de câncer (YUN; LEE, 2018), incluindo o câncer de próstata, onde o aumento transcricional de genes relacionados à autofagia e biogênese lisossomal promovem progressão tumoral (BLESSING et al., 2016) e promove resistência à terapia hormonal e por quimioterápicos (BENNETT et al., 2013; NGUYEN et al., 2014).

O câncer de próstata (PCa) é a segunda forma mais comum de câncer no sexo masculino e uma das principais causas de morte por câncer. Se diagnosticado precocemente, pode ser tratado eficientemente com a cirurgia de remoção da glândula (prostatectomia) e/ou radioterapia (LITWIN; TAN, 2017). Porém, em muitos pacientes ocorre a progressão para estágios avançados e formação de metástases, sobrevivendo a necessidade de terapia sistêmica (Figura 3). A terapia hormonal é o tratamento de primeira linha nesses casos e tem como alvo a sinalização de receptores de androgênio (AR), por ser o principal responsável pelo desenvolvimento e progressão desses tumores. O objetivo da terapia, chamada de terapia de privação androgênica (ADT) ou terapia de supressão androgênica, é reduzir os níveis de hormônios androgênicos, em particular, a testosterona e di-hidrotestosterona. A hormonioterapia pode envolver castração cirúrgica (orquitectomia) ou castração química (administração de agonistas do receptor do hormônio liberador do hormônio luteinizante, antagonistas androgênicos ou estrogênios) (PERLMUTTER; LEPOR, 2007).

Inicialmente, a hormonioterapia é bastante eficaz, resultando na estabilização ou regressão da doença. No entanto, dentro de 2 a 3 anos, a maioria dos pacientes desenvolve resistência a essa terapia, um estágio da doença conhecido como câncer de próstata resistente à castração (CRPC), o principal contribuinte para a mortalidade da doença (SCHER et al., 2015). Nessa fase, a sinalização do AR é reativada através de amplificação ou mutação do gene AR, variantes de *splicing* constitutivamente ativos (ativados na ausência

de androgênios) ou aumento da produção de androgênio intratumoral (NGUYEN et al., 2014), permitindo a regulação positiva do crescimento e das vias de sobrevivência necessárias para a proliferação e a progressão metastática. As opções terapêuticas para o tratamento das doenças que progridem após a terapia hormonal são bastante limitadas. Paclitaxel, sua nanoformulação Abraxane e docetaxel são os três taxanos aprovados para o tratamento de primeira linha ou a associação com compostos de platina, como tratamento de segunda linha (TEPLY; HAUKE, 2016). Apesar de sua boa resposta inicial e benefício significativo na sobrevida em pacientes, a resistência ao tratamento quimioterápico é frequente, por mecanismos como o aumento da expressão de bombas de efluxo, mutações no sítio de ligação dos taxanos aos microtúbulos e/ou reativação da via de AR (BUMBACA; LI, 2018).

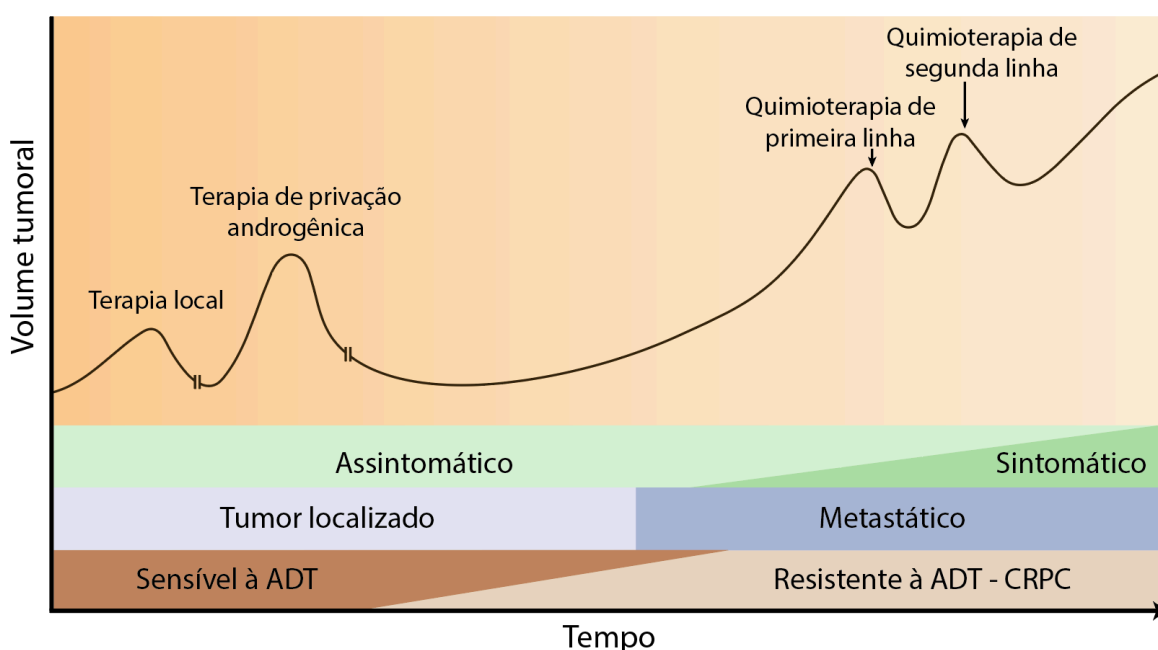


Figura 3 – Representação das estratégias terapêuticas para diferentes estágios do câncer de próstata. Adaptado de (CARREIRA et al., 2014).

A sinalização mediada pela ativação do AR é crucial para o desenvolvimento e manutenção da função prostática, bem como no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata em todos os estágios da doença (CUNHA et al., 2004) e um conjunto crescente de

evidências aponta que essa sinalização promove a indução de autofagia para favorecer o crescimento de células de PCa (CHEN et al., 2019; SHI et al., 2013). Os genes relacionados a autofagia ATG4B, ATG4D, ULK1 e ULK2, além do fator de transcrição TFEB (*transcription factor EB*), o principal regulador da biogênese e função lisossomal, são alvos transcricionais da sinalização androgênica em PCa e a expressão deles é essencial para promover a proliferação mediada por androgênios. Além disso, a expressão aumentada desses genes em amostras de pacientes correlaciona com pior prognóstico e essa assinatura gênica correlaciona com a assinatura gênica de alvos transcricionais de AR em tumores metastáticos (BLESSING et al., 2016), sugerindo que esse subconjunto de genes relacionados à autofagia contribui para a progressão metastática da doença. Tragicamente, a autofagia também é regulada positivamente em resposta a privação androgênica, prevenindo a apoptose e possivelmente contribuindo para a resistência durante a ADT e progressão para CRPC (CHHIPA; WU; IP, 2011; LI et al., 2008).

Nesse cenário em que os tratamentos para PCa demonstraram eficácia limitada ou transitória e a autofagia potencialmente contribui para isso, a sua inibição genética ou farmacológica tem sido explorada em modelos pré-clínicos e clínicos. Os inibidores de autofagia são tipicamente classificados pelo estágio em que eles inibem o fluxo autofágico. Os inibidores do estágio inicial interferem na formação dos autofagossomos. Alternativamente, os inibidores da fase tardia têm como alvo a maturação, fusão aos lisossomos ou bloqueio da degradação lisossomal, como por exemplo a cloroquina, hidroxicloroquina e Bafilomicina A1, que bloqueiam o fluxo autofágico pela inibição da acidificação lisossomal e, com isso, impedem a degradação enzimática (YANG et al., 2011).

Os inibidores de fase tardia são os que têm demonstrado maior aplicabilidade clínica. A cloroquina e a hidroxicloroquina – aminos lisossomotrópicas tradicionalmente usadas no tratamento da malária e da artrite reumatoide – são fármacos baratos e têm perfis farmacocinéticos bem conhecidos, facilitando seu uso em ensaios clínicos (MANIC et al., 2014). Especificamente para PCa, esses fármacos têm sido empregados em estudos clínicos de fase I e II em tratamentos isolados ou combinados à ADT ou quimioterapia (FARROW; YANG; EVANS, 2014). Uma importante limitação desses tratamentos é que níveis micromolares são necessários para inibir completamente a autofagia e causar

impacto no crescimento das células tumorais. Porém, em pacientes, a administração oral resulta em níveis nanomolares e, embora a autofagia seja influenciada e resulte em benefício clínico em alguns casos, esse fator contribui para a eficácia limitada (KIMMELMAN; WHITE, 2017; ROSENFELD et al., 2014), destacando a importância da pesquisa de novos inibidores de autofagia com aplicabilidade clínica.

2 Vírus Epstein-Barr

O vírus Epstein-Barr (EBV) é oficialmente chamado *Human gammaherpesvirus 4* e classificado dentro do gênero *Lymphocryptovirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, família *Herpesviridae* e ordem *Herpesvirales* (International Committee on Taxonomy of Viruses – acesso em setembro de 2019). Outros membros bem conhecidos dessa família são os pertencentes à subfamília *Alphaherpesvirinae* (como *Human alphaherpesvirus 1* e *2* do gênero *Simplexvirus* e *Human alphaherpesvirus 3* do gênero *Varicellovirus*) e os pertencentes à subfamília *Betaherpesvirinae* (como *Human betaherpesvirus 5* do gênero *Cytomegalovirus*). Como o nome *Lymphocryptovirus* sugere, o EBV infecta células linfoides e estabelece latência em linfócitos B, sendo a latência uma característica importante dos herpesvírus, que são capazes de manter seus genomas em células hospedeiras por um período prolongado na ausência de produção de vírions.

A maioria dos hospedeiros soropositivos para o EBV libera vírus na saliva, sendo essa a principal fonte de transmissão. A orofaringe é o ponto de entrada para o EBV através da ligação do complexo imunoglobulina (Ig) A–EBV aos receptores de IgA nas células epiteliais, onde ocorre a replicação viral, disseminação e infecção de linfócitos B por meio da ligação da glicoproteína viral gp350 ao receptor CD21 dos linfócitos (FINGEROTH et al., 1984; SIXBEY et al., 1984). Após a penetração do vírus nos linfócitos B, o genoma linear é circularizado e permanece latente como epissoma.

O EBV foi descoberto em células de linfoma de Burkitt, mas logo se percebeu que a infecção pelo EBV é endêmica em todo o mundo e estima-se que mais de 90% da população mundial esteja infectada com o vírus. O primeiro contato de um indivíduo com EBV geralmente acontece na primeira década de vida e resulta, normalmente, em infecção

assintomática. A primo-infecção na adolescência ou na idade adulta é frequentemente acompanhada por uma doença linfoproliferativa conhecida como mononucleose infecciosa (GUIDRY; BIRDWELL; SCOTT, 2018).

Embora a maioria das infecções sejam assintomáticas, benignas ou bem controladas, o EBV foi o primeiro vírus oncogênico humano a ser descoberto. Estima-se que os vírus oncogênicos desempenham um papel etiológico no desenvolvimento de aproximadamente 12% dos casos de câncer, sendo o EBV responsável por mais de 200.000 casos de câncer a cada ano e que 1,8% de todas as mortes por câncer sejam atribuíveis ao EBV (KHAN; HASHIM, 2014). As principais neoplasias associadas ao EBV são linfomas de células B e carcinoma nasofaríngeo, refletindo os alvos celulares primários da infecção viral. O EBV está relacionado também a outras doenças de natureza linfocítica, tais como a doença de Hodgkin, linfoma de Burkitt e linfomas de células T e NK (*Natural killer*) (GEQUELIN et al., 2011), além de neoplasias de natureza epitelial, tais como leucoplasia pilosa oral e carcinoma gástrico (TSAO et al., 2015). Os mecanismos pelos quais o vírus promove o neoplasma incluem a ativação do programa de proliferação de células B, evasão imune e inativação de genes supressores tumorais (GUIDRY; BIRDWELL; SCOTT, 2018; RAAB-TRAUB, 2012).

2.1 Biologia molecular do EBV

A estrutura do virion do EBV consiste em um núcleo de proteína em forma de toróide envolvido com o DNA viral dentro de um capsídeo, um tegumento viral que reveste o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope externo. O genoma é composto por um DNA linear de cadeia dupla que codifica para mais de 85 genes. A maioria das proteínas codificadas pelo genoma do EBV está envolvida no metabolismo dos nucleotídeos, para manter a replicação do DNA viral e para construir os compartimentos estruturais do vírus, como o nucleocapsídeo, as proteínas tegumentares e o envelope (THOMPSON; KURZROCK, 2004). Posteriormente à infecção, ocorre a circularização do genoma viral, sendo então chamado de epissoma e, durante a infecção latente, o genoma viral persiste na forma de

vários epissemas circulares dentro do núcleo ou pode se integrar ao DNA cromossômico da célula infectada (DELECLUSE et al., 1993).

A infecção do EBV em células B suporta a fase de latência do ciclo e a persistência do vírus, sendo as células B de memória o reservatório viral vitalício. A infecção latente é caracterizada pela expressão limitada de um subconjunto de genes e a expressão inapropriada desses genes contribui para o desenvolvimento dos tumores associados ao vírus (THORLEY-LAWSON, 2001). O padrão de expressão dos genes virais de latência depende do tipo celular infectado ou do nível de diferenciação dos linfócitos B. Normalmente, de acordo com o padrão de expressão gênica, pode-se distinguir em quatro classes de latência, caracterizados por padrões de expressão gênica progressivamente restritivos, resultando do silenciamento da expressão de genes virais para evitar a eliminação por linfócitos T citotóxicos, como uma estratégia de evasão imune necessária para a persistência viral (THORLEY-LAWSON; GROSS, 2004).

Linfócitos B virgens infectados pelo EBV se tornam linfoblastos ativos, onde ocorre a expressão de todos os genes latentes relacionados à promoção do crescimento celular, conhecido como “latência III” ou programa de crescimento (Figura 4). Esse mesmo padrão de expressão acontece na desordem linfoproliferativa pós-transplante e na imortalização de linfócitos B *in vitro* (BOLLARD; ROONEY; HESLOP, 2012). Entre as proteínas do vírus expressas nessa fase estão os antígenos nucleares do EBV (EBNA1, 2, 3, 3A, 3B, 3C e LP), envolvidos na regulação transcricional de genes virais, e proteínas latentes de membrana (LMP1, 2A e 2B), que mimetizam a sinalização de CD40 e do receptor de célula B (BCR). Em conjunto, fornecem os sinais necessários para a ativação, proliferação e sobrevivência celular dos linfócitos B (KANG; KIEFF, 2015). Esses linfoblastos são altamente imunogênicos e são alvos de linfócitos T citotóxicos. Quando as células B infectadas pelo EBV entram nos folículos linfoides, ocorre a supressão da expressão das proteínas imunogênicas e somente quatro proteínas de latência são expressas (EBNA1, LMP1, LMP2A e LMP2B), conhecido como “latência II” ou programa padrão, permitindo que essas células infectadas sobrevivam. Ao dividirem-se, os linfócitos B deixam os centros germinativos dos folículos linfoides e o EBV persiste em uma fração das células com expressão apenas da proteína EBNA1 (latência I), necessário para a manutenção do epissona viral durante a divisão

celular, ou ausência total de expressão gênica (latência 0 – na população de linfócitos B de memória que não se dividem) (Figura 4) (DECKER; KLAMAN; THORLEY-LAWSON, 1996; HATTON et al., 2014).

Células infectadas pelo EBV podem, ocasionalmente, ser estimuladas para a ativação da replicação viral. Essa replicação, que resulta na produção de novos vírus, é conhecida como replicação lítica através do evento chamado de reativação (Figura 4). A ativação do ciclo lítico parece ocorrer em células B de memória que circulam através do tecido linfoide associado a mucosa orofaríngea. Embora muito se saiba sobre as vias moleculares envolvidas na reativação viral, o que a desencadeia *in vivo* não é bem compreendido. *In vitro*, o EBV em estado latente em células B pode ser reativado estimulando-se os receptores de célula B com anticorpos anti-imunoglobulina (TAKADA, 1984). Portanto, presume-se que a reativação *in vivo* pode ocorrer quando as células B infectadas respondem a infecções não relacionadas (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). A reativação do EBV também pode ser induzida, *in vitro*, por ésteres de forbol (ZUR HAUSEN et al., 1978), ionóforos de cálcio (FAGGIONI et al., 1986), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (RENZO et al., 1994) ou hipóxia (JIANG et al., 2006).

O estímulo que promove a reativação leva à expressão coordenada de três classes temporais de produtos de genes líticos: *immediate-early* (IE), *early* (E) e *late* (L). Primeiramente, em resposta ao estímulo de reativação, ocorre a expressão de dois genes IE, BZLF1 (Zta, Z, ZEBRA ou EB1) e BRLF1 (Rta, R ou EB2). Ambos os genes IE codificam ativadores transcricionais e induzem a expressão de genes E, tais como a subunidade catalítica da DNA polimerase BALF5, o fator de processividade da DNA polimerase BMRF1 ou EaD, a primase BSLF1, a helicase BBLF4, o complexo helicase/primase BBLF2/3 e a proteína de ligação a DNA de fita simples BALF2. Essas proteínas operam para a expressão dos genes L e, em conjunto com quinases dependentes de ciclina e isomerases do hospedeiro, atuam para a replicação do genoma viral em mais de 100 vezes. A replicação do epissoma viral ocorre pelo mecanismo de círculo rolante e intermediários da replicação são encontrados como grandes concatâmeros, que são subsequentemente clivados para, futuramente, serem empacotados nos vírions (MURATA, 2014).

A expressão de genes L, que codificam para proteínas estruturais, tais como proteínas do capsídeo e glicoproteínas, só inicia após a replicação do DNA viral. À medida que ocorre a clivagem do genoma viral em DNA linear, as estruturas icosaédricas de capsídeo incorporam o genoma viral, formando o nucleocapsídeo, que brotam da membrana nuclear e, no citoplasma, são envoltos por proteínas tegumentares e glicoproteínas e, finalmente, liberados como partículas virais maduras (MURATA, 2014).

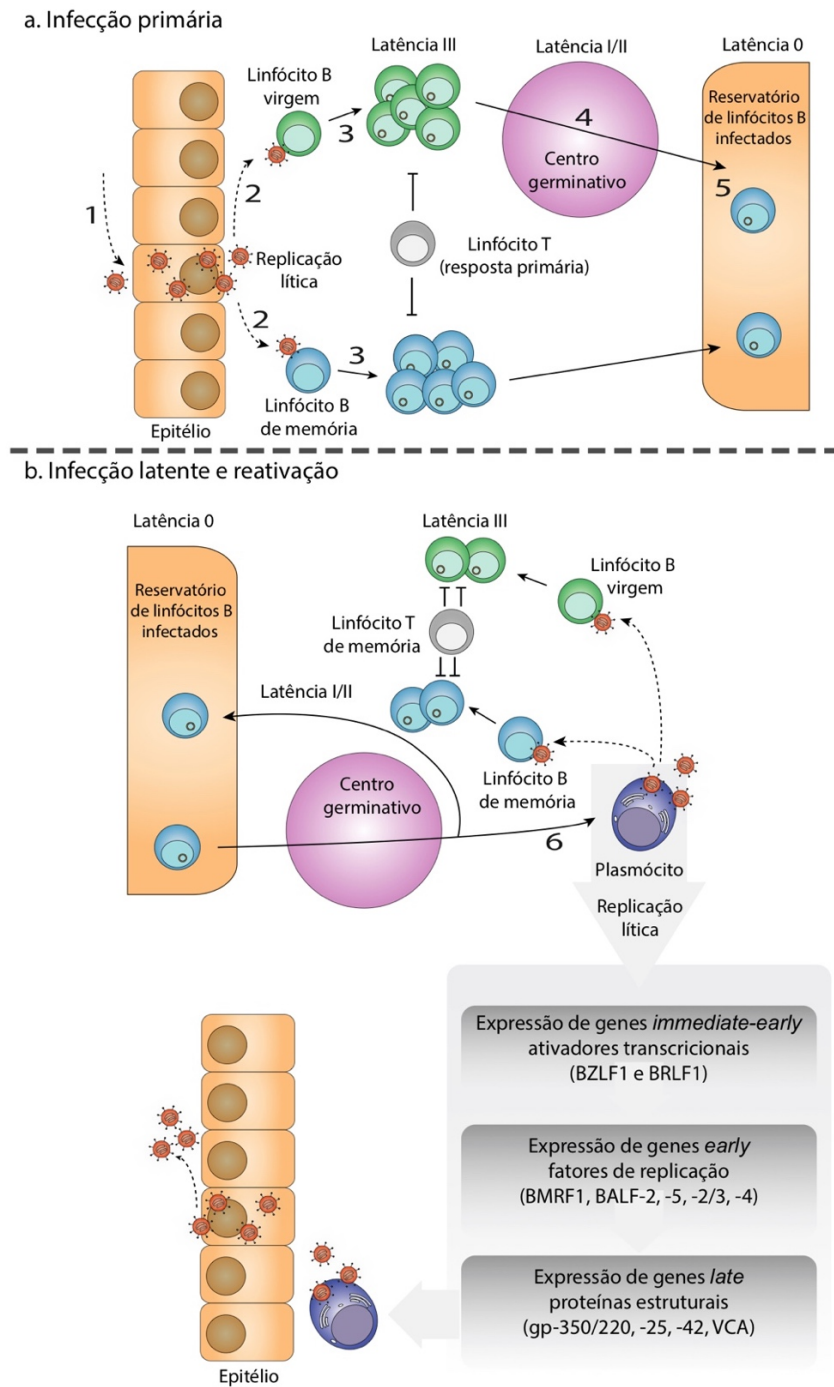


Figura 4 – Ciclo do EBV e interação com células do hospedeiro. O ciclo viral inclui pelo menos cinco estágios diferentes: (1) entrada, (2) infecção, (3) proliferação, (4) diferenciação, (5) persistência e (6) reativação. **a – infecção primária:** o vírus, transmitido pela saliva, estabelece um foco primário de replicação lítica no epitélio da mucosa da orofaringe, se espalha para tecidos linfoides e infecta linfócitos B. Durante a infecção primária, linfócitos B virgens infectados pelo EBV são transformados e iniciam a proliferação, expressando todos os genes de latência (latência III). Muitas dessas células, altamente imunogênicas, são removidas pela resposta primária de linfócitos T. O vírus regula negativamente a expressão gênica de proteínas imunogênicas e os linfócitos infectados entram nos folículos, expandem e formam centros germinativos, onde apenas três proteínas são expressas (latência II). Por fim, os linfócitos deixam os centros germinativos expressando apenas uma proteína viral (EBNA1, que assegura a replicação do genoma viral) (latência I) ou com supressão total de expressão (latência 0), estabelecendo um reservatório estável de células de memória infectadas. Uma hipótese alternativa prevê que a infecção de células de memória pré-existentes é uma rota direta para o estabelecimento do reservatório de células infectadas. **b – infecção latente e reativação:** o reservatório de linfócitos B de memória infectados pelo EBV fica sujeito ao controle fisiológico de diferenciação e migração de linfócitos B. Ocasionalmente, as células infectadas pelo EBV podem ser recrutadas aos centros germinativos em decorrência a infecções não relacionadas, o que implica na ativação de diferentes programas de latência, podendo reentrar no reservatório como células de memória ou se diferenciar em plasmócitos e reativar o ciclo lítico viral. Os vírus liberados infectam as células epiteliais da mucosa da orofaringe, onde realizam replicação lítica e são liberados na saliva, ou também podem iniciar novas infecções de células B virgens e/ou de memória, reabastecendo o reservatório de células B infectadas, porém são mais propensos a serem removidos pela resposta de células T de memória.

2.2 Patogênese e estratégias terapêuticas

Em contraste com a infecção frequentemente assintomática e estabelecimento da persistência viral em crianças, a infecção primária pelo EBV na adolescência ou vida adulta é acompanhada pela mononucleose infecciosa (MI) em metade dos casos, mas as razões para esses diferentes cursos da infecção primária não são compreendidas. Durante a MI, a compartimentalização das células B e T do tecido linfóide nas tonsilas palatinas é destruída devida à extensa proliferação de linfócitos B infectados com EBV e linfócitos T que respondem à infecção (KÜPPERS, 2003).

Em casos raros e com maior incidência na Ásia, indivíduos que se infectam com o EBV, ou reativam o EBV, desenvolvem uma doença que não se resolve e frequentemente é fatal. Alguns desenvolvem MI fulminante e morrem em dias ou semanas após a infecção primária. Outros são incapazes de controlar a infecção e desenvolvem um curso crônico, com sintomas persistentes ou intermitentes semelhantes à MI, infiltração de tecidos por células T ou NK e níveis elevados de EBV no sangue, chamada de infecção por EBV ativa crônica, provavelmente de etiologia genética e defeitos de resposta imune mediada por células T e NK (KIMURA; COHEN, 2017).

O controle imunológico contínuo é fundamental para prevenir a reativação do EBV e a transformação neoplásica. Isto é exemplificado claramente nos casos de transplantes de células tronco hematopoiéticas ou transplante de órgãos sólidos, em que a terapia imunossupressora é usada para controlar a rejeição do enxerto, aumentando a carga viral do EBV no sangue e na saliva (NIKOOBAKHT et al., 2011; RASCHE et al., 2014). Em pacientes transplantados, a perda do controle da proliferação linfocitária pode ser devida à reativação viral em um indivíduo soropositivo ou pode resultar da infecção pela exposição ao tecido do doador infectado em um indivíduo soronegativo. Independentemente da fonte, a imunossupressão pode levar o sistema imunológico a perder o controle da reativação viral, resultando na desordem linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) - um distúrbio fatal da proliferação descontrolada de células B (DHARNIDHARKA et al., 2016).

Vários medicamentos antivirais provaram ser inibidores eficazes da replicação do EBV, mas resultaram em sucesso clínico limitado, e nenhum deles recebeu a aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) ou da EMA (*European Medicines Agency*) para tratamento da infecção pelo EBV (ANDREI; TROMPET; SNOECK, 2019). Uma provável razão para o insucesso dos antivirais na terapia da MI pode ser atribuída ao fato de que os sintomas e sinais da doença não são consequências diretas da replicação viral, mas da resposta imunológica mediada por linfócitos T citotóxicos contra os linfócitos B infectados circulantes e infiltrados nos órgãos, o que resulta em diagnóstico e tratamento tardio, quando já não se pode mais prevenir as consequências da resposta imune, fazendo com que os sintomas da doença perdurem por até seis meses ou mais (PAGANO; WHITEHURST; ANDREI, 2018). Portanto, pode-se imaginar que o tratamento combinado de antivirais e

imunossupressores, como corticoides, possa ter um impacto positivo nessa fase da infecção. Embora essa seja uma prática médica frequente, estudos clínicos mostram que essa combinação não reduz as complicações da infecção nem a duração dos sintomas (THOMPSON; DOERR; HENGERER, 2005).

Os medicamentos antivirais atualmente disponíveis como candidatos para tratar infecções pelo EBV podem ser divididos em dois grupos, com base na capacidade de interferir ou não a DNA polimerase viral. Os análogos de nucleosídeos (aciclovir, penciclovir, ganciclovir e seus pró-fármacos valaciclovir, famciclovir, valganciclovir, respectivamente) e o análogo de nucleotídeo cidofovir possuem uma alta afinidade pela DNA polimerase viral, sendo incorporados durante a replicação viral e provocando a interrupção da síntese. O análogo de pirofosfato foscavir liga-se à DNA polimerase viral e bloqueia a clivagem de pirofosfato dos dNTPs, interrompendo a síntese do DNA (DE CLERCQ; LI, 2016). O segundo grupo inclui dois fármacos que não interferem na atividade da DNA polimerase. O composto BDCRB (1-H-β-d-ribofuranoside-2-bromo-5,6-dichlorobenzimidazole) inibe enzimas virais que promovem a clivagem dos concatâmeros de DNA viral, mas teve uso clínico abandonado por ser rapidamente inativado *in vivo* (UNDERWOOD et al., 2004). Maribavir, um derivado de BDCRB que teve uso aprovado no tratamento de infecção por citomegalovírus mas com atividade também demonstrada para EBV, atua inibindo a proteína cinase viral UL97 que, em última análise interfere na formação do capsídeo, embora admita-se que outros alvos ainda são desconhecidos (WANG et al., 2009). Nenhum desses tratamentos têm qualquer efeito sobre a infecção latente, pois o epissoma é replicado pelas enzimas do hospedeiro, mantendo um número estável de cópias através de gerações sucessivas, mesmo com a administração prolongada de antivirais (HOSHINO et al., 2009), tornando possível que as células em latência persistam e restaurarem a população de células infectadas.

Os oncogenes expressos durante a fase de latência do EBV, incluindo seis antígenos nucleares do EBV (EBNA) e três proteínas latentes de membrana (LMP), são os fatores mais bem caracterizados no desenvolvimento de tumores associados ao EBV. O efeito combinado dessas proteínas contribui para a transformação celular e carcinogênese através da indução da expressão de genes relacionados ao ciclo celular, inibição de

apoptose e supressão da imunidade mediada por linfócitos T (EL-SHARKAWY; AL ZAIDAN; MALKI, 2018; KÜPPERS, 2003).

Embora o potencial oncogênico do EBV esteja principalmente caracterizado para o papel das proteínas expressas durante a fase de latência, um conjunto crescente de evidências sugere que a replicação lítica do EBV também contribui direta e indiretamente para a carcinogênese associada ao EBV (LI et al., 2016). A ativação da replicação lítica promove a produção viral, levando ao aumento do número de células infectadas e também contribui para a transformação de linfócitos B *in vitro* (KATSUMURA; MARUO; TAKADA, 2012). Além disso, linfócitos B sob infecção viral lítica secretam fatores que promovem a proliferação de linfomas de células B *in vivo*, como o fator de crescimento de linfócito B interleucina 6 (IL-6) (JONES et al., 2007) e citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF- β) (CAYROL; FLEMINGTON, 1995; JOG et al., 2018). A ligação direta entre a expressão lítica e o desenvolvimento de linfomas foi demonstrada em estudos em que mutantes de EBV que não ativam a replicação lítica não promovem o desenvolvimento de doença linfoproliferativa, tanto em modelos de animais imunodeficientes (HONG et al., 2005a), quando em um modelo humanizado com resposta imune mediada por linfócitos T (MA et al., 2011).

Além da contribuição na tumorigênese de linfócitos B, em carcinomas de origem epitelial relacionados ao EBV a ativação do ciclo lítico parece ter maior contribuição do que a infecção latente. A reativação recorrente (FANG et al., 2009), a DNase viral BGLF5, classificada como uma proteína da fase E do ciclo lítico (WU et al., 2010) e BALF3, uma proteína homóloga da terminasse (CHIU et al., 2014, p. 3), promovem instabilidade genômica em células de carcinoma nasofaríngeo favorecendo a progressão tumoral. A secreção de fatores angiogênicos por linfócitos B (fator de crescimento do endotélio vascular [VEGF] e IL-8) (HONG et al., 2005b; HSU et al., 2008, p. 8) e de metaloproteinases (LU et al., 2003; YOSHIZAKI et al., 1999) pelas células tumorais também é induzida pela proteína Zta, ressaltando a atuação da ativação do ciclo lítico na invasão e metástase de carcinomas de origem epitelial. Outro gene expresso na fase E, BARF1, codifica uma oncoproteína homóloga do receptor de fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) e foi

mostrado inibir apoptose e contribuir na tumorigênese de carcinoma gástrico (WANG et al., 2006, p. 1) e nasofaríngeo (TAKADA, 2012, p. 1).

Devido ao papel do ciclo lítico do EBV na carcinogênese e a escassez de drogas seguras destinadas a suprimir a reativação viral e a expressão de proteínas líticas, tem crescido o interesse no desenvolvimento de terapias, especialmente que permitam o uso prolongado, para prevenir os estágios iniciais de doenças associadas ao EBV.

3 Reposicionamento de fármacos

Apesar dos avanços na identificação de novos alvos para intervenções terapêuticas em doenças humanas, não ocorre o acompanhamento do desenvolvimento e licenciamento de novos medicamentos. Os desafios enfrentados no desenvolvimento de novos tratamentos são múltiplos, sendo o principal deles as altas taxas de insucesso, o que contribui para os altos custos. Geralmente, o desenvolvimento de um novo medicamento leva um tempo na faixa de 10 a 16 anos, com uma taxa de sucesso de aprovação nos estudos clínicos, em média, menor de 10% (TAKEBE; IMAI; ONO, 2018). As altas taxas de insucesso são decorrentes principalmente da insuficiência de eficácia ou segurança, da toxicidade ou por razões estratégicas e comerciais das indústrias farmacêuticas (KOLA; LANDIS, 2004).

Esses problemas, aliados às pressões sobre os preços dos medicamentos e rigorosas barreiras regulatórias, impulsionaram a busca de novos usos e versões aprimoradas dos medicamentos já existentes. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos é uma estratégia para identificar novos usos para medicamentos aprovados ou em investigação que estão fora do escopo da indicação médica original (ASHBURN; THOR, 2004).

O reposicionamento de fármacos oferece várias vantagens sobre o desenvolvimento de um medicamento totalmente novo para uma determinada indicação. Primeiro, e talvez mais importante, o risco de insucesso é menor. Na maioria das vezes os medicamentos reposicionados já passaram por vários estágios de desenvolvimento clínico e, portanto, têm perfis de segurança e farmacocinéticos bem conhecidos. Em segundo lugar, o tempo mais curto para atingir o uso clínico é possível porque, em muitos casos,

vários estudos já foram concluídos e podem ser contornados, tais como triagens *in vitro* e *in vivo*, otimizações químicas, testes toxicológicos, fabricação em larga escala e desenvolvimento de formulações. Terceiro, menos investimento é necessário; embora isso varie muito dependendo do estágio e do processo de desenvolvimento do candidato ao reposicionamento, os custos regulatórios e de fase III podem permanecer os mesmos para um medicamento reposicionado mas pode haver economias substanciais nos custos pré-clínicos e nas fases I e II do estudo clínico (PUSHPAKOM et al., 2018).

Juntas, essas vantagens permitem que vários anos, riscos e custos sejam removidos do caminho para o mercado, resultando em uma melhor relação risco *versus* retorno. De fato, os custos de implementação de um fármaco reposicionado são estimados em US\$ 300 milhões em um tempo de 6 anos, em média, em comparação com um valor estimado de US\$ 2 a 3 bilhões e até 16 anos para um fármaco novo (NOSENGO, 2016).

Tipicamente, uma estratégia de reposicionamento de fármaco consiste em três etapas: identificação de uma molécula candidata para uma dada indicação (geração de hipóteses), avaliação do efeito da droga em modelos pré-clínicos e avaliação da eficácia em ensaios clínicos de fase II (partindo do princípio de que existem dados de segurança suficientes de estudos de fase I realizados como parte da indicação original). Dessas três etapas, a primeira – a identificação da molécula para uma indicação de interesse com um alto nível de confiança – é fundamental, e é esse ponto que tem ganhado grande interesse para o desenvolvimento de novas abordagens sistemáticas para geração de hipóteses (XUE et al., 2018).

As abordagens sistemáticas computacionais, biológicas experimentais ou baseadas em análises retrospectivas de dados clínicos têm identificado um número promissor de medicamentos candidatos ao reposicionamento, alguns dos quais estão em estágios avançados de ensaios clínicos, com o potencial de uso no tratamento de doenças comuns e raras (para as quais o reposicionamento é fundamental e, às vezes, a única via para o desenvolvimento de tratamentos) (PUSHPAKOM et al., 2018).

As abordagens experimentais para elucidar sistematicamente novas interações entre drogas e alvos se enquadram em três categorias. A primeira delas consiste em

determinar alvos celulares de ligação direta de drogas existentes. Um exemplo de utilização dessa abordagem consiste na lavagem de extratos de lisado celular em uma coluna fixada com a droga em investigação, e tal abordagem permitiu a identificação de proteínas alvo da ligação de Gefitinib (BREHMER et al., 2005). Por outro lado, as abordagens baseadas em ensaios celulares investigam drogas que induzem uma alteração desejada no fenótipo celular, como por exemplo triagens de alto rendimento para identificar fármacos de uso clínico aprovado capazes de modular autofagia (ZHANG et al., 2007), induzir apoptose (ANTCZAK et al., 2009) ou inibir a proliferação de células tumorais (ILJIN et al., 2009). A terceira abordagem usa a análise de expressão gênica para identificar fármacos que produzem um perfil de expressão gênica oposto ao de uma doença (LAMB et al., 2006), ou explora as similaridades de perfis de expressão em resposta a um dado tratamento para prever modos de ação e respostas a outras drogas (IORIO et al., 2010).

Dado o grande número de possíveis alvos proteicos e drogas existentes, as abordagens experimentais são inviáveis para testar todas interações possíveis. Nesse sentido, surgiram as abordagens computacionais, em grande parte baseadas em bancos de dados, envolvendo a análise sistemática de dados de qualquer tipo, tais como expressão gênica, estrutura química, genótipos ou dados proteômicos ou registros eletrônicos de estudos clínicos, que podem levar à formulação de hipóteses de reposicionamento (PUSHPAKOM et al., 2018). A maioria dos métodos usa a predição de alvos baseado na similaridade entre drogas (KEISER et al., 2009), proteínas (KINNINGS et al., 2009) ou fenótipos de efeitos colaterais (CAMPILLOS et al., 2008). Esses métodos hipotetizam que drogas com estruturas químicas parecidas ou que produzem efeitos colaterais semelhantes provavelmente terão alvos semelhantes. Nesse contexto, um método de maior resolução é o *docking* molecular, que simula a ligação de uma droga dentro de uma estrutura tridimensional alvo em um nível atômico. Essa técnica vem sendo amplamente utilizada para triar bibliotecas de estruturas químicas de drogas com capacidade de ligação a um alvo específico de interesse (KUMAR; KUMAR, 2019) ou, de maneira inversa, o “*docking* inverso”, que investiga os potenciais sítios de ligação de uma droga específica triando bancos de dados de proteínas (KHARKAR; WARRIER; GAUD, 2014).

Embora o avanço das abordagens computacionais, experimentais e suas utilizações sinérgicas tem permitido a identificação de um grande número de candidatos reposicionáveis, historicamente o reposicionamento de fármacos tem sido em grande parte oportunista e a maioria dos exemplos de sucesso até o momento não envolveram abordagens sistemáticas, mas foram identificados de maneira fortuita. Por exemplo, a talidomida, inicialmente prescrita às mulheres grávidas como sedativo e para prevenção de enjoo, sem ter passado por nenhuma aprovação regulatória, provocou defeitos congênitos de mais de 15000 crianças nascidas de mães que fizeram uso da talidomida durante o primeiro trimestre de suas gestações. Mais tarde foi descoberta acidentalmente e reposicionada para tratamento das lesões de eritema nodoso hansênico e para mieloma múltiplo (ANDERSON, 2001). O minoxidil (um fármaco que promove a abertura de canais de potássio), desenvolvido para o tratamento da hipertensão, foi aprovado pelo FDA para o tratamento de calvície masculina depois de uma análise clínica retrospectiva que identificou o crescimento de cabelo como um efeito adverso. Similarmente, a sildenafil (um inibidor da fosfodiesterase 5), inicialmente estudado para angina e hipertensão, foi o primeiro tratamento aprovado para disfunção erétil após análises de efeitos adversos em estudos clínicos de fase I (PUSHPAKOM et al., 2018). Algumas das estratégias ou modos como fármacos foram reposicionados e exemplos estão apresentados na figura 5.

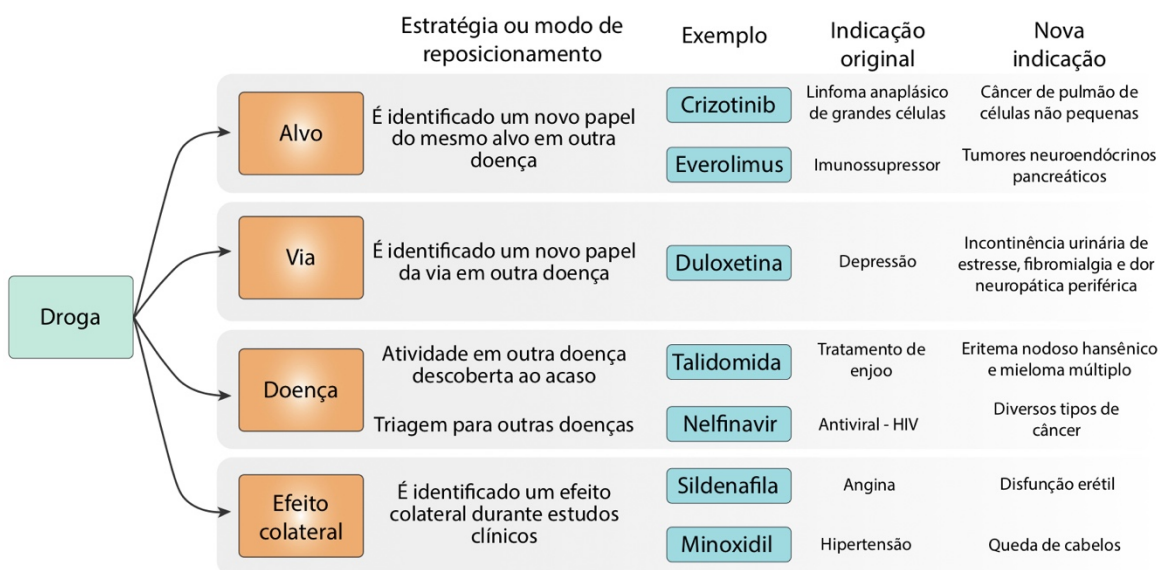


Figura 5 – Possíveis caminhos de reposicionamento de fármacos. A maioria dos fármacos reposicionados até o momento foram descobertos ao acaso em estudos pré-clínicos ou

através de observações de efeitos colaterais em estudos clínicos. Abordagens mais racionais envolvem a pesquisa de fármacos para modular a atividade de alvos ou vias específicas que são descritas como tendo participação em outras doenças.

3.1 Reposicionamento de fármaco em oncologia e doenças infecciosas virais

Em paralelo à crescente compreensão do câncer em nível molecular e genético e impulsionada pelo paradigma de terapias direcionadas, a indústria farmacêutica tem dedicado esforços para desenvolver com sucesso novos medicamentos oncológicos com direcionamento para alvos cada vez mais específicos, como enzimas, cinases ou inibidores de receptores de fatores de crescimento (BAUDINO, 2015). Apesar do enorme financiamento público e privado e do entusiasmo inicial com terapias direcionadas, grande parte dos resultados são desapontadores. As principais razões científicas para falhas repetidas de tais abordagens terapêuticas são atribuídas às abordagens reducionistas e números infinitos de mutações genéticas que contribuem para o desenvolvimento de resistência a essas terapias (MAEDA; KHATAMI, 2018). Somado a isso, o grupo de pacientes capazes de se beneficiar dessas terapias é relativamente pequeno em comparação com a população necessária para produzir um retorno sobre o investimento para trazer esse tipo de medicamento para a clínica e o aumento dos custos aos sistemas de saúde, decorrente do aumento da incidência de câncer, exerce pressão negativa sobre os preços e, conseqüentemente, o retorno sobre o investimento é menos garantido para as empresas farmacêuticas (PANTZIARKA et al., 2014).

Nesse contexto o reposicionamento de fármacos surgiu como uma alternativa de menor custo e visando a investigar fontes alternativas de terapias previamente inexploradas, com potencial de minimizar o baixo rendimento atual no desenvolvimento de medicamentos. Essa crise é particularmente importante na área de oncologia, na qual a taxa de sucesso de aprovação de novos fármacos para tratamento é de aproximadamente 5%, valor abaixo da metade se comparado à taxa média de sucesso para todas áreas terapêuticas, de aproximadamente 11% para o mesmo período de análise (KOLA; LANDIS, 2004). O reposicionamento em oncologia é especialmente importante para doenças refratárias às terapias de primeira linha existentes ou para as quais as terapias atuais são

limitadas, como a grande maioria dos tumores sólidos metastáticos (PANTZIARKA et al., 2014).

Uma prática comum em oncologia é a aplicação de medicamentos licenciados para uma indicação em outro tipo de câncer, sendo investigados em novas combinações, em novas formulações (por exemplo, formulações lipossômicas ou nanopartículas) ou em novos protocolos, um processo que tem sido chamado de "*soft repurposing*". Por outro lado e menos comum, o processo em que fármacos desenvolvidos originalmente fora do contexto oncológico são reposicionados para tratamento antitumoral tem sido chamado "*hard repurposing*" (PANTZIARKA; BOUCHE; ANDRÉ, 2018). Na busca por fármacos candidatos ao reposicionamento no contexto desta última categoria, surgiu o projeto "*The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project*" (acesso em <http://www.redo-project.org/>).

O projeto ReDO criou um bando de dados, continuamente em atualização, que reúne na sua última versão quase 300 fármacos candidatos ao reposicionamento (PANTZIARKA et al., 2018). Os fármacos promissores ao reposicionamento em oncologia apresentam uma série de características em comum:

- 1) São moléculas bem conhecidas, com longo histórico de uso clínico, muitas vezes já disponíveis como genéricos;
- 2) Possuem bom perfil toxicológico, com baixa toxicidade mesmo com uso crônico. O uso em protocolos metronômicos, isto é, o uso contínuo em baixa dosagem, diferente da quimioterapia em dose máxima tolerada, é visto como uma vantagem, mas não descarta o candidato se não puder ser usado em tal esquema;
- 3) Mecanismo de ação plausível. O que significa que uma droga não necessariamente precisa ser citotóxica, mas pode ter ação antiangiogênica ou ter como alvo componentes do microambiente tumoral;
- 4) Evidências de atividade antitumoral e evidências de eficácia na dosagem fisiológica. Em muitos casos a investigação pré-clínica que mostra eficácia utiliza dose ou via de administração não alcançável em pacientes, ou apenas atingível em doses com toxicidade significativa.

A identificação de novos alvos para intervenções terapêuticas em doenças infecciosas virais também não é acompanhada pelo desenvolvimento e licenciamento de novos medicamentos. No período de análise de mais de 50 anos, entre 1963 a 2016, apenas 90 fármacos foram formalmente aprovados para o tratamento de 9 doenças infecciosas virais (HIV, HBV, HCV, HCMV, HSV, HPV, RSV, VZV e vírus influenza) apesar do fato de que milhares de compostos antivirais têm sido propostos na literatura e mais de 200 vírus foram descobertos (DE CLERCQ; LI, 2016). Além dos vírus reconhecidamente alvos de terapias antivirais ou vacinas, um grande número de doenças infecciosas emergentes e reemergentes, sem qualquer tratamento licenciado, continuam afetando milhões de pacientes.

Além de todas as vantagens já mencionadas, os estudos de reposicionamento representam uma fonte constante de novos conhecimentos em virologia, assim como moléculas com propriedades antivirais anteriormente não descritas podem ser usadas como ferramentas na descoberta de mecanismos moleculares de replicação e patogênese viral. Em muitos casos, estudos de reposicionamento apontam vias celulares anteriormente inexploradas, transformando-as em alvos para novas estratégias terapêuticas. Esse caso é exemplificado pelo estudo de reposicionamento que identificou a atividade do fármaco antitumoral imatinib na inibição da replicação de coronavírus (DYALL et al., 2014) e posteriormente a identificação da via da proteína Abelson (ABL) tirosina cinase como essencial para a entrada do vírus nas células (COLEMAN et al., 2016).

Podem ser definidos três cenários diferentes de reposicionamento para terapias antivirais, dependendo se a molécula investigada tem atividade antiviral previamente conhecida:

- 1) Mesmo alvo – novo vírus: quando um fármaco possui como alvo uma função viral ou celular conhecida e é identificada atividade contra outros vírus. A atividade antiviral depende de homologia estrutural e características enzimáticas comuns do alvo viral ou de vias celulares compartilhadas exploradas para replicação de vírus.
- 2) Mesmo alvo – nova indicação: quando um alvo farmacológico (isto é, uma proteína ou uma via que pode ser modulada por um fármaco aprovado) é considerado essencial num processo patogênico associado a uma infecção viral. Neste caso, o

fármaco aprovado pode ser explorado também como agente terapêutico antiviral (nova indicação).

- 3) Novo alvo – nova indicação: quando um fármaco aprovado com atividade estabelecida em uma via ou mecanismo específico apresenta um novo alvo molecular que é essencial para a replicação do vírus, isto é, um fármaco que apresenta polifarmacologia – capacidade de uma droga ou fármaco de atuar em múltiplos alvos. Pode estar relacionado a efeitos tóxicos ou colaterais da molécula, representando importante potencial para o reposicionamento.

Moléculas com potencial de reposicionamento contra doenças virais têm sido identificadas a partir de bibliotecas de pequenas moléculas, tanto aprovadas quanto em desenvolvimento, e outros compostos com bioatividade conhecida, incluindo compostos de origem natural, através de ensaios de triagem fenotípica ou *in silico* (GARCÍA-SERRADILLA; RISCO; PACHECO, 2019; JOHANSEN et al., 2015). Quando são conhecidos os mecanismos virais ou a via celular que suporta a replicação, é possível utilizar a abordagem de reposicionamento baseada no mecanismo, investigando drogas que tem tal mecanismo como alvo, frequentes enzimas ou receptores virais ou celulares. Nesse sentido, a busca por candidatos ao reposicionamento tem visado a essas abordagens dando prioridade a fármacos com eficácia em ensaios clínicos ou pré-clínicos com concentrações eficazes compatíveis com níveis plasmáticos clinicamente alcançáveis em humanos (MERCORELLI; PALÙ; LOREGIAN, 2018).

3.2 Dipiridamol

Em 1951, a partir de uma nova estrutura resultante da fusão de dois anéis de pirimidina, vários compostos foram sintetizados usando essa estrutura básica. Um desses compostos, quando testado farmacologicamente em animais, mostrou efeito na circulação coronariana, promovendo vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, sem efeito significativo em vasos periféricos ou na pressão arterial (DEGRAFF; LYON, 1963). Esse composto recebeu o nome dipiridamol, devido aos dois anéis parentais de pirimidina. O

dipiridamol, sob o nome comercial Persantin, foi introduzido na clínica na década de 1960 como um vasodilatador coronário (WIRECKI, 1967).

Em vista do efeito vasodilatador coronário, a indicação inicial do dipiridamol foi para tratamento da angina e prevenção de infarto do miocárdio. Porém, estudos clínicos subsequentes mostraram resultados controversos, sem melhora significativa do tratamento comparado ao tratamento placebo ou ausência de evidências claras de que a terapia combinada com aspirina era mais eficaz que o tratamento isolado. Com isso, em 1988, o Comitê de Revisão de Medicamentos decidiu que não havia evidências suficientes para continuar tais indicações para o dipiridamol (GIBBS; LIP, 1998). No entanto, o dipiridamol injetável continua tendo indicação licenciada, inclusive no Brasil pela Anvisa, como auxiliar em testes diagnósticos, no teste ergométrico e na ecocardiografia para avaliar a circulação nas artérias coronárias e, por mimetizar e ser tão eficaz quanto os efeitos de esforço físico, é usado particularmente como alternativa para pacientes que não podem realizar exercício adequadamente (VIDAL et al., 2015).

Os efeitos antiplaquetários do dipiridamol foram demonstrados em animais e humanos, e desde então, tem sido atribuído como um agente antitrombótico (KIM; LIAO, 2008). As propriedades biológicas do dipiridamol que promovem vasodilatação e inibição da formação de trombos são atribuídas a dois mecanismos de ação complementares: inibição de fosfodiesterases (PDEs), em especial PDE5 e PDE6 (GRESELE; MOMI; FALCINELLI, 2011) e bloqueio de transportadores de nucleosídeos (HARKER; KADATZ, 1983; KNABB et al., 1984). Em razão da relevância nesse trabalho da inibição do transporte de nucleosídeos pelo dipiridamol e do envolvimento no metabolismo de nucleotídeos, esse tema será abordado em maiores detalhes a seguir.

Por inibir transportadores de nucleosídeos das plaquetas e das células sanguíneas e endoteliais, o dipiridamol inibe a captação de adenosina, levando ao aumento da sua concentração plasmática em 60% (GERMAN; KREDICH; BJORNSSON, 1989), que por sua vez ao ativar receptores de adenosina (AR) das plaquetas, incluindo os receptores A₂AR, estimula a adenilato ciclase, aumentando a transformação de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Figura 6). Concomitantemente, ao inibir PDEs, o dipiridamol bloqueia a degradação de cAMP e guanosina monofosfato cíclico (cGMP). O

acúmulo de cAMP promove a redução dos níveis citoplasmáticos de cálcio nas plaquetas, inibindo a ativação e agregação (JAFFER; WEITZ, 2018). O acúmulo de cGMP nas células endoteliais vasculares promove o aumento dos efeitos da sinalização de óxido nítrico (AKTAS et al., 2003) e o aumento da liberação de prostaciclina (NERI SERNERI et al., 1981), os principais fatores derivados do endotélio para prevenir adesão e agregação plaquetária e promover vasodilatação (KIM; LIAO, 2008).

Dado o papel central da agregação plaquetária em doenças tromboembólicas, as principais indicações do dipiridamol têm sido para essas complicações, tal como o uso na profilaxia de tromboembolismo associado às próteses de válvulas cardíacas ou à aterosclerose grave (GIBBS; LIP, 1998). No contexto de prevenção secundária de doenças cerebrovasculares, a combinação de dipiridamol de liberação prolongada com aspirina em baixas doses (Aggrenox) tem seu uso licenciado pelo FDA, baseado no estudo clínico que mostrou que a tal combinação é mais que duas vezes mais efetiva que os tratamentos isolados para reduzir o risco de acidente vascular cerebral em pacientes que tiveram isquemia cerebral transitória ou acidente vascular cerebral isquêmico devido a trombose (DIENER et al., 1996).

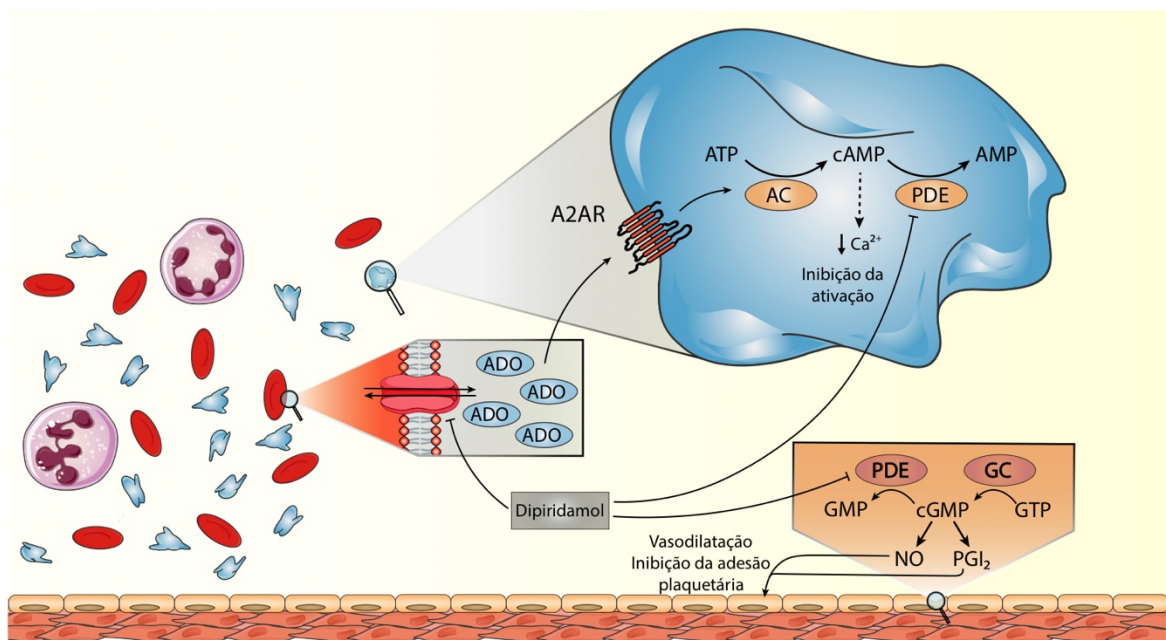


Figura 6 – Mecanismo de ação do dipiridamol como agente antitrombótico. O dipiridamol previne a captação de nucleosídeos de células sanguíneas por inibir os transportadores equilibrativos de nucleosídeos (ENTs), promovendo o aumento da concentração plasmática de adenosina, a qual estimula os receptores de adenosina. Nas plaquetas, essa estimulação promove a ativação da adenilato ciclase (AC) e aumento da produção de cAMP. Concomitantemente, o dipiridamol inibe fosfodiesterases (PDE), levando ao aumento da concentração de cAMP, levando a redução da contração de cálcio citoplasmático e inibindo a ativação plaquetária. No endotélio vascular, a inibição de fosfodiesterases leva ao acúmulo de cGMP, aumentando os efeitos do óxido nítrico (NO) e a produção de prostaciclina (PGI₂), promovendo inibição da adesão plaquetária e vasodilatação.

Além de efeitos antiplaquetários, o dipiridamol possui outras propriedades benéficas na vasculatura, direta ou indiretamente. A estrutura molecular do dipiridamol permite que ele aceite elétrons, funcionando assim como um removedor de radicais livres e antioxidante. Esse efeito pode prolongar a meia-vida e aumentar a biodisponibilidade do óxido nítrico derivado do endotélio, que é protetor vascular (KIM; LIAO, 2008). Servindo como sequestrador de radicais livres derivados do oxigênio, o dipiridamol previne a peroxidação de lipídios de membranas bem como a oxidação de lipoproteína de baixa densidade, podendo prevenir lesões iniciais de aterosclerose ou de outras condições patológicas desencadeadas ou agravadas por desequilíbrios redox (CIACCIARELLI et al., 2015).

Com uma longa história de aplicações bem-sucedidas em vários campos da medicina, o dipiridamol tem um registro de segurança estabelecido. Potenciais complicações e efeitos colaterais desse fármaco são bem conhecidos e documentados. Geralmente, a administração oral de dipiridamol é bem tolerada, embora queixas gastrointestinais, cefaléia, rubor facial, tontura e hipotensão podem ocorrer. Sintomas cardiovasculares, como angina e isquemia, têm sido os efeitos adversos mais frequentemente relatados associados à administração por via intravenosa (JAFFER; WEITZ, 2018).

Em razão do seu perfil farmacológico, o reposicionamento do dipiridamol para outras indicações tem sido investigado em estudos pré-clínicos e clínicos com o objetivo de

avaliar a eficácia, formulações e segurança de diferentes vias de administração. Os alvos reconhecidos do dipiridamol estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de distúrbios oculares e o dipiridamol tem demonstrado benefícios em modelos pré-clínicos de retinopatia da prematuridade e hipertensão ocular através de aplicação tópica, sem complicações ou efeitos adversos, e em estudos clínicos no tratamento de pterígio, retinopatia diabética e distúrbios vasculares da retina (ROGOSNITZKY et al., 2016). Em um teste de triagem de 1280 compostos aprovados pelo FDA com o objetivo de encontrar candidatos ao reposicionamento para tratamento de fibrodisplasia ossificante progressiva, o dipiridamol foi o fármaco que apresentou melhor eficácia na inibição da diferenciação condrogênica e osteogênica *in vitro* e em modelo animal (CAPPATO et al., 2016).

O potencial antiviral do dipiridamol foi avaliado em modelo *in vitro* (TENSER; GAYDOS; HAY, 2001) e *in vivo* (HAY; GAYDOS; TENSER, 1996) de *Human alphaherpesvirus 1* do gênero *Simplexviru*, onde o mecanismo envolvido na inibição da reativação não foi explorado. Além disso, em um tratamento combinado, o dipiridamol potencializou a atividade antiviral dos análogos de nucleosídeos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 em um modelo *in vitro* (SZE BENI et al., 1989), com evidências sugerido que o efeito potencializador é decorrente da inibição da captação de nucleosídeos fisiológicos que competem pela ligação com os fármacos análogos de nucleosídeos (PATEL et al., 1991).

3.2.1 Transporte de nucleosídeos e metabolismo de nucleotídeos

Os nucleosídeos naturais de pirimidina e purina, e seus derivados, desempenham papéis críticos na fisiologia de organismos procarióticos e eucarióticos, atuando como precursores metabólicos na síntese de ácidos nucléicos, como principais elementos do metabolismo energético e como ligantes para receptores purinérgicos (BOSWELL-CASTEEL; HAYS, 2017). Análogos de nucleosídeos e de nucleotídeos também representam importantes classes de terapias antineoplásicas e antivirais (JORDHEIM et al., 2013).

Duas classes de transportadores de nucleosídeos medeiam o seu transporte através das membranas celulares: transportadores equilibrativos de nucleosídeos (ENTs, família SLC29) (esses serão abordados em maiores detalhes por serem alvos do dipiridamol) e

transportadores concentrativos de nucleosídeos (CNTs, família SLC28) (YOUNG et al., 2013). Os membros das famílias CNT e ENT são proteínas integrais de membrana não relacionadas estruturalmente e com especificidades de substrato sobrepostas. Os CNTs promovem o transporte unidirecional, do meio extra para o intracelular, e requerem um acoplamento dependente de sódio ou dependente de próton para o transporte (GRAY; OWEN; GIACOMINI, 2004) e aparentemente suas funções estão envolvidas principalmente na detecção dos níveis de nucleosídeos e integração de sinais da sinalização purinérgica (PASTOR-ANGLADA; PÉREZ-TORRAS, 2018).

Em contraste, os ENTs são caracterizados pelo transporte passivo e bidirecional de nucleosídeos e possuem papel na manutenção da homeostase dos nucleosídeos. Dentre os quatro membros da família, originalmente classificados de acordo com a sensibilidade ao tratamento com NBMPR (Nitrobenzylthionosine ou NBTI), os que estão melhor caracterizados são ENT1 e ENT2 (BALDWIN et al., 2004). Ambos apresentam especificidades de substrato semelhantes, transportando uma ampla gama de nucleosídeos de purina e pirimidina, diferindo pelo fato que apenas ENT2 é capaz de transportar nucleobases. O ENT3 é um transportador lisossomal e funciona como um transportador dependente do pH, enquanto que ENT4 funciona principalmente como um transportador de adenosina na membrana plasmática (WANG et al., 2013). Vários compostos foram demonstrados inibir diferentemente ENTs, dentre eles o dipiridamol, que inibe, nessa ordem de eficiência, ENT1, ENT2 (não inibido por NBMPR) e ENT4 (BOSWELL-CASTEEL; HAYS, 2017; WANG et al., 2013).

A captação de nucleosídeos extracelulares através de ENTs também desempenha função importante no metabolismo de nucleotídeos. A biossíntese de nucleotídeos de purina e pirimidina em células de mamíferos se dividem em duas categorias: vias *de novo* e vias de salvamento de nucleosídeos. A via *de novo* utiliza glicose, aminoácidos e bicarbonato para gerar ribonucleotídeos, classicamente utilizados para a síntese de RNA, armazenamento de energia e transdução de sinal (EVANS; GUY, 2004). Uma fração do pool celular de ribonucleotídeos é convertida em desoxirribonucleotídeos (dNTPs), utilizados para a síntese de DNA, por enzimas ribonucleotídeo redutases (FAIRMAN et al., 2011). Os ENTs presentes na membrana plasmática das células permitem a reciclagem de

nucleosídeos e nucleobases extracelulares através da via de salvamento de nucleosídeos (GIRKE et al., 2014). Uma vantagem clara dessa rota de síntese de nucleotídeos é o menor gasto energético, já que cinco das doze reações de síntese *de novo* de nucleotídeos de purina requerem hidrólise de ATP ou GTP, em comparação com apenas uma reação da via de salvamento que requer ATP (MOFFATT; ASHIHARA, 2002). Detalhamentos bioquímicos das vias sintéticas de nucleotídeos *de novo* e pela via de salvamento estão além dos objetivos desse trabalho e podem ser encontradas em revisões sobre o assunto (GIRKE et al., 2014; LANE; FAN, 2015).

A capacidade dos ENTs para regular o fluxo de nucleosídeos e seus análogos e, em alguns casos, nucleobases possui implicações terapêuticas. A adenosina é de particular interesse devido aos seus efeitos na sinalização purinérgica em diversas condições fisiológicas e patológicas (BURNSTOCK, 2018), conforme já exemplificado anteriormente no contexto da terapia com dipiridamol. Os ENTs também estão envolvidos na eficácia de uma grande variedade de fármacos usados para o tratamento de doenças neoplásicas (gemcitabina, citarabina, 5-fluorouracil), cardiovasculares (nifedipina, dilazep, dipiridamol) e virais (ribavirina, azidotimidina), por exemplo (BOSWELL-CASTEEL; HAYS, 2017). A via de salvamento de nucleosídeos é o principal contribuinte para a resistência a quimioterápicos antimetabólicos que interferem na síntese *de novo* de nucleotídeos (KINSELLA; SMITH, 1998). Nesse sentido, a fim de inibir a via de salvamento de nucleosídeos, o dipiridamol já foi explorado *in vitro* e *in vivo* em combinações para aumentar a citotoxicidade de tais tratamentos, como metotrexato (NELSON; DRAKE, 1984), 5-fluorouracil (GREM; FISCHER, 1989) e gencitabina (MACKAY et al., 1998). Porém alguns estudos demonstram que o mecanismo de sinergismo não pode ser completamente explicado do ponto de vista do bloqueio da via de salvamento e propõem que existe um mecanismo de citotoxicidade inexplorado (BOYER et al., 2002; GREM; FISCHER, 1989).

Hipóteses

Hipótese I

Em estudos preliminares de avaliação da modulação da autofagia mediada pela captação de adenosina extracelular, encontramos, ao acaso, alterações de marcadores autofágicos em células tratadas com dipiridamol. Baseado no fato que dados da literatura sugerem a existência de um mecanismo de toxicidade do dipiridamol independente da inibição do transporte de nucleosídeos e via de salvamento, a hipótese I desse trabalho é que o dipiridamol poderia modular a autofagia em células tumorais através da inibição de transportadores de nucleosídeos ou pela inibição de fosfodiesterases, os dois alvos moleculares descritos desse fármaco.

Hipótese II

A replicação viral depende do aporte de nucleotídeos da célula hospedeira, sintetizados *de novo* ou provenientes de vias de salvamento de nucleosídeos e nucleobases extracelulares. Diante disso, a hipótese II desse trabalho é que a inibição da captação de nucleosídeos com dipiridamol pode representa um alvo terapêutico antiviral em um modelo de EBV.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a modulação da autofagia pelo dipiridamol em células tumorais de próstata e a atividade antiviral em um modelo de Vírus Epstein-Barr, visando à aplicação terapêutica como estratégia de reposicionamento de fármaco.

Objetivos específicos

- I. Investigar a modulação de autofagia pelo dipiridamol e identificar o mecanismo;
- II. Avaliar as consequências da modulação de autofagia causada pelo dipiridamol em *modelos in vitro* de câncer de próstata;
- III. Investigar a importância da captação de nucleosídeos na reativação e replicação de Vírus Epstein-Barr;
- IV. Avaliar o potencial terapêutico antiviral da inibição da captação de nucleosídeos na célula hospedeira de Vírus Epstein-Barr.

CAPÍTULO II

Manuscrito I

Dipyridamole impairs autophagic flux and exerts antiproliferative activity on prostate cancer cells

Artigo publicado no periódico Experimental cell research

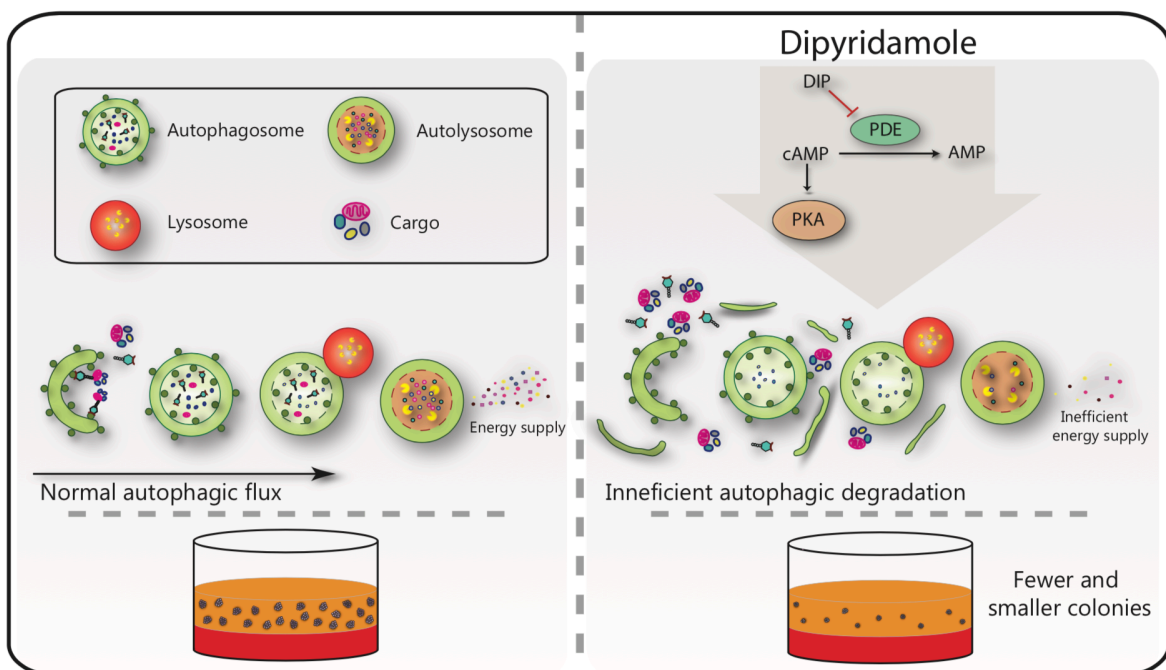
Dipyridamole impairs autophagic flux and exerts antiproliferative activity on prostate cancer cells

Marcos P. Thomé, Luiza C. Pereira, Giovana R. Onzi, Francieli Rohden, Mariana Ilha, Fátima T. Guma, Márcia R. Wink, Guido Lenz

Highlights

- Dipyridamole blocks autophagic flux
- Dipyridamole leads to the accumulation of double-membrane structures, resembling failure in autophagosome maturation and/or closure
- Dipyridamole treatment has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes cancer cells to antineoplastic treatments

Graphical abstract





Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr

Dipyridamole impairs autophagic flux and exerts antiproliferative activity on prostate cancer cells



Marcos P. Thomé^a, Luiza C. Pereira^a, Giovana R. Onzi^a, Francieli Rohden^b, Mariana Ilha^b, Fátima T. Guma^{b,e}, Márcia R. Wink^d, Guido Lenz^{a,c,*}

^a Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil

^e Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Dipyridamole
Autophagy
Autophagic flux blockage
Autophagosome maturation impairment
Cancer biology
Drug repurposing

ABSTRACT

Autophagy is a cellular bulk degradation process used as an alternative source of energy and metabolites and implicated in various diseases. Inefficient autophagy in nutrient-deprived cancer cells would be beneficial for cancer therapy making its modulation valuable as a therapeutic strategy for cancer treatment, especially in combination with chemotherapy. Dipyridamole (DIP) is a vasodilator and antithrombotic drug. Its major effects involve the block of nucleoside uptake and phosphodiesterase inhibition, leading to increased levels of intracellular cAMP. Here we report that DIP increases autophagic markers due to autophagic flux blockage, resembling autophagosome maturation and/or closure impairment. Treatment with DIP results in an increased number of autophagosomes and autolysosomes and impairs degradation of SQSTM1/p62. As blockage of autophagic flux decreases the recycling of cellular components, DIP reduced the intracellular ATP levels in cancer cells. Autophagic flux blockage was neither through inhibition of lysosome function nor blockage of nucleoside uptake, but could be prevented by treatment with a PKA inhibitor, suggesting that autophagic flux failure mediated by DIP results from increased intracellular levels of cAMP. Treatment with DIP presented antiproliferative effects *in vitro* alone and in combination with chemotherapy drugs. Collectively, these data demonstrate that DIP can impair autophagic degradation, by preventing the normal autophagosome maturation, and might be useful in combination anticancer therapy.

1. Introduction

To maintain homeostasis and adapt to new physiological conditions, cells exploit mainly two subcellular degradative mechanisms, the ubiquitin proteasome pathway (UPP) and autophagy [1]. The former selectively eliminates abnormally folded or damaged proteins that have been tagged with ubiquitin (Ub) [2]. By contrast, macroautophagy (henceforth referred to as ‘autophagy’) involves the formation of cytosolic double-membrane vesicles that isolate portions of the cytoplasm and has the capacity to degrade folded proteins, protein complexes and entire organelles [3,4].

Autophagy is a dynamic process constituted by a succession of steps leading to the formation of autophagosomes. After fusion with lysosomes, the enclosed cargo material of the resulting autolysosome is

degraded by hydrolases [3]. The resulting monomers of the autophagy-mediated degradation process are released back to the cytosol to provide intracellular energy sources [5]. Autophagy occurs as a cellular response to both extracellular stress conditions (e.g. nutrient starvation, hypoxia, overcrowding, high temperature) and intracellular signals (e.g. accumulation of damaged or superfluous organelles and cytoplasmic components) and allows cells to survive the stressful environment by recycling [4].

The dynamic process of autophagy, termed ‘autophagic flux’, includes the delivery of cargo to lysosomes, the breakdown of cargo, and the release of molecules back to the cytosol. Although autophagy has been considered to be a nonselective, bulk process, increasing evidence indicates that autophagy is a more selective process than originally thought [6]. The recognition of ubiquitinated substrates is mediated by

* Corresponding author. Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Avenida Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431–Lab. 115, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

URL: <http://lenz@ufrgs.br> (G. Lenz).

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.001>

Received 17 December 2018; Received in revised form 24 May 2019; Accepted 2 June 2019

Available online 11 June 2019

0014-4827/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

molecular adaptors, including p62, also known as sequestosome 1 (SQSTM1), that simultaneously bind to ubiquitin (via their Ub binding domain) and to autophagosome-specific proteins, such as microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 (LC3A, LC3B and LC3C), anchored to the autophagosome, by means of an LC3-interacting region (LIR). The starting point of the cargo loading is most probably] the p62 self-oligomerization via its *N*-terminal Phox and Bem1p (PB1) domain [7,8] which is sufficient to bend the membrane around the cargo.

Cancer cells have the capability to withstand stressful conditions and autophagy enable survival by catabolic degradation to maintain energy production, sustaining cellular metabolism, leading to tumor growth and therapeutic resistance, thus making autophagy modulation therapeutically valuable [9,10]. The better understanding of the ability of autophagy to sustain tumor progression has increased efforts aimed at the development of autophagy inhibitors for cancer therapy, through the suppression of autophagy in combination with other conventional chemotherapeutics, as a way to potentiate their effectiveness [11,12]. Nevertheless, the only autophagy inhibitors clinically tested, either alone or in combination therapy, are the anti-malarial chloroquine and its derivatives, such as hydroxychloroquine [13]. Both can increase lysosomal pH, therefore preventing lysosomal hydrolases from degrading and recycling the cargo entrapped in the autophagosome, potentiating various anticancer therapies in numerous preclinical investigations [14,15], although pharmacodynamics studies indicate that autophagy inhibition is not consistently achieved *in vivo* [16,17]. Thus, novel autophagic modulators with low toxicity hold great potential for the management of cancer, as a means to sensitize malignant cells to therapy.

Dipyridamole (DIP) (Persantine) is a pyrimidopyrimidine derivative known to inhibit the uptake of extracellular adenosine by blocking the cell surface nucleoside transporters, such as equilibrative transporters (ENTs) [18]. DIP is a safe drug, and has favorable and broad pharmacological properties, which have enabled its use for a long time to prevent strokes and other vascular diseases due to its antiplatelet and vasodilatation properties [19,20]. The mechanism of action of DIP also involves an increase in intracellular cAMP (cyclic adenosine monophosphate), through non-selective phosphodiesterase (PDEs) inhibition and/or blockade of uptake of adenosine by blood cells, which increases adenosine plasma concentration and leads to activation of adenosine A_2 receptors to stimulate platelet adenylyl cyclase and thus increase cAMP [21]. Recent evidence points to cAMP and cAMP-activated protein kinase A (PKA) pathway as novel regulators of autophagy, but the mechanisms of PKA regulation and how they relate to autophagy are not fully understood [22,23]. DIP inhibits autophagy induction by extracellular ATP in cervical cancer cells [24], but the mechanism of autophagy modulation and their impact on cancer cell survival is still unknown, and their description could contribute to the use of this drug in modulating autophagy to improved chemotherapy treatments.

2. Results

2.1. Dipyridamole induces the accumulation of autophagic markers

Autophagy-modulating agents can impact the response of cancer to different types of therapy [25]. To investigate the effects of DIP in the autophagic pathway, we first analyzed PC-3 cells stably expressing the tandem-fluorescent protein-tagged LC3 (mCherry-GFP-LC3), hereafter described as PC-3 tFLC3, treated with DIP combined or not with the autophagy inducers Rapamycin or nutrient starvation. As expected, the induction of autophagic flux by Rapamycin significantly increased the area of both yellow dots (i.e. autophagosomes) and red dots (i.e. autolysosomes) and the combined treatment with DIP further increased the area of both yellow and red dots (Fig. 1A). The effect of DIP on starved cells was more prominent on the area of yellow dots, suggesting an imbalance in the progression of the autophagic flux under this condition (Fig. 1B). To further characterize the impact of DIP, we

analyzed DIP-induced changes in the level of acidic vesicular organelles (AVOs) by acridine orange staining, which increases when autophagic flux is induced [26]. PC-3 cells were treated with DIP for 3, 6, 24 or 48 h. As depicted in Fig. 1C (top), the treatment of PC-3 cells with 10 μ M DIP for 24 and 48 h resulted in an increase in the percentage of cells with increased levels of acidic organelles from 6.5% in control to 17.0 and 20.0%, respectively, which may be mediated by the lysosome acidification induced by cAMP [27]. As a control, we treated cells with BafA1, a proton V-ATPase inhibitor, which increases the lysosome pH. As expected, BafA1 reduced the red-to-green fluorescence intensity ratio (R/GFIR) of AO-stained cells, represented by the reduction in the percentage of cells that surpass the threshold (Fig. 1C, bottom). Taken together, these results showed that DIP treatment leads to an accumulation of autophagosomes and autolysosomes under increased autophagic flux induced by rapamycin and starvation.

2.2. Dipyridamole impairs autophagic degradation

The amount of autophagic structures in the cell can be increased by two main mechanisms: increased activation of autophagy by upstream process or blockade in the maturation or degradation step. To distinguish between these mechanisms, we assessed the effect of dipyridamole on autophagy by determining LC3-I to LC3-II conversion and SQSTM1/p62 protein levels. The cytoplasmic form of LC3B-I (16 kDa), is processed during autophagy to LC3B-II (14 kDa) through a site-specific conjugation with phosphatidylethanolamine, leading to its recruitment to the autophagosome membrane [28]. SQSTM1/p62 is an ubiquitin-binding protein and drives cargo loading in the autophagosome for autophagic degradation. Given that it is itself degraded by autophagy, when the process is impaired, its degradation is decreased and it accumulates. In contrast, decreased levels can be observed when autophagic flux is completed [29]. Western blot analysis showed that LC3-II level increased after DIP treatment while SQSTM1/p62 levels remained unchanged (Fig. 2A). In cells submitted to nutrient starvation, SQSTM1/p62 levels decreased, however, when combined to DIP treatment, this reduction was not observed, instead, increased levels of LC3-II were observed (Fig. 2A). A similar result was observed with the co-treatment of Rapamycin and DIP (Fig. 3E). Levels of SQSTM1/p62 transcripts were not affected by 6h treatment with DIP but slightly increased after 24 h of treatment (Fig. 2B). These data suggest that autophagic degradation activity was impaired by DIP treatment.

The role of the lysosome in autophagy is to provide the proper environment for cargo degradation in the autophagosome after fusion. A low pH in the lysosome lumen is required for the activity of lysosomal enzymes and neutralizing agents, such as chloroquine or BafA1, block autophagy by elevating lysosomal pH. On the basis of our finding that DIP impaired the autophagic degradation, we hypothesized that this may be due to an effect on lysosomal function. We therefore followed the change in lysosomal acidity and lysosome enzyme function upon DIP treatment by analyzing acid β -D-galactosidase activity, an eukaryotic hydrolase localized in the lysosome with an acidic optimum pH (pH 4.0-4.5). As a control, cells were treated with 100 nM BafA1, known to increase lysosomal pH. Our results showed that DIP neither reduced acridine orange R/GFIR (Fig. 1A), nor reduced acid β -D-galactosidase activity (Fig. 2C), suggesting DIP-mediated accumulation of autophagic markers is through mechanism other than lysosome deacidification.

Blockade of autophagic flux decreases the recycling of cellular fuels, which eventually leads to an insufficient energy supply and thus to cell death [10,30]. We measured the intracellular production of ATP in PC-3 cells treated with DIP, which showed a significant reduction after 24 and 48 h compared to untreated controls (Fig. 2D). The reduction in ATP levels induced by DIP was similar to the lysosomal ATPase inhibitor BafA1. Adding BafA1 together with DIP did not lead to an additive effect in ATP reduction, suggesting a shared mechanism of action on blocking the autophagic flux.

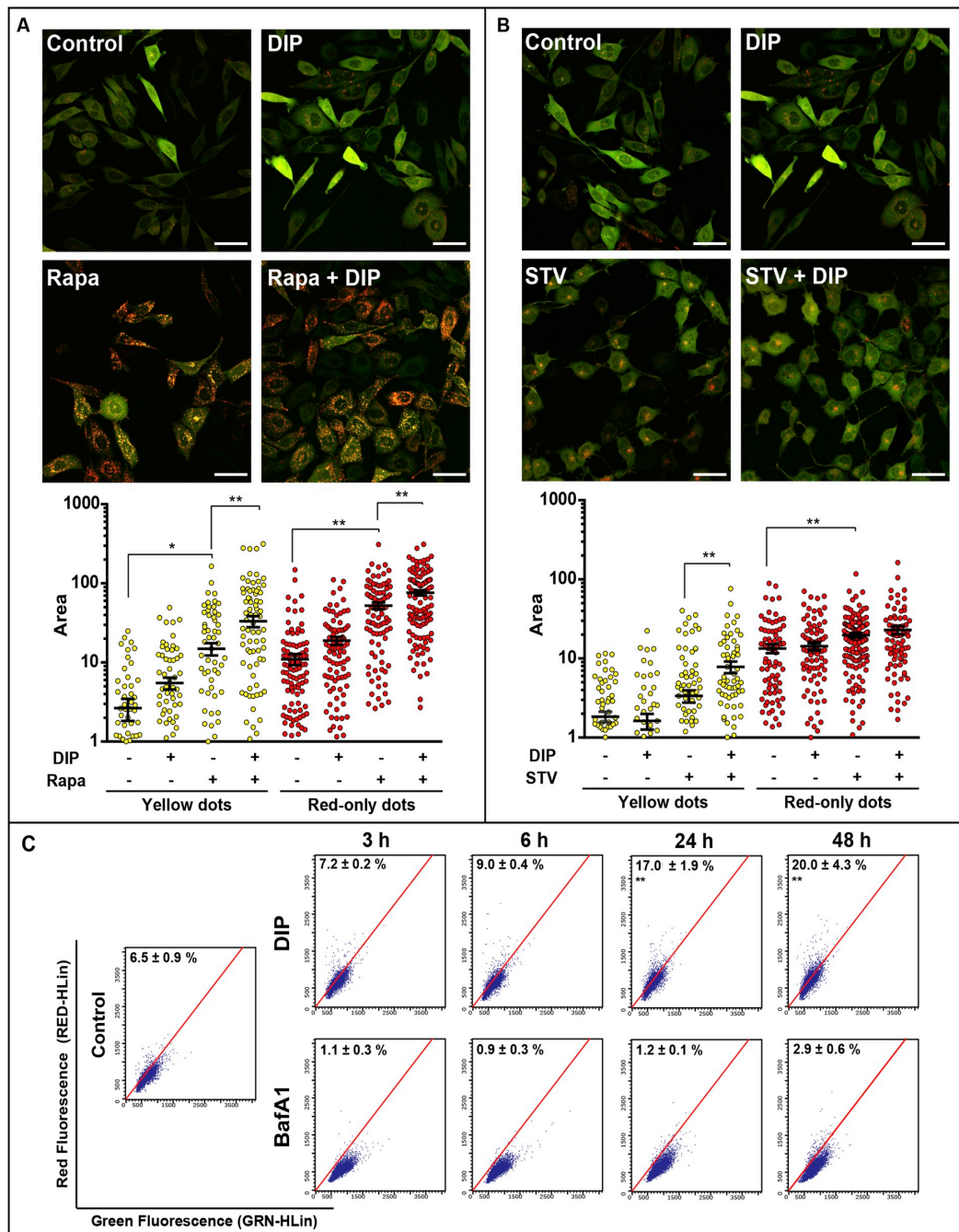


Fig. 1. Dipyridamole increases autophagic markers. Representative images of confocal microscopy of PC-3 tflC3 cells treated with 10 μ M DIP, 200 nM Rapamycin (Rapa) or their combination for 24 h and quantification of the area of yellow and red dots (A) or cells submitted to nutrient starvation for 6 h in the presence or absence of 10 μ M DIP (B). (C) Flow cytometric detection of red and green fluorescence of Acridine Orange-stained cells treated with 10 μ M DIP or 100 nM BafA1 for the indicated times. Values represent mean \pm s.e.m. of the percentage of positive cells for three independent experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01 (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2.3. Dipyridamole impairs autophagosome maturation

To better understand the role of DIP in autophagic impairment, cells were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Rapamycin treatment, as expected, resulted in prominent increase in autophagosomes containing multilamellar bodies and autolysosomes (Fig. 3A). In

contrast, less such structures were observed in DIP-treated cells. Instead, cells accumulated large numbers of flat double-membranes structures and damaged mitochondria to which these double-membranes are attached (Fig. 3A, circles, and Fig. S1B), resembling failure in the autophagosome maturation and/or closure. The combined treatment of Rapamycin and DIP decreased the number of autophagic

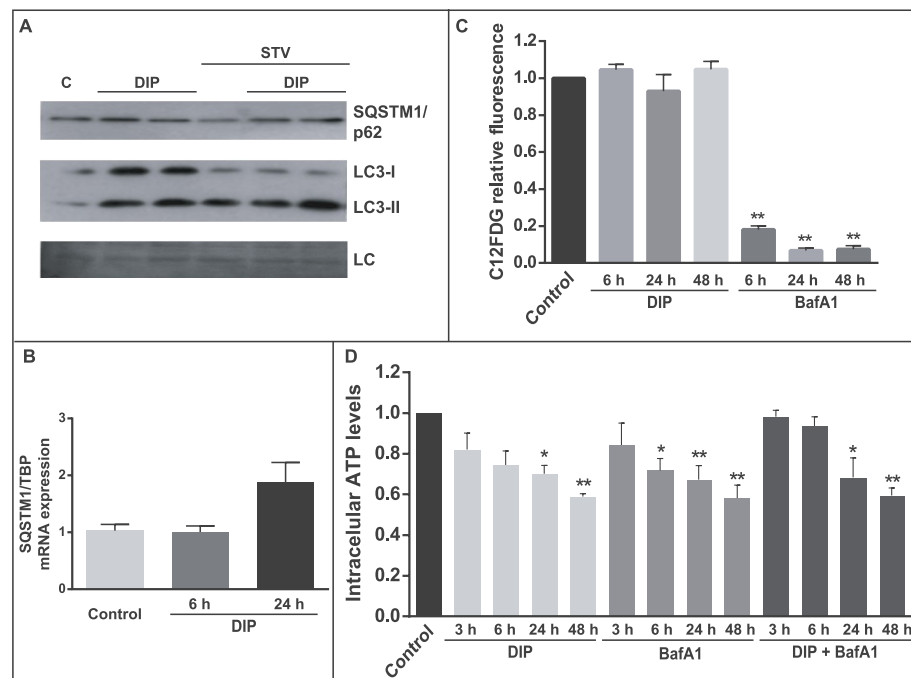


Fig. 2. Dipyridamole impairs autophagic degradation. (A) LC3-I and -II and SQSTM1/p62 western blots of PC-3 cells treated with 10 μ M DIP or starved in HBSS for 6 h in the presence or absence of DIP. LC, loading control (Coomassie). (B) SQSTM1/TBP mRNA expression in PC-3 cells treated with 10 μ M DIP for 6 or 24 h. (C) Acid β -D-galactosidase activity in cells treated with 10 μ M DIP or 100 nM BafA1 for the indicated times relative to untreated control. (D) Intracellular ATP levels in cells treated with 10 μ M DIP, 100 nM BafA1 or their combination for the indicated times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test).

vesicles and multilamellar bodies, compared to Rapamycin-treated cells, with the presence of flat double-membranes structures, as observed in the DIP-treated cells.

Dipyridamole-mediated accumulation of autophagic markers is dependent on PKA activation and independent of nucleoside uptake blockage.

Similar to DIP, nitrobenzylthioinosine (NBMPR) is a potent inhibitor of equilibrative nucleoside transport [18]. To describe the contribution of the blockage of nucleoside transport on autophagy, we performed [3H]-thymidine uptake assay to determine the concentration of NBMPR able to produce similar effects in nucleoside uptake in relation to the concentration of DIP employed. Both treatments significantly reduced nucleoside uptake (Fig. 3B) and the lowest concentration tested, 0.1 μ M NBMPR, was selected for further assays. To determine whether DIP treatment impaired autophagic cargo degradation in a nucleoside uptake-independent manner, we compared LC3-II and SQSTM1/p62 levels in cells treated with DIP or NBMPR, in the presence or not of Rapamycin. As previously observed, DIP increased the levels of both markers and prevented SQSTM1/p62 degradation in Rapamycin-treated cells, which was different from the effect observed for NBMPR treatment (Fig. 3C), suggesting that the ability to block nucleoside uptake is not key for the observed effects. One of the possible impacts of nucleoside uptake on autophagy is the phosphorylation, by adenosine kinase (AK), of adenosine in AMP, thus leading to autophagy induction [24]. Inhibition of the adenosine-metabolizing enzyme AK with ABT-702, a potent non-nucleoside AK inhibitor [31], also did not prevent starvation-induced SQSTM1/p62 degradation (Fig. S1A). In view of the fact that DIP is also known for its inhibition of PDEs, what may lead to increased intracellular cAMP concentrations, we assessed CREB (cAMP response element-binding protein) phosphorylation to evaluate PKA activation. As shown in Fig. 3D, DIP treatment increased CREB

phosphorylation at Ser133, suggesting PKA activation.

To investigate whether DIP-mediated effects in the accumulation of autophagic markers were through PKA activation, we analyzed if the PKA inhibitor H89 was able to prevent the accumulation of SQSTM1/p62 in DIP-treated cells. As shown in Fig. 3E, DIP treatment was able to prevent Rapamycin-induced SQSTM1/p62 degradation. On the other hand, pre-treatment with H89 prevented SQSTM1/p62 accumulation in the combination of Rapamycin and DIP. These results therefore support the conclusion that DIP-induced accumulation of the adaptor protein SQSTM1/p62 reflects an inhibition of degradation provoked by PKA activation, possibly mediating a failure in autophagosome maturation.

SQSTM1/p62 polymerizes and aggregates, turning it into a detergent-insoluble form [32], linking polyubiquitinated protein aggregates to the autophagic machinery, via LC3 interaction, mediating the clearance of such aggregates [29]. DIP increased the proportion of SQSTM1/p62 in the Triton X-100-insoluble fraction in the presence of rapamycin (Fig. 3F). Taken together with the results of its degradation impairment, this result reinforces that DIP treatment hampers clearance of such aggregates.

2.4. Dipyridamole sensitizes prostate cancer cells to cytotoxic agents

One of the hallmarks of malignant cells is their ability to grow under anchorage independent conditions. This phenotype was analyzed *in vitro* using a soft agar clonogenic assay. To determine whether dipyridamole could exhibit cytotoxic effect or sensitize cells to Cisplatin (CDDP) or Paclitaxel (PTX) treatments, we analyzed the size and number of colonies of androgen receptor (AR)-positive (LNCaP) and AR-negative (PC-3 and 22Rv1) cells after treatments. For the three cell lines, there was a significant reduction in colony number and volume in treatments with 10 μ M DIP, a concentration close to the range attained

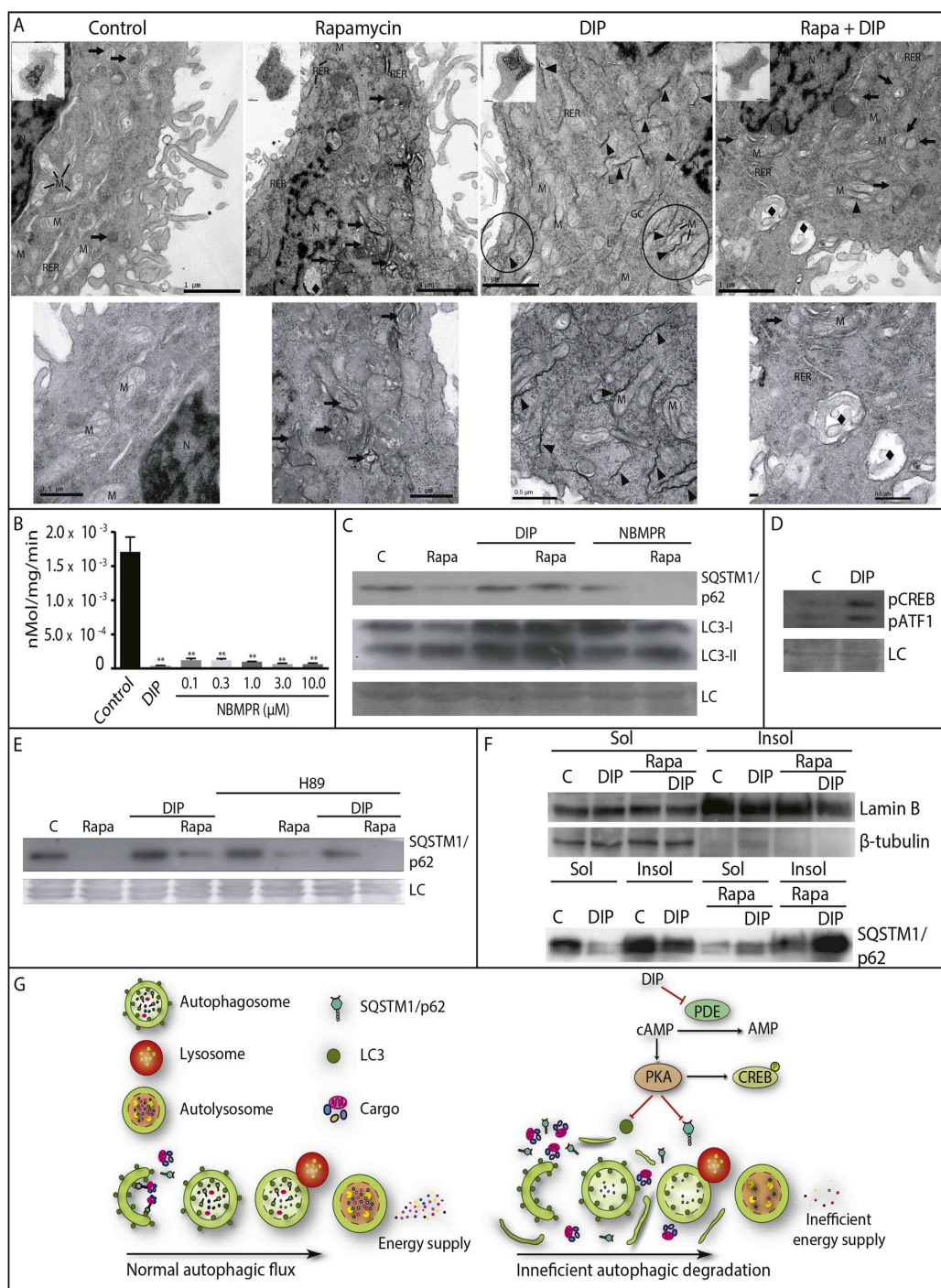


Fig. 3. Dipyridamole-mediated accumulation of autophagic markers is dependent on PKA activation. (A) PC-3 cells were treated with 10 μM DIP in the presence or absence of 200 nM Rapamycin for 24 h and then examined by transmission electron microscopy. N: nucleus; M: mitochondrion; RER: endoplasmic reticulum; GC: golgi; L: lysosome; black diamonds: autolysosomes; black arrows: autophagosomes; arrowheads: double-membranes. (B) [3H]-thymidine uptake in PC-3 cells after treatment for 3 h with 10 μM DIP or the indicated concentrations of NBMPR. ***P < 0.001 (one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test). (C) LC3-I and -II, SQSTM1/p62 western blots of PC-3 cells treated with 10 μM DIP or 0.1 μM NBMPR in the presence of absence of 200 nM Rapamycin for 24 h. LC, loading control (Coomassie). (D) pCREB western blots of PC-3 control cells or treated with 10 μM DIP for 24 h. (E) SQSTM1/p62 western blots of PC-3 cells treated, as indicated, with 10 μM DIP or 200 nM Rapamycin for 24 h with or without pretreatment for 1h with 5 μM H89. (F) Immunoblots of detergent-soluble (Sol) and -insoluble (Insol) fractions from PC-3 cells treated with 10 μM DIP or 200 nM Rapamycin, and their combination, for 24 h. (G) Graphical illustration of the mechanism suggested for DIP-induced accumulation of autophagic markers; (left) normal autophagic flux provides cells with substrates to ensure proper energy supply; (right) DIP inhibits phosphodiesterases activity and leads to the accumulation of cAMP, triggering PKA activation. PKA phosphorylates LC3 and SQSTM1/p62 leading to accumulation of double-membranes, resembling defects in autophagosome maturation, cargo loading failure and insufficient energy supply. Dipyridamole impairs anchorage independent growth of PCa cell lines.

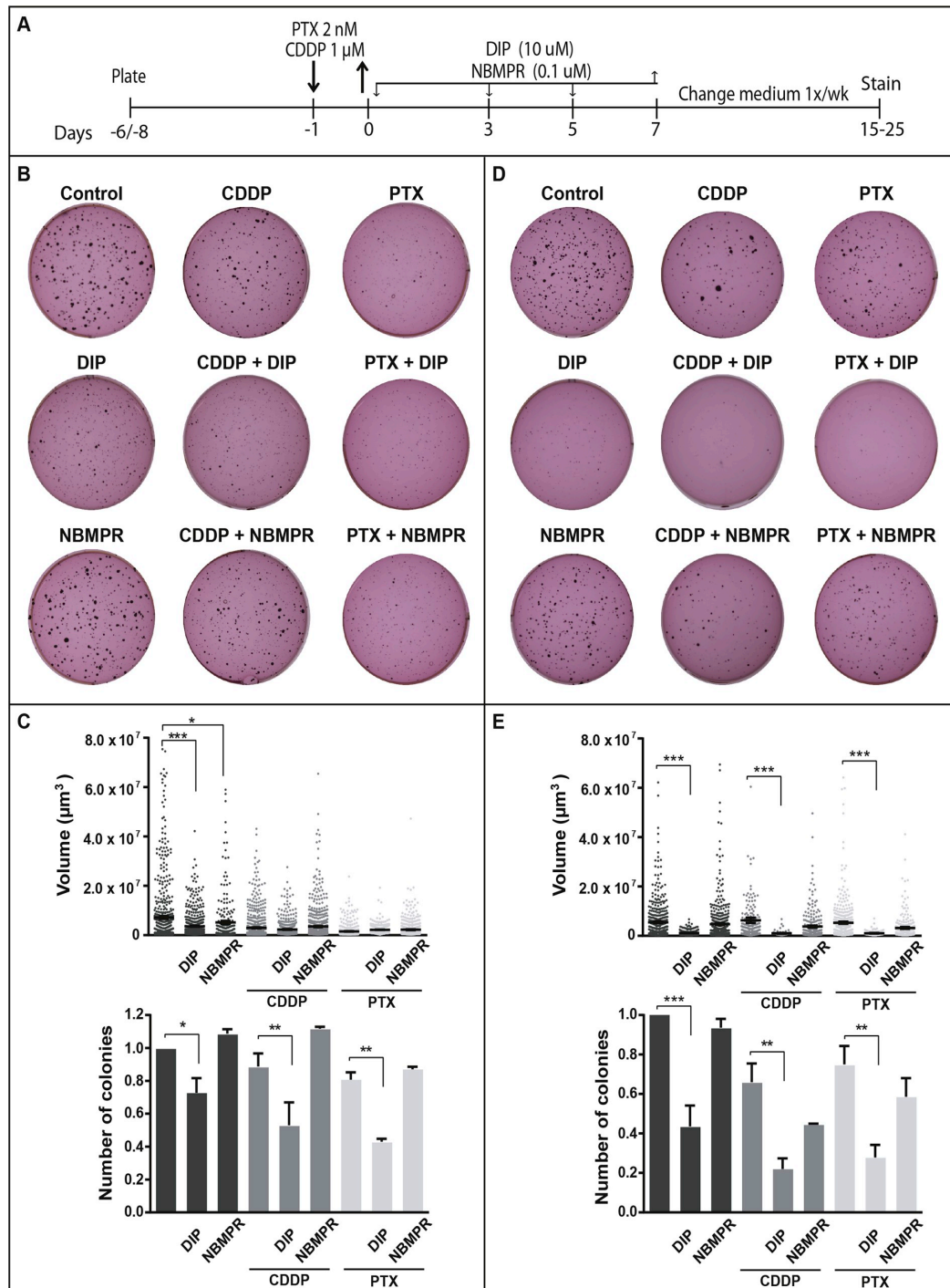


Fig. 4. Dipyridamole decreases soft agar colony-forming ability in prostate cancer cells independent of nucleoside uptake blockade. (A) Scheme of the assay and treatments schedule. Representative images of the colonies grown in soft agar for PC-3 (B) and 22Rv1 (D) treated as indicated. Measurements of the colonies volume of one representative experiment (scatter plot-upper) and number of colonies relative to untreated controls (column chart-bottom) for PC-3 (C) and 22Rv1 (E). Comparisons were made between DIP- or NBMPR-treated cells and untreated controls or between antineoplastic monotherapy and treatments combined with DIP or NBMPR * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison post-test).

after oral administration in humans [21], compared to the untreated controls (Fig. 4 and Fig. S1B). Similarly, for all three cell lines, combined treatments of CDDP or PTX with DIP presented fewer colonies when compared to the antineoplastic agents alone and reduced colonies

volume in both combinations for 22Rv1 cells. To evaluate whether this effect was due to nucleoside uptake blockade, we made the same analysis in NBMPR-treated colonies, in a concentration that resulted in similar blockade in nucleoside uptake as DIP. NBMPR treatment was

not effective to reduce colonies number neither alone nor combined to CDDP or PTX (Fig. 4), suggesting that inhibition of nucleoside uptake *per se* is not the mechanism of toxicity. These results suggest that DIP, as a single agent or combined to CDDP or PTX, is capable of decreasing colonies number and size in both AR-positive and -negative prostate cancer cells, independently of the nucleoside uptake inhibition.

3. Discussion

DIP, due to its inhibition of membrane nucleoside transport, has been explored to increase the cytotoxicity of antimetabolites, by preventing nucleoside salvage and depletion of nucleoside pools [33–35]. The mechanism of synergism cannot be completely explained from the perspective of blockade of the salvage pathway and some studies propose other non-salvage dependent mechanism [36]. Indeed, DIP has been shown to synergize with drugs from other classes, such as cisplatin and doxorubicin [37,38], and also increased cytotoxicity in medium containing dialysed serum (lacking salvage pathway nucleosides), suggesting that the mechanism by which DIP increased toxicity is not completely dependent on inhibiting the influx of nucleosides from the medium [39].

In this report we investigated the effect of DIP on autophagy using different approaches based on the targets already described for DIP, i.e. nucleoside uptake blockade and PDEs inhibition. We showed that DIP leads to the activation of PKA and impairs autophagic degradation, leading to the accumulation of double-membranes, resembling immature autophagosome, which could impair cargo loading and degradation.

Previous works demonstrated specific phosphorylation sites for PKA in both LC3 and SQSTM1/p62 proteins. PKA phosphorylation of SQSTM1/p62 at Ser24 regulates PB1 domain homopolymerization and, possibly, protein binding that may reduce p62-mediated cargo recognition [39]. The Ser12 PKA phosphorylation site is highly conserved in all LC3 isoforms and can mediate the control of autophagy by cAMP/PKA pathway, as its phosphorylation reduces LC3 recruitment into autophagosomes [38]. The Ser12 phosphorylation site is positioned directly in, or in the vicinity of, the N-terminal extension of LC3, which is essential for the binding of LC3-interacting proteins, such as SQSTM1/p62, via their classic LIR motif. However, it is still an open question whether the phosphorylation of this site could interfere in the interaction of LC3 proteins with LIR-containing proteins, and therefore promote the exclusion from autophagosomes [40]. Inefficient autophagy can result from cargo loading failure by autophagosomes and has been proposed to contribute to pathogenesis in Huntington's disease [40]. In this sense, targeting the cargo loading protein SQSTM1/p62 in neoplastic cells leads to inefficient autophagic degradation and increases cell death [41].

SQSTM1/p62 and LC3-II aggregate together with ubiquitinated proteins in the detergent-insoluble fraction [41]. DIP treatment increased the presence of SQSTM1/p62 in the Triton X-100-insoluble fraction, indicating that it does not interfere with the aggregation of this protein, but rather reduces the degradation of the aggregates containing SQSTM1/p62. Inhibition of the incorporation of SQSTM1/p62 into autophagosomes through LC3 knockdown leads to accumulation of detergent-insoluble SQSTM1/p62 and polyubiquitylated proteins [42]. Therefore, the effect of DIP may be mediated by blocking the loading of SQSTM1/p62, promoting autophagosome maturation impairment, cargo loading failure and accumulation of detergent-insoluble proteins containing SQSTM1/p62.

DIP is a FDA approved compound that has been used clinically for prevention of ischemic cerebrovascular disease and in the prevention of thromboembolic complications [21]. Since a large body of information is already available on its toxicity, dosing and bioavailability, drug repurposing for autophagy modulation in cancer therapy could be considered. Drug repurposing holds the promise of rapid clinical impact at a lower cost when compared to *de novo* drug development [43].

Notably, we demonstrate that DIP impairs autophagic degradation and can sensitize cancer cells to antineoplastic treatments. Thus, our study indicates that screening new autophagy modulators from safe drugs used in the clinic might be an attractive approach for the identification of novel autophagic flux modulators as promising lead compounds for cancer therapy.

4. Experimental procedures

4.1. Antibodies and reagents

Anti-LC3B (#2775), anti-SQSTM1/p62 (#5114), anti-phospho-CREB (Ser133) (1B6) (#9196) and horseradish peroxidase (HRP) linked-secondary antibody (#7074) were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-Lamin B1 was from Abcam (ab16048) and anti- β -tubulin from Thermo Scientific (32–2600). Hanks' Balanced Salt solution (HBSS) (H9269), Dipyrindamole (D9766), Rapamycin (R0395), BafA1 (B1793), Paclitaxel (T7191), Cisplatin (P4394) and the fluorescent dye Acridine Orange hemi(zinc chloride) salt (A6014) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). H-89 was purchased from Biomol GmbH. ABT-702 (CAS 214697-26-4) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Dipyrindamole, Rapamycin, BafA1, H-89, ABT-702 and Paclitaxel were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Acros Organics, NJ, USA), Cisplatin and Acridine Orange stock solutions were dissolved in water. All culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY).

4.2. Cell lines culture and treatments

HEK293T and 22Rv1 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC). PC-3 and LNCaP cell lines were kindly provided by Ilma S. Brum (Department of Physiology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil). The prostate cancer cell lines were cultured in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and HEK293T cells in high-glucose DMEM, both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. Cells were treated with Rapamycin 200 nM for 24 h, 10 μ M Dipyrindamole, 100 nM BafA1 or 5 μ M H89 for the indicated times. For starvation, cells were washed three times with HBSS and incubated with the same medium for 6 h.

4.3. Acidic vesicular organelles detection and quantification by Acridine orange staining

For detection of acidic vesicular organelles (AVOs), cells were stained with Acridine Orange (AO) as previously described [26]. Cells were treated with 10 μ M Dipyrindamole or 100 nM Bafilomycin A1 for 3, 6, 24 or 48 h, were collected by trypsinization, stained with 1 μ g/ml Acridine Orange (2.7 μ M) in complete culture medium for 15 min at room temperature and analyzed on a GUAVA EasyCyte flow cytometer and data were analyzed using InCyte 2.6 software (Guava Technologies). The percentages of events indicated were quantified in the dot plot.

4.4. Live-cell imaging of tflc3 cells by confocal microscopy

PC-3 cells stably expressing the tandem-fluorescent protein-tagged LC3 (mCherry-GFP-LC3) were generated by retroviral infection as previously described [26]. PC-3 tflc3 cells were plated in glass bottom dishes and imaged by confocal microscopy with a 60x objective with an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope. The excitation laser for green fluorescence was 473 nm and for red fluorescence was 559 nm. Emission filters were 520 nm and 572 nm, respectively. Quantitative measures of green and red dots area were obtained with ImageJ software for all cells imaged (from 85 to 120 cells per treatment).

4.5. Detergent-soluble and insoluble protein fractionation

Cellular proteins were separated into detergent-soluble and -insoluble fractions with the 1% Triton X-100 buffer [50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 2% Triton X-100, a protease and phosphatase inhibitor mix], as previously described [44]. Briefly, Triton X-100 extracts were fractionated by centrifugation (20,000 g, for 15 min at 4°C). The detergent-insoluble fraction was washed with Triton X-100 buffer and resuspended in the same buffer containing 1% SDS and sonicated. Both β -tubulin and lamin B1 were used as fractionation controls of the detergent-soluble and -insoluble fractions, respectively.

4.6. Western blot analysis

Analysis of protein levels were performed as described previously with minor modifications [11]. Briefly, after treatment, cells were lysed and protein concentration was quantified by QuantiPro BCA Assay Kit (Thermo Scientific, #23225). 20 μ g of protein extracts were separated on 12.5% SDS-PAGE, followed by electrotransfer to a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010). Then membranes were stained with Coomassie R-250, imaged and a representative band was used as loading control (Welinder and Ekblad, 2011). Next, membranes were blocked with non-fat dried milk and incubated overnight at +4°C with primary antibodies (anti-LC3B, 1:1000; anti-SQSTM1, 1:1000; anti-phospho-CREB, 1:500; anti- β -tubulin, 1:1000; anti-Lamin B1, 1:1000). Primary antibodies were detected by secondary antibody (1:2000, for 2 h) followed by ECL and X-ray film exposition (Carestream Kodak BioMax light film).

4.7. Determination of lysosomal acid β -D-galactosidase activity

To assess lysosomal activity impairment we measure β -galactosidase activity by flow cytometry using the fluorogenic substrate 5-dodecanoylamino fluorescein di- β -D-galactopyranoside (C12FDG), as previously described [45,46]. This compound is a membrane permeable, non-fluorescent substrate of β -galactosidase, which after hydrolysis of the galactosyl residues emits green fluorescence and remains confined within the cell. Briefly, cells were treated with 10 μ M Dipyridamole or 100 nM Bafilomycin A1 for 6, 24 or 48 h C12FDG (33 μ M) was then added in the last 4 h of treatment and the incubation was continued for the indicated length of time. At the end of the incubation, cells were washed with HBSS, collected by trypsinization, resuspended in fresh medium and analyzed immediately on a GUAVA EasyCyte flow cytometer. Data were analyzed using InCyte 2.6 software (Guava Technologies). The C12-fluorescein signal was measured on the FL1 detector and β -galactosidase activity was estimated using the mean fluorescence intensity of the population.

4.8. Intracellular ATP levels

ATP was measured using the ATP determination kit (ThermoScientific, #A22066) according to the manufacturer's instructions. The cells were seeded in a 24-well plate, treated with 10 μ M Dipyridamole and/or 100 nM Bafilomycin A1 for 3, 6, 24 or 48 h, and then collected by scraping in Tris-EDTA buffer and lysed, heating to 95 °C for 7 min. Cell lysates were centrifuged at 12000 rpm for 2 min and supernatants were collected. ATP levels were detected by measuring luminescence after the addition of the substrate solution to the cell lysates. Signal was normalized by the protein concentration, determined by QuantiPro BCA Assay Kit.

4.9. [3H]-thymidine uptake assay

Nucleoside transport activity of cells was examined with [3H]-thymidine (3H-dT) (Sigma-Aldrich, #T4813). Subconfluent cells were treated with 10 μ M DIP or the indicated concentrations of NBMPR for

3 h in HBSS in triplicate. 3H-dT was added in the last 30 min of incubation (1 μ Ci/well – 23 Ci/mmol). The cells were solubilized in 300 μ l of lysis buffer and radioactivity of 200 μ l of cell lysate was determined by scintillation counting using a Liquid Scintillation Analyzer Trip-Carb 2800 TR, (PerkinElmer). Radioactivity was normalized by the protein content, determined by QuantiPro BCA Assay Kit.

4.10. qPCR

After 6 or 24 h of treatment with DIP, mRNA was extracted from the PC-3 cultures using Trizol LS reagent (Sigma-Aldrich, #T9424). The complementary DNA (cDNA) was synthesized using the M-MLV reverse transcriptase enzyme (Sigma Aldrich) from 3 μ g of total RNA and in accordance with manufacturer's instructions. Primer for SQSTM1/p62 was designed using Primer-BLAST - F: GGTGGCCGCTGTTC; R: CCTCGTCACTGGAAAAGGCA. The qPCR reaction was carried out in an StepOnePlus Real-Time PCR Systems. mRNA expression levels were calculated based on the standard curve method using a serial dilution of the samples and TATA-box binding protein (TBP) was used as the constitutive gene for control. Data is presented as ratio of target-gene/TBP expression.

4.11. Electron microscopy

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde added glutaraldehyde 25% at 2% concentration, washed in PBS and post fixed in 1% osmium tetroxide, OsO4 (Sigma) in PBS, pH 7.4 for 1 h at room temperature. After another wash, samples were dehydrated gradually with acetone (MERCK) and soaked in epon resin. Polymerization was carried out for 48 h at 60°C and ultra-fine (100 nm) cuts were obtained in ultramicrotome for the assembly of copper grids (200 mesh). The samples were counterstained with 1% uranyl acetate and then with 1% lead citrate (MERCK) and examined in transmission electron microscope (JEM 1200 EXII, Japan).

4.12. Soft agar assay

The soft agar colony formation assay was used to evaluate the ability of cells to form colonies in an anchorage-independent manner, to evaluate carcinogenic potential [47]. In brief, a 1.8% agarose stock was made in water. The bottom layer, 0.6% agar support was prepared in complete medium in 12-well dishes. 3×10^3 cells were mixed with agarose at a final concentration of 0.3% in complete medium. The cell layer was then plated onto the bottom agar. A layer of growth medium was then added to each well. The proportion of bottom:cell:medium layer was 1:1:1. After 5-7 days, cultures received the treatments in the medium layer – Paclitaxel (final concentration 2 nM), Cisplatin (final concentration 1 μ M) for 24 h. After, cultures were treated with Dipyridamole (final concentration 10 μ M) or with an equivalent amount of vehicle for 7 days (replacing with fresh treatments on days 3 and 5). Medium was changed once a week until colonies were stained with MTT (4,5-dimethyl-thiazol-2yl)-2,5-difenylyltetrazolium bromide) and photographed. Colonies number and area were obtained with ImageJ software. Photomicrographs of colonies were used to obtain their area in μ m² to convert pixels, from photographs, to volume in μ m³ by the equation $V = 4/3 \pi r^3$.

4.13. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). The level of significance was determined with a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison post test. Data are shown as mean \pm s.e.m. $P < 0.05$ was considered statistically significant difference.

Conflicts of interest

The authors declare no competing or financial interests.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (458139/2014-9; ICGEB/CNPq 405231/2015-6) and FAPERGS/PRONEX (16/2551-0000 473-0). L.C.P., G.R.O. and G.L. are recipients of CNPq fellowships and M.P.T. is recipient of a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship.

Acknowledgements

We thank Dra. Ilma S. Brum (Department of Physiology, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) for PC-3 and LNCaP cells, Dr. Fabrício Figueiró (Department of Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) for Anti-Lamin B1 antibody, Dr. Ivan Izquierdo, Dra. Cristiane Furini and Dra. Jociane Myskiw (PUC-RS, Porto Alegre, Brazil) for H89 and the CMM (UFRGS) core facility for confocal microscopy and transmission electron microscopy.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.001>.

References

- [1] J. Zhao, A.L. Goldberg, Coordinate regulation of autophagy and the ubiquitin proteasome system by mTOR, *Autophagy* 12 (2016) 1967–1970.
- [2] S.H. Lecker, A.L. Goldberg, W.E. Mitch, Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17 (2006) 1807–1819.
- [3] D. Glick, S. Barth, K.F. Macleod, Autophagy: cellular and molecular mechanisms, *J. Pathol.* 221 (2010) 3–12.
- [4] B. Levine, D.J. Klionsky, Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, *Dev. Cell* 6 (2004) 463–477.
- [5] J. Kaur, J. Debnath, Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16 (2015) 461–472.
- [6] A.L. Anding, E.H. Baehrecke, Cleaning house: selective autophagy of organelles, *Dev. Cell* 41 (2017) 10–22.
- [7] E. Itakura, N. Mizushima, p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 17–27.
- [8] B. Wurzer, G. Zaffagnini, D. Fracchiolla, E. Turco, C. Abert, J. Romanov, S. Martens, Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy, *eLife* 4 (2015) e08941.
- [9] D.C. Rubinsztein, J.E. Gestwicki, L.O. Murphy, D.J. Klionsky, Potential therapeutic applications of autophagy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 304–312.
- [10] Z.J. Yang, C.E. Chee, S. Huang, F.A. Sinicrope, The role of autophagy in cancer: therapeutic implications, *Mol. Cancer Ther.* 10 (2011) 1533–1541.
- [11] E.C. Filippi-Chiela, M. M. B. e Silva, M.P. Thomé, G. Lenz, Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage, *Autophagy* 11 (2015) 1099–1113.
- [12] X. Li, H. Xu, Y. Liu, N. An, S. Zhao, J. Bao, Autophagy modulation as a target for anticancer drug discovery, *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (2013) 612–624.
- [13] C.I. Chude, R.K. Amaravadi, Targeting autophagy in cancer: update on clinical trials and novel inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.* (2017), <https://doi.org/10.3390/ijms18061279>.
- [14] Z. Wu, P.-C. Chang, J.C. Yang, C.-Y. Chu, L.-Y. Wang, N.-T. Chen, A.-H. Ma, S.J. Desai, S.H. Lo, C.P. Evans, K.S. Lam, H.-J. Kung, Autophagy blockade sensitizes prostate cancer cells towards src family kinase inhibitors, *Genes Cancer* 1 (2010) 40–49.
- [15] Q.-W. Fan, C. Cheng, C. Hackett, M. Feldman, B.T. Houseman, T. Nicolaidis, D. Haas-Kogan, C.D. James, S.A. Oakes, J. Debnath, K.M. Shokat, W.A. Weiss, Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma, *Sci. Signal.* 3 (2010) ra81.
- [16] M.R. Rosenfeld, X. Ye, J.G. Supko, S. Desideri, S.A. Grossman, S. Brem, T. Mikkelsen, D. Wang, Y.C. Chang, J. Hu, Q. McAfee, J. Fisher, A.B. Troxel, S. Piao, D.F. Heitjan, K.-S. Tan, L. Pontiggia, P.J. O'Dwyer, L.E. Davis, R.K. Amaravadi, A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme, *Autophagy* 10 (2014) 1359–1368.
- [17] T.-T. Shi, X.-X. Yu, L.-J. Yan, H.-T. Xiao, Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 79 (2017) 287–294.
- [18] C. Wang, W. Lin, H. Playa, S. Sun, K. Cameron, J. Buolamwini, Dipyrindamole analogues as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4), *Biochem. Pharmacol.* (2013), <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.063>.
- [19] S. Chakrabarti, J.E. Freedman, Dipyrindamole, cerebrovascular disease, and the vasculature, *Vasc. Pharmacol.* 48 (2008) 143–149.
- [20] J. Greenhalgh, A. Bagust, A. Boland, C. Martin Saborido, J. Oye, M. Blundell, Y. Dundar, R. Dickson, C. Proudlove, M. Fisher, Clopidogrel and modified-release dipyrindamole for the prevention of occlusive vascular events (review of Technology Appraisal No. 90): a systematic review and economic analysis, *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* 15 (2011) 1–178.
- [21] P. Gresele, S. Momi, E. Falcinelli, Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 72 (2011) 634–646.
- [22] J.S. Stephan, Y.-Y. Yeh, V. Ramachandran, S.J. Deminoff, P.K. Herman, The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 17049–17054.
- [23] F. Torres-Quiroz, M. Filteau, C.R. Landry, Feedback regulation between autophagy and PKA, *Autophagy* 11 (2015) 1181–1183.
- [24] P. de A. Mello, E.C. Filippi-Chiela, J. Nascimento, A. Beckenkamp, D.B. Santana, F. Kipper, E.A. Casali, A. Nejar Bruno, J.D. Pancez, L.F. Zerbin, M.R. Wink, G. Lenz, A. Buffon, Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells, *Mol. Biol. Cell* 25 (2014) 2905–2918.
- [25] L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, B. Levine, D.R. Green, G. Kroemer, Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 487–511.
- [26] M.P. Thomé, E.C. Filippi-Chiela, E.S. Villodre, C.B. Migliavaca, G.R. Onzi, K.B. Felipe, G. Lenz, Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy, *J. Cell Sci.* 129 (2016) 4622–4632.
- [27] Soluble adenylyl cyclase is essential for proper lysosomal acidification, - PubMed - NCBI [online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27670898>, Accessed date: 21 May 2019.
- [28] N. Mizushima, T. Yoshimori, B. Levine, Methods in mammalian autophagy research, *Cell* 140 (2010) 313–326.
- [29] G. Bjørkøy, T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, T. Johansen, p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 603–614.
- [30] W. Qiu, M. Su, F. Xie, J. Ai, Y. Ren, J. Zhang, R. Guan, W. He, Y. Gong, Y. Guo, Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1123.
- [31] M.F. Jarvis, H. Yu, K. Kohlhaas, K. Alexander, C.H. Lee, M. Jiang, S.S. Bhagwat, M. Williams, E.A. Kowaluk, ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2, 3-d]pyrimidine), a novel orally effective adenosine kinase inhibitor with analgesic and anti-inflammatory properties: I. In vitro characterization and acute antinociceptive effects in the mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 1156–1164.
- [32] J.-A. Pan, Y. Sun, Y.-P. Jiang, A.J. Bott, N. Jaber, Z. Dou, B. Yang, J.-S. Chen, J.M. Catanzaro, C. Du, W.-X. Ding, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, K. Ozato, R.Z. Lin, W.-X. Zong, TRIM21 ubiquitylates SQSTM1/p62 and suppresses protein sequestration to regulate redox homeostasis, *Mol. Cell* 61 (2016) 720–733.
- [33] P.H. Fischer, R. Pamukcu, G. Bittner, J.K. Willson, Enhancement of the sensitivity of human colon cancer cells to growth inhibition by acivicin achieved through inhibition of nucleic acid precursor salvage by dipyrindamole, *Cancer Res.* 44 (1984) 3355–3359.
- [34] J.A. Nelson, S. Drake, Potentiation of methotrexate toxicity by dipyrindamole, *Cancer Res.* 44 (1984) 2493–2496.
- [35] P.G. Smith, E. Marshman, D.R. Newell, N.J. Curtin, Dipyrindamole potentiates the in vitro activity of MTA (LY231514) by inhibition of thymidine transport, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 924–930.
- [36] C.R. Boyer, P.L. Karjian, G.M. Wahl, M. Pegram, S.T.C. Neuteboom, Nucleoside transport inhibitors, dipyrindamole and p-nitrobenzylthioinosine, selectively potentiate the antitumor activity of NB1011, *Anti Cancer Drugs* 13 (2002) 29–36.
- [37] S.B. Howell, D. Hom, R. Sanga, J.S. Vick, I.S. Abramson, Comparison of the synergistic potentiation of etoposide, doxorubicin, and vinblastine cytotoxicity by dipyrindamole, *Cancer Res.* 49 (1989) 3178–3183.
- [38] H. Kusumoto, Y. Maehara, H. Anai, T. Kusumoto, K. Sugimachi, Potentiation of adriamycin cytotoxicity by dipyrindamole against HeLa cells in vitro and sarcoma 180 cells in vivo, *Cancer Res.* 48 (1988) 1208–1212.
- [39] J.L. Grem, P.H. Fischer, Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyrindamole, *Pharmacol. Ther.* 40 (1989) 349–371.
- [40] D.G. McEwan, I. Dikic, The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation, *Trends Cell Biol.* 21 (2011) 195–201.
- [41] J. Lim, H.-W. Kim, M.B.H. Youdim, I.J. Rhyu, K.-M. Choe, Y.J. Oh, Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux, *Autophagy* 7 (2011) 51–60.
- [42] E. Shvets, E. Fass, R. Scherz-Shouval, Z. Elazar, The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 2685–2695.
- [43] S.M. Corsello, J.A. Bittker, Z. Liu, J. Gould, P. McCarren, J.E. Hirschman, S.E. Johnston, A. Vrcic, B. Wong, M. Khan, J. Asiedu, R. Narayan, C.C. Mader, A. Subramanian, T.R. Golub, The Drug Repurposing Hub: a next-generation drug library and information resource, *Nat. Med.* 23 (2017) 405–408.
- [44] K. Fujita, D. Maeda, Q. Xiao, S.M. Srinivasula, Nrf2-mediated induction of p62

- controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 (2011) 1427–1432.
- [45] F. Debaq-Chainiaux, J.D. Erusalimsky, J. Campisi, O. Toussaint, Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*, Nat. Protoc. 4 (2009) 1798–1806.
- [46] D.J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, J.D. Erusalimsky, Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells, J. Cell Sci. 113 (Pt 20) (2000) 3613–3622.
- [47] S. Borowicz, M. Van Scoyk, S. Avasarala, M.K. Karuppusamy Rathinam, J. Tauler, R.K. Bikkavilli, R.A. Winn, The soft agar colony formation assay, J. Vis. Exp. JoVE. (2014), <https://doi.org/10.3791/51998>.

Dipyridamole impairs autophagic flux and exerts antiproliferative activity on prostate cancer cells

Marcos P. Thomé, Luiza C. Pereira, Giovana R. Onzi, Francieli Rohden, Mariana Ilha, Fátima T. Guma, Márcia R. Wink, Guido Lenz

Material included

Figure S1

Sup Fig 1

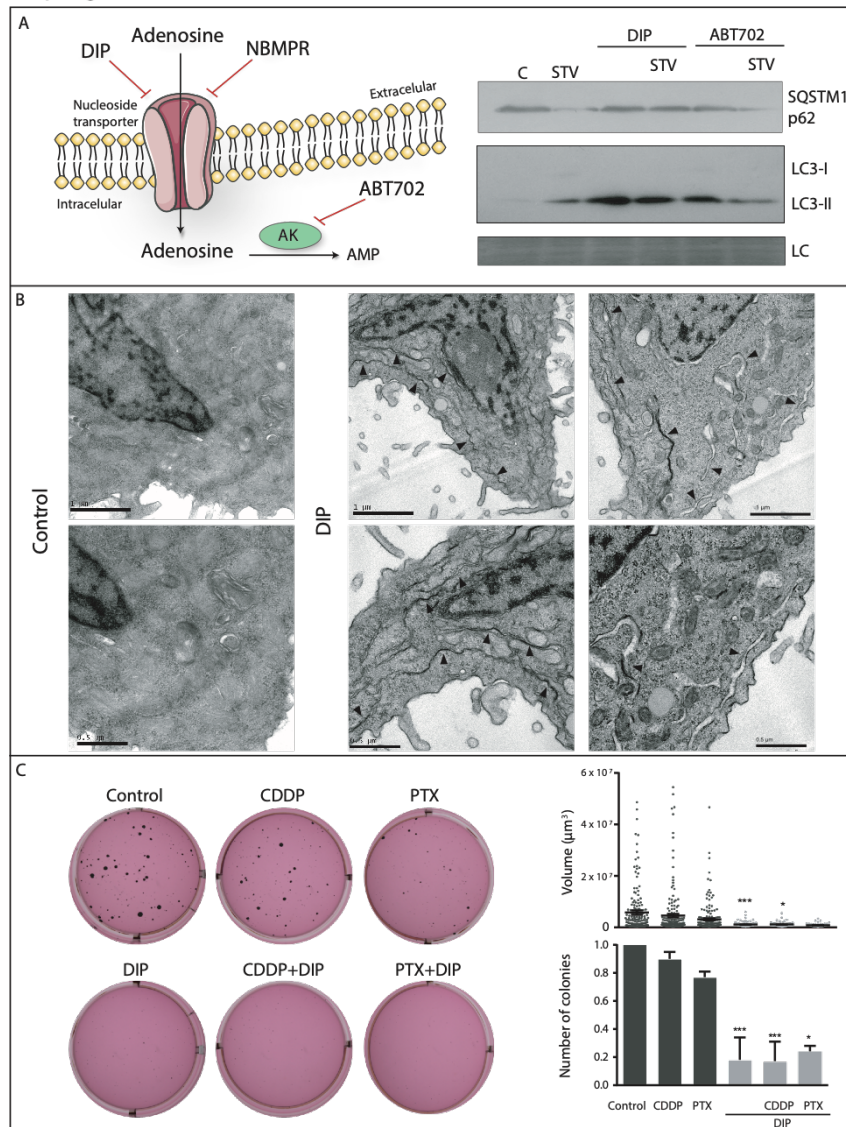


Figure S1. (A) Left: graphical illustration of the connection between extracellular adenosine uptake and intracellular conversion to AMP by adenosine kinase (AK); right: LC3-I and -II and SQSTM1/p62 western blots of PC-3 cells starved in HBSS for 6 h in the presence or absence of 10 μM DIP or 100 nM ABT702. LC, loading control (Coomassie). (B) PC-3 cells examined by transmission electron microscopy in smaller (top images) and higher (bottom images) magnification, highlighting the presence of autophagic organelles and double membranes in the cytoplasm of DIP-treated cells. (C) Representative images of the colonies grown in soft agar for LNCaP cells treated as indicated. Measurements of the colonies volume of one representative experiment (scatter plot-left) and number of colonies relative to untreated controls (column chart-right). Comparisons are made between DIP-treated cells and untreated controls or between antineoplastic monotherapy and treatments combined with DIP * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison post-test).

CAPÍTULO III

Manuscrito II

Dipyridamole as a new drug to prevent Epstein-Barr virus reactivation

Under review – Periódico Antiviral Research

Este artigo foi desenvolvido com base nos dados experimentais gerados durante meu estágio de doutorado sanduíche sob supervisão do Dr. Alexandre Escargueil e Dr. Vincent Maréchal, na *Université Sorbonne*, no âmbito do projeto CAPES-COFECUB coordenado pelo Dr. João Antonio Pêgas Henriques.

Dipyridamole as a new drug to prevent Epstein-Barr virus reactivation

Marcos P. Thomé^{1,2}, Chloé Borde², Annette K. Larsen², Joao A.P. Henriques^{1,3}, Guido Lenz¹, Alexandre E. Escargueil^{2*} and Vincent Maréchal^{2*}

(*) These authors contributed equally to this work.

¹ Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) Porto Alegre, RS, Brazil;

² Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, F-75012 Paris, France

³ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS) Caxias do Sul, RS, Brazil

Corresponding author:

Marcos P. Thomé

marcos.thome@ufrgs.br/marcosp.thm@gmail.com

Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves, 9500

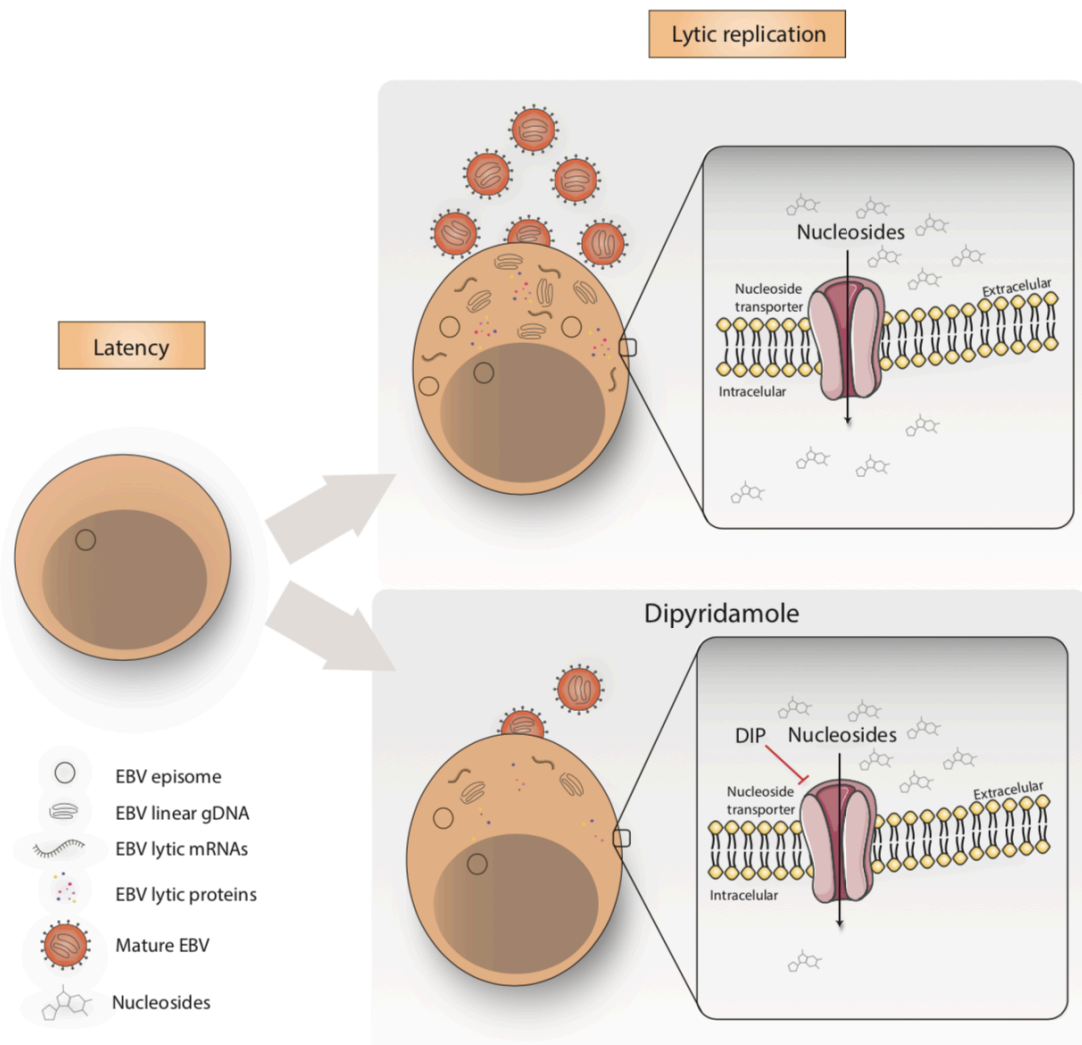
Prédio 43431 – Lab. 115

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Highlights

- Dipyridamole prevents Epstein-Barr virus (EBV) reactivation;
- Dipyridamole represses EBV immediate-early and early genes expression;
- Dipyridamole antiviral activity in EBV is associated with its ability to inhibit nucleoside uptake;
- Dipyridamole repurposing opens new therapeutic options with broad antiviral activities.

Graphical abstract



Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is a widely distributed gamma-herpesvirus that has been associated with various cancers mainly from lymphocytic and epithelial origin. Although EBV-mediated oncogenesis has been associated with viral oncogenes expressed during latency, a growing set of evidence suggested that antiviral treatments directed against EBV lytic phase may contribute to prevent some forms of cancers, including EBV-positive Post-Transplant Lymphoproliferative Diseases. It is shown here that dipyridamole (DIP), a safe drug with favorable and broad pharmacological properties, inhibits EBV reactivation from B-cell lines. DIP repressed immediate early and early genes expression mostly through its ability to inhibit nucleoside uptake. Considering its wide clinical use, DIP repurposing could shortly be evaluated, alone or in combination with other antivirals, to treat EBV-related diseases where lytic replication plays a deleterious role.

Keywords

Epstein-Barr virus; dipyridamole; drug repurposing; EBV reactivation

1. Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a human gamma-herpesvirus that persistently infects more than 90% of the adult population worldwide. Primary infection occurs mostly during childhood without apparent symptoms but it can cause infectious mononucleosis in young adults. Following primary infection, EBV establishes a life-long persistent infection that combines lytic replication and latent phases, supported by its dual tropism for B lymphocytes and epithelial cells (Chiu and Sugden, 2016; Hutt-Fletcher, 2014). Whereas EBV infection is usually tightly controlled by the immune response, it has been associated with various malignancies including Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, various B-cell lymphomas linked to immunosuppression, including Post-Transplant Lymphoproliferative Diseases (PTLD), some forms of T-cell lymphomas, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma and gastric cancers (Jha et al., 2016).

Sporadic reactivations leading to the production of viral progeny may occur from latently infected B-lymphocytes in response to physiological factors that are still largely unknown *in vivo*. Reactivation can be induced *ex vivo* by phorbol esters (zur Hausen et al., 1978), calcium ionophores (Faggioni et al., 1986), transforming growth factor beta (TGF- β) (Renzo et al., 1994), sodium butyrate (Luka et al., 1979), hypoxia (Jiang et al., 2006) or following activation of B-cell receptor with antibodies directed against surface immunoglobulins (anti-sIg) (Takada, 1984).

Viral reactivation is a highly coordinated process that is initiated by the expression of two immediate early viral genes, namely BZLF1 (encoding for Zta, Z, Zebra, EB1) and BRLF1 (encoding for Rta, R, EB2) that encode transactivators required for early genes expression. Zta also activates the lytic origin of replication OriLyt. Lytic replication of the viral genomes precedes the expression of late viral proteins that eventually leads to virions assembly and release (Feederle et al., 2000; Murata, 2014). Although B-cell transformation by EBV is usually associated with latently expressed viral oncogenes, there is a need for non-toxic antiviral drugs that can inhibit EBV lytic replication, notably in immunosuppressed patients. Indeed, immunosuppression favors EBV reactivation, thereby increasing viral load and promoting B-cell reinfection and lymphomagenesis. In addition, it has been demonstrated that viral reactivation directly and indirectly contributes to lymphomagenesis both in mouse models and in human (Cohen, 2000;

Hong et al., 2005; Ma et al., 2011; Manners et al., 2018). EBV lytic replication may also contribute to carcinogenesis in epithelial tumors (Wu et al., 2018). Whereas antiviral agents have a limited impact for the treatment of active infections such as infectious mononucleosis, their prophylactic administration resulted in a reduced incidence of PTLD (Hierro et al., 2008; Höcker et al., 2012; Malouf et al., 2002).

So far, antiviral molecules against EBV mainly target viral DNA replication. Nucleosides analogues (acyclovir, ganciclovir) and their prodrugs (valacyclovir, valganciclovir, valomaciclovir), nucleotides (cidofovir) and pyrophosphate (foscavir) analogues that are active against alpha- and/or beta-herpesviruses have been assayed *in vitro* or used experimentally against EBV, but none of them received approval by the Food and Drug Administration nor the European Medicines Agency for the treatment of EBV related diseases (Andrei et al., 2019; Pagano et al., 2018). Therefore, identifying new and non-toxic antiviral drugs capable to inhibit EBV reactivation remains an important challenge.

The recent advance in drug screening technologies helped to identify new molecules. However, the high attrition rates combined with the time and the cost necessary to bring new compounds to the market make new drug development an uncertain process in some specific therapeutic areas and a less desirable choice for pharmaceutical industries and investors. In that context, drug repurposing strategies have been developed to propose new medical indications for either investigational or approved drugs that are outside the scope of the original targets (Pushpakom et al., 2018). This approach permits to reduce both the risk of failure because of safety consideration and the time frame for drug development, thus requiring less investment. To be efficient, however, drug repurposing strategy first requires identifying a candidate molecule for the indication of interest. This systematic approach mostly relies on previously published experimental data describing both pharmacological features and mechanism of action.

Dipyridamole (DIP) (2,6-bis [diethanolamino]-4,8-dipiperidino- pyrimido 5,4-d pyrimidine) is a safe drug with favorable and broad pharmacological properties. Initially, DIP was used as a coronary vasodilator and soon after it was recognized as an antithrombotic agent, what allowed its use for a long time as a prophylactic compound

to prevent strokes and other vascular diseases (Chakrabarti and Freedman, 2008). DIP promotes vasodilatation and inhibits platelet aggregation through two complementary mechanisms: (1) the inhibition of phosphodiesterase (PDE), in particular PDE3 and PDE5 (Gresele et al., 2011), and (2) the blockade of nucleoside transport from the extracellular compartment to the cytoplasm of the cells (Harker and Kadatz, 1983; Knabb et al., 1984). The inhibition of nucleoside uptake into platelets, endothelial and red blood cells leads to an increase of the plasmatic adenosine levels, which in turn activates the adenosine receptors, including the A₂-receptor, thus stimulating adenylate cyclase and the production of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate (cAMP). This effect, concomitant with PDEs inhibition, promotes the elevation of cAMP and cGMP levels in cells, impairing platelet aggregation and promoting arteriolar smooth muscle relaxation (Chakrabarti and Freedman, 2008).

DIP antiviral activity was previously demonstrated against Herpes simplex virus *in vitro* (Tenser et al., 2001) and in a mouse model (Hay et al., 1996) and it was shown to inhibit Mengovirus RNA replication (Fata-Hartley and Palmenberg, 2005). Additionally, in a combined treatment, DIP potentiated the antiviral activity of nucleoside analogues against human immunodeficiency virus (HIV) (Patel et al., 1991).

Cellular nucleotides are essential components required for rapid viral genome replication (Sanchez and Lagunoff, 2015). *In vivo*, nucleotides can be synthesized *de novo* through enzymatic reactions or recycled through the salvage pathway of extracellular nucleosides, refueling the intracellular nucleotide pools (Nyhan, 2014). Since viral transcription and replication rely on the sources of nucleotides from the host cells, the present work aimed at targeting nucleoside uptake with DIP and to characterize its ability to inhibit EBV reactivation.

2. Material and methods

2.1. Antibodies and reagents

Anti-EBV ZEBRA (Zta) (sc-53904), anti-EBV EaD (sc-58121), anti- β actin (sc-47778) were purchased from Santa Cruz and horseradish peroxidase (HRP) linked-secondary antibody (#7076) was from Cell Signaling Technology. Dipyridamole (D9766), adenosine (A9251), thymidine (T9250), S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR) (N2255) and

dimethyl sulfoxide (DMSO) (D2650) were purchased from Sigma-Aldrich and H89 was purchased from Biomol GmbH. DIP, NBMPR and H89 stock solutions were dissolved in DMSO, adenosine and thymidine were dissolved in water.

2.2. Cell lines and treatments

Akata, Mutu-I and B95.8 cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum and 2 mM L-glutamine (Life Technologies) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. All cell culture media and supplements were obtained from Gibco (Thermo Fisher Scientific). EBV reactivation in Mutu-I cells was induced by treating cells for eight hours with 2 ng/ml TGF- β (Eurobio). EBV reactivation in Akata cells was triggered by the crosslinking of the surface immunoglobulins with 7,5 μ g/mL polyclonal rabbit anti-human IgG (α -slg) (A0423, Dako) for five, eight or twenty-four hours for viral RNA, proteins or genomic viral DNA (gDNA)/virion production analysis, respectively. The cells were treated with DIP and/or adenosine or thymidine for the indicated times and concentrations. The cells were treated with NBMPR at the indicated drug concentrations for four hours prior addition of α -slg. H89 was used at 5 μ M and added one hour prior the addition of DIP. The absence of DIP toxicity was assessed by Trypan blue exclusion counting in light microscopy and propidium iodide (Molecular Probes, Life Technology, Cergy Pontoise, France) staining followed by flow cytometry detection. Treatment with 0.01% Triton-X100 was used as a positive control to assess membrane permeabilization to propidium iodide.

2.3. RNA extraction and RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted and purified from cell cultures using TRIzol reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. Seven micrograms of purified RNA were submitted to DNase treatment using TURBO DNA-free kit (Life technologies). Then, 1.5 micrograms of DNase-treated RNA were reverse-transcribed to cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR was performed using SensiFAST SYBR No-Rox Kit (Bioline) and the primers are listed in Supplementary table 1. Cellular β globin RNA

levels were used as an internal control to normalize viral mRNA and fold-changes were calculated by using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method.

2.4. Analysis of virion production and intracellular viral DNA

Total intracellular DNA was isolated from cell cultures using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions as described previously with some modifications (Masud et al., 2017). Intracellular viral DNA was quantified by real-time PCR using primers for BHRF1 (table I) and β globin as an internal control. Fold-changes were calculated by using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method. For virion production analysis, cell cultures supernatants were collected and treated with DNase I (New England BioLabs) to eliminate naked free DNA. To estimate EBV virion production, real-time PCR was performed using primers for BHRF1 and the absence of amplification for β globin was used as control of external DNA elimination. Fold-changes were calculated by using the $2^{(-\Delta\text{CT})}$ formula.

2.5. Western blot analysis

Cells were washed twice in PBS and lysed for 30 minutes at 4°C in denaturing lysis buffer [50 mM Tris HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 2 % 2-mercaptoethanol]. Proteins were resolved on 12 % SDS-PAGE and blotted on to PVDF membranes (Amersham; GE Healthcare Life Sciences). Membranes were saturated by non-fat dried milk and antigens revealed by immunoblotting overnight at 4°C using the following primary antibodies: mouse monoclonal IgG anti-Zta (1:1000), mouse monoclonal IgG anti-EA-D (1:1000) and mouse monoclonal IgG anti- β -actin (1:5000). Primary antibodies were detected by an anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (1:10000) and antigens revealed using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham; GE Healthcare Life Sciences) and X-ray film exposure (Carestream Kodak BioMax light film). Digital images were collected, and band intensities measured using ImageJ software and normalized to β -actin signal. Western blots are representative of 3 independent experiments.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla). The level of significance was determined with a one-way analysis of variance test (ANOVA)

followed by Bonferroni's multiple comparisons test. p -value < 0.05 was considered statistically significant difference.

3. Results

3.1. DIP inhibits spontaneous and induced EBV reactivation

Akata is a well-characterized EBV-positive Burkitt's lymphoma-derived cell line in which EBV reactivation can be induced with antibodies directed against surface immunoglobulins (anti-slg/ α -slg), a process that mimics physiological reactivation following B cell receptor-mediated stimulation (Takada, 1984). Following this treatment, around 15 % of the cells enter reactivation, as observed by flow cytometry immunodetection of the proteins Zta and EA-D (data not shown).

To investigate DIP antiviral activity, Akata cells were incubated with increasing concentration of DIP prior to reactivation. Preliminary experiments indicated that a four hours pre-treatment was optimal (Supp. Fig. 1A and B). The production of virus particles was monitored by quantifying virion DNA in the cell culture supernatant after 24 hours reactivation. As illustrated in figure 1A, virion production was inhibited in a dose-dependent manner. Importantly, cell viability was not affected when Akata cells were grown in the presence of up to 20 μ M DIP for 48 hours (Supp. Fig. 1C and 1D). Moreover, DIP concentrations used herein are in the range attained after oral administration in humans (Grem and Fischer, 1989).

B95-8 is an EBV positive marmoset B-cell line in which a minority of cells spontaneously enters into reactivation. Treatment of B95.8 cells with DIP also resulted in a significant decrease in virus production albeit to a lesser extent (Fig. 1B). This lower antiviral activity was expected since only 3 to 5% of cells expressed lytic antigens before treatment (data not shown).

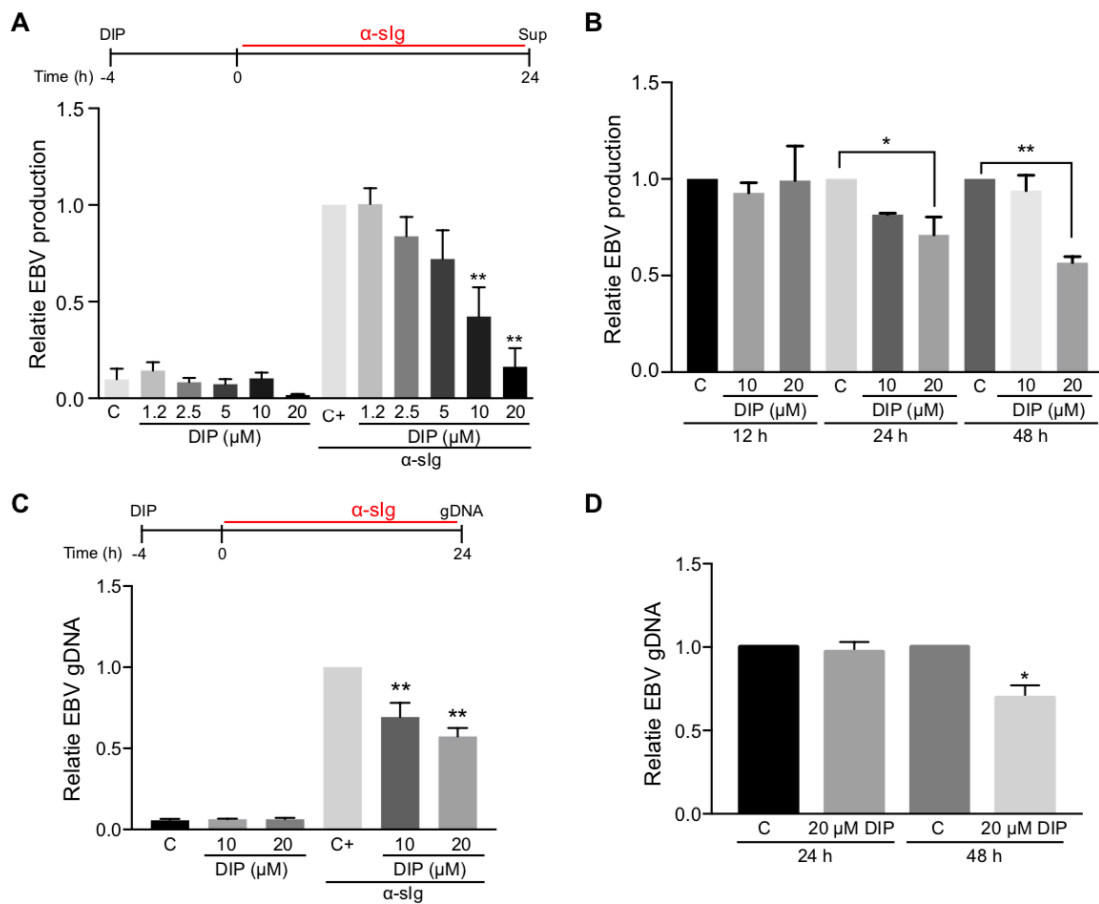


Figure 1. Dipyridamole inhibits virion release and EBV DNA replication in a dose-dependent manner. (A and C) Akata cells were exposed for 4 hours to the indicated DIP concentrations and then EBV reactivation induced or not by anti-slg (α -slg) treatment for 24 h. Column “C” corresponds to the control mock-treated cells. Column “C+” corresponds to the control mock-treated cells in which EBV reactivation was induced by the crosslinking of the surface immunoglobulins. (B and D) Spontaneously reactivating B95.8 cells were exposed for the indicated times to 10 or 20 μ M DIP. Columns “C” correspond to the control mock-treated B95.8 cells. On panels A and B, cell culture supernatants were collected and subjected to real-time PCR for quantifying relative EBV production (virion release). On panels C and D, intracellular viral genomic DNA (gDNA) was collected and subjected to real-time PCR for quantifying viral replication. For Akata cells (A and C), treatment with anti-slg alone was considered as the reference for EBV reactivation and normalized to 1 (columns “C+”). For the spontaneously reactivating B95.8 cells (B and D), mock-treated cells were considered as the reference for EBV reactivation and normalized to 1 (columns “C”). All graphics represent the average \pm SEM of 3 independent experiments. On each panel, p values were calculated using a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical significance (p value) was indicated by * ($P < 0.05$) and ** ($P < 0.01$).

3.2. DIP inhibits viral lytic replication as well as early and immediate early gene expression

To further characterize DIP antiviral activity, we evaluated its effect on viral DNA replication. For this purpose, intracellular viral DNA was extracted from Akata cells and quantified following reactivation in the presence or absence of DIP. Whereas DIP had not significant effect on latent genomes (i.e. non-reactivated cells), the treatment significantly repressed viral replication following reactivation (Fig. 1C). Accordingly, DIP also repressed viral replication in B95.8 cells (Fig. 1D).

During the lytic phase of the cycle, the replication of EBV genomes is placed under the control of immediate early and early viral proteins, including viral DNA polymerase, auxiliary factors and the viral transacting factor Zta. The expression of early (EA-D) and immediate early (Zta) proteins was analyzed by immunoblotting following 8 hours reactivation in the presence of increasing concentrations of DIP. As shown in figure 2A, a significant dose-dependent inhibition of both early and immediate early proteins was observed. Inhibition reached 80 and 90 %, respectively, for the highest dose of DIP in Akata cells whereas a 50 and 40 % decrease in EA-D and Zta protein expression, respectively, was observed in B95.8 cells at 48 hours for the highest concentration of DIP (Fig. 2B). Importantly, this effect of DIP was not limited to B cells in which EBV reactivation is induced by antibodies directed against surface immunoglobulins or observed spontaneously. DIP indeed showed a similarly strong inhibitory effect on the Zta protein expression levels that is induced by TGF- β in Mutu-I cells, an EBV-positive Burkitt's lymphoma-derived cell line expressing both TGF- β receptors I and II (Supp. Fig. 1E). These results suggest that DIP acts on EBV reactivation independently of the activation pathway.

We next wondered whether early and immediate early protein accumulation was inhibited at the transcriptional or translational level. For this purpose, a quantitative reverse transcription PCR-based assay was designed to measure the expression of viral (immediate early BZLF1, which encodes for Zta transactivator; early genes BMRF1 and BHRF1, which encode for EA-D and EA-R, respectively) and cellular genes (β -globin, β -actin and cyclophilin). As shown in figure 2C, DIP significantly repressed viral genes transcription following reactivation. This effect was specific since expression of control

cellular genes was unaffected in the same conditions. It is to note that repression of early transcription was expected since early genes expression is placed under the control of immediate early proteins Zta and Rta, whose expression was strongly inhibited by DIP.

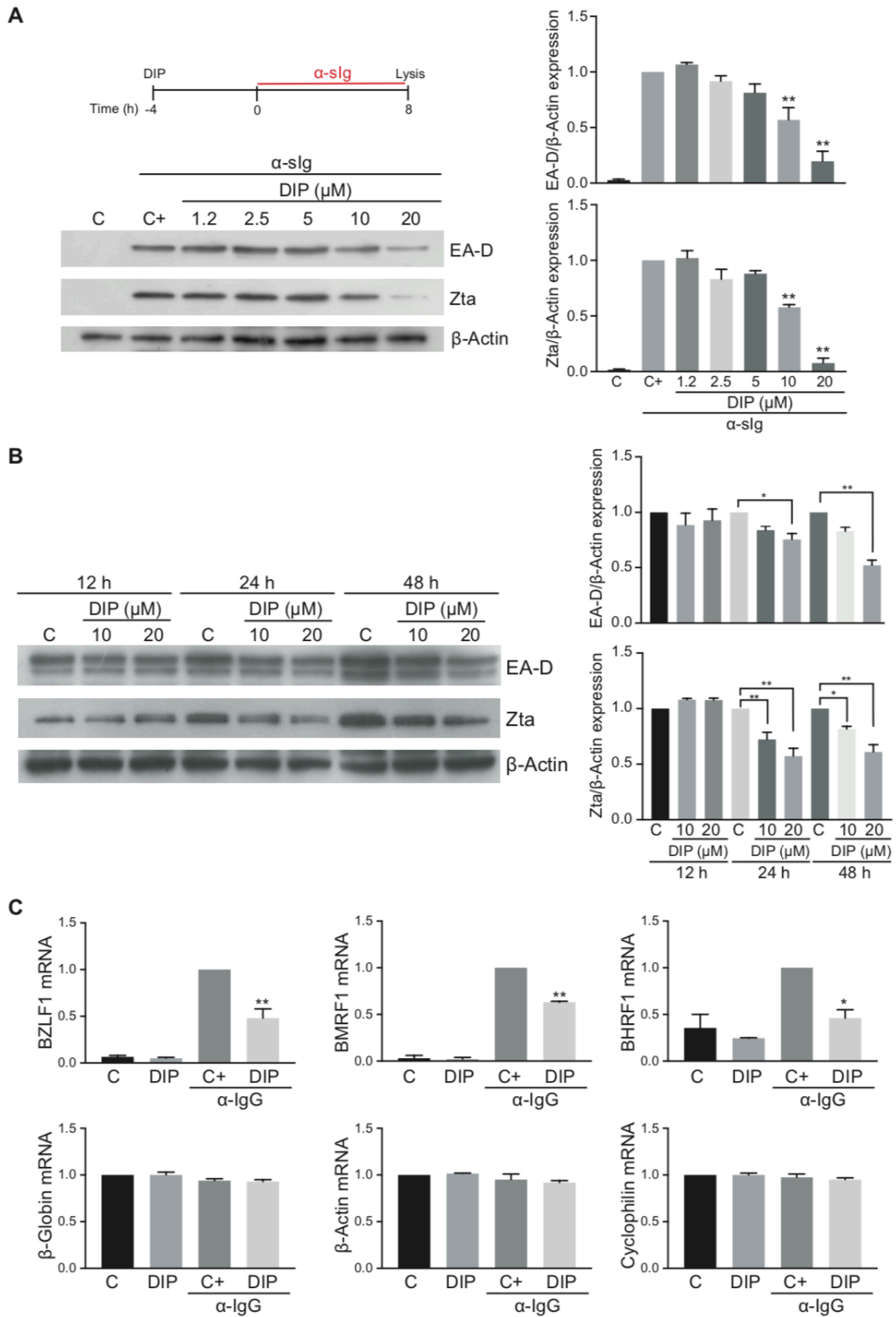


Figure 2. EBV immediate-early and early gene expression is impaired in a dose-dependent manner. (A) Akata cells were exposed for 4 hours to the indicated DIP concentrations and then EBV reactivation induced or not by anti-slg (α -slg) treatment for 8 hours. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabelling with antibodies directed against EA-D, Zta and β -actin. β -actin was used as a loading control. Column “C” corresponds to the control mock-treated cells. Column “C+” corresponds to the control mock-treated cells in which EBV reactivation was induced by the crosslinking of the surface immunoglobulins. (B) Spontaneously reactivating B95.8 cells were exposed for the indicated times to 10 or 20 μ M DIP. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabelling with antibodies directed against EA-D, Zta and β -actin. β -actin was used as a loading control. Columns “C” correspond to the control mock-treated B95.8 cells. On A and B (right panels), digital images were collected, band intensities measured and normalized to β -actin signal. For Akata cells (A), treatment with anti-slg alone was considered as the reference for EBV reactivation and the ratio of either EA-D or Zta versus β -globin signals were normalized to 1 (columns “C+”). For the spontaneously reactivating B95.8 cells (B), mock-treated cells were considered as the reference for EBV reactivation and the ratio of either EA-D or Zta versus β -globin signals were normalized to 1 (columns “C”). (C) Akata cells were exposed for 4 hours to 20 μ M DIP concentrations and then EBV reactivation induced or not by anti-slg (α -slg) treatment for 5 hours. Total RNA were prepared and the expression levels of the immediate-early (BZLF1) and early (BMRF1 and BHRF1) EBV mRNAs as well as host genes (β -globin, β -actin and cyclophilin) analyzed by quantitative RT-PCR. For the EBV mRNA tested here (BZLF1, BMRF1, BHRF1), cells treated with anti-slg alone were considered as the reference and the quantified mRNA levels normalized to 1 for each gene analyzed (columns “C+”). For the cellular host mRNA (β -globin, β -actin, cyclophilin), mock-treated cells were considered as the reference and the quantified mRNA levels normalized to 1 for each gene analyzed (columns “C”). All graphics represent the average \pm SEM of 3 independent experiments. On each panel, p values were calculated using a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical significance (p value) was indicated by * (P<0.05) and ** (P<0.01).

3.3. DIP antiviral activity is associated with its capability to inhibit nucleosides uptake

Our data suggested that DIP could act upstream viral genes transcription. DIP is indeed a known inhibitor of phosphodiesterases (PDE) (Gresele et al., 2011), leading to an increase of intracellular concentration of cAMP with possible effect on the cAMP/PKA signaling pathway. However, an activation of the cAMP/PKA-dependent pathway by DIP was unlikely to explain DIP antiviral activity since, in our model, its effect on EBV

reactivation was not affected by the PKA inhibitor H89 which acts downstream DIP in this specific pathway (Supp. Fig. 1F).

Since DIP was reported to interfere with nucleotide metabolism by potently and directly inhibiting equilibrative nucleoside transporters (especially ENT1 and ENT2), we next wondered whether DIP inhibition of nucleoside uptake may explain its antiviral activity. To test this hypothesis, we first evaluated the impact of S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBMPR), an inhibitor of ENT1 (Griffiths et al., 1997), on immediate early and early protein expression. As shown on figure 3A, NBMPR significantly repressed Zta and EA-D accumulation. The effect may be lower than DIP-mediated inhibition because NBMPR promotes the inhibition of ENT1 but not ENT2, which are both sensitive to DIP (Boswell-Casteel and Hays, 2017; Wang et al., 2013). If DIP antiviral activity was indeed associated with its ability to inhibit nucleoside transport, we assumed that this process could be reversed if the cells were reactivated in the presence of a large excess of either adenosine or thymidine, therefore promoting a competition for the binding to the transporters. To test this assumption, Akata cells were treated with DIP in the presence of 100 μ M adenosine or thymidine for 4 hours prior to treatment with anti-slg. Then, the expression of viral proteins was analyzed by immunoblotting following 8 hours reactivation. As shown on figure 3B, both adenosine and thymidine reversed DIP inhibition of Zta and EA-D expression, although this effect seemed to be less effective on Zta than on EA-D. Importantly, when given alone, neither adenosine nor thymidine induced EBV reactivation or interfered with it (Fig. 3C). Altogether, these data confirmed that DIP antiviral activity on EBV reactivation was related to its ability to prevent nucleosides import.

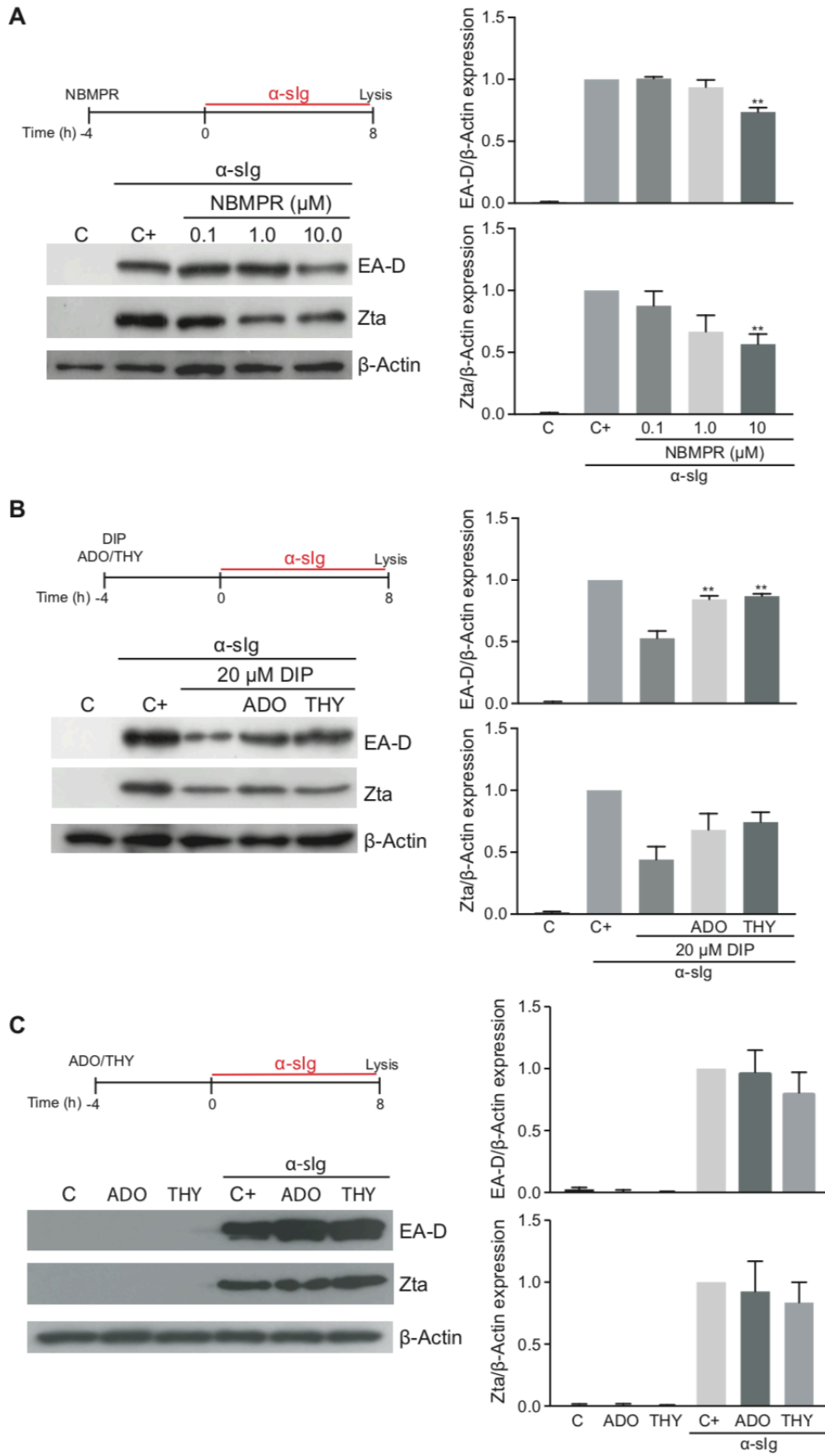


Figure 3. Dipyridamole antiviral activity is related to its ability to block nucleoside uptake. (A) Akata cells were exposed for 4 hours to the indicated NBMPR concentrations and then EBV reactivation induced or not by anti-slg (α -slg) treatment for 8 hours. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabelling with antibodies directed against EA-D, Zta and β -actin. β -actin was used as a loading control. Column "C" corresponds to the control mock-treated cells. Column "C+" corresponds to the control mock-treated cells in which EBV reactivation was induced by the crosslinking of the surface immunoglobulins. (B) Akata cells were exposed for 4 hours to 20 μ M DIP in the presence or absence of 100 μ M adenosine (ADO) or thymidine (THY) and then EBV reactivation induced or not by anti-slg (α -slg) treatment for 8 hours. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabelling with the indicated antibodies. β -actin was used as a loading control. Column "C" corresponds to the control mock-treated cells. Column "C+" corresponds to the control mock-treated cells in which EBV reactivation was induced by the crosslinking of the surface immunoglobulins. (C) Akata cells were incubated for 4 hours in the presence or absence of 100 μ M adenosine (ADO) or thymidine (THY) and then EBV reactivation induced or not by anti-slg (α -slg) treatment for 8 hours. Total protein extracts were prepared and analyzed by immunolabelling with the indicated antibodies. β -actin was used as a loading control. Column "C" corresponds to the control mock-treated cells. Column "C+" corresponds to the control mock-treated cells in which EBV reactivation was induced by the crosslinking of the surface immunoglobulins. For A, B and C, digital images were collected from immunoblots, band intensities measured and normalized to β -actin signal (right panels). Treatment with anti-slg alone was considered as the reference for EBV reactivation and the ratio of either EA-D or Zta versus β -globin signals were normalized to 1 (columns "C+"). All graphics represent the average \pm SEM of 3 independent experiments. On each panel, p values were calculated using a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical significance (p value) was indicated by * (P<0.05) and ** (P<0.01).

4. Discussion and conclusions

Although several drugs have been successfully evaluated for their ability to inhibit EBV replication *ex vivo*, their clinical use has been limited so far. It was initially suggested to use antivirals against EBV in clinical situations where active EBV replication was supposedly associated with the clinical symptoms, such as infectious mononucleosis (IM). However, antiviral proved to have only a limited interest in this setting. Indeed although acyclovir, a nucleoside analog, efficiently reduced EBV shedding in the saliva during IM, it was not associated with a clear clinical benefit (Pagano et al., 2018).

Although EBV-associated tumors are mainly linked to latently expressed oncogenes, a growing set of basic and clinical evidence suggested that EBV lytic replication might also directly and indirectly contribute to EBV-associated lymphomagenesis. This is notably supported by experimental data demonstrating that EBV mutants unable to undergo lytic viral replication were defective in promoting EBV-mediated lymphoproliferative disease in severe combined immunodeficient mice (Hong et al., 2005). This observation was, at least in part, explained by the increased production of B-cell growth factors, such as cellular IL-10, viral IL-10 and cellular IL-6 in response to EBV infection by wild-type viruses compared to Zta-knock out mutants. The contribution of lytic expression to the development of lymphomas was further confirmed in a model of humanized mouse model, in which both human fetal CD34 hematopoietic stem cells and thymus/liver tissue were transplanted (Ma et al., 2011).

The benefit of antivirals to prevent EBV primo-infection in high-risk patients and/or PTLD is supported by several clinical investigations. Antiviral prophylaxis with ganciclovir or valganciclovir resulted in a significant decrease in EBV primary infections in a group of EBV-negative pediatric renal transplant receiving a graft from EBV-positive donors (Höcker et al., 2012). Malouf and colleagues reported a reduction in the incidence of PTLD in high-risk EBV-seronegative lung transplant recipients who received a continuous, specific anti-viral prophylaxis with acyclovir, valacyclovir or ganciclovir (Malouf et al., 2002). Another study reported that antiviral prophylaxis could prevent late onset PTLD (Ville et al., 2018). Antiviral inhibiting lytic EBV replication may also be advantageous for treating epithelial tumors, such as EBV-positive nasopharyngeal carcinoma where lytic proteins have been proved to directly contribute to carcinogenesis (Wu et al., 2018; Yoshizaki et al., 2008). Importantly, antiviral therapies might be more effective if they target the expression of immediate early and early proteins. Indeed, Zta and Rta have been shown to promote IL-6 secretion, a cytokine that has been involved in a variety of hematological and epithelial cancers (Jones et al., 2007). Moreover, lytically infected B-cells secrete cytokines, including cellular IL-10, viral IL-10 and VEGF, capable to promote B-cell proliferation and angiogenesis (Beatty et al., 1997; Hong et al., 2005).

Most of the antiviral therapies target the virus directly, for example impairing the activity of the virus-encoded enzymes and decreasing the virus production. However, emerging adaptive mutations of the viral genome leads to drug resistance, remaining one of the major causes of reduced effectiveness (De Clercq and Li, 2016). Considering that viruses interplay with cellular signaling pathways (Altmann and Hammerschmidt, 2005; Boulant et al., 2015) and rely on the cellular supply of metabolites to ensure productive infection (Sanchez and Lagunoff, 2015), cellular mechanisms have gained increasing interest as targets for novel antiviral therapies (Planz, 2013; Scheuch et al., 2018). Hereof, EBV reactivation was shown to be repressed by the inhibition of Cyclin-Dependent Kinase in B cells (Kudoh et al., 2004) and by targeting p38 Mitogen-Activated Protein Kinase pathway (Gao et al., 2004; Matusali et al., 2009). Thereby, antiviral compounds targeting cellular pathways present the potential of broad-spectrum activity and are still welcome.

In that sense, we here report that DIP, a safe and widely used drug, could prevent EBV reactivation from B-cell lines and inhibit immediate early protein Zta expression. Based on the central role played by this protein in EBV reactivation, its transcriptional (and therefore translational) inhibition is indeed expected to have a major impact on the lytic cycle. However, the regulation of BZLF1 transcription is still puzzling and several hypotheses can be proposed. First, DIP might act on the signaling pathways that activate BZLF1. Nonetheless, here, this hypothesis is very unlikely since DIP antiviral activity was observed in three distinct situations: (1) spontaneous reactivation in B95.8 cells, (2) activation of B-cell receptor in Akata cells and (3) induction by TGF- β dependent pathway in Mutu-I cells (Kenney and Mertz, 2014). Second, DIP may inhibit the regulation of BZLF1 promoter. It is indeed regulated through a complex interplay between cellular trans-activating factors (TF) and CpG methylation occurring on specific binding sites within the BZLF1 promoter (Li et al., 2016). In this model, DIP would inhibit the BZLF1 promoter activation by modulating one or several TF binding, although there is no experimental evidence so far for such hypothesis. Third, DIP antiviral activity would be mostly due to its ability to block nucleoside import. This assumption is strongly supported by our data demonstrating that (1) DIP-mediated EBV inhibition could be reversed by an excess of extracellular adenosine or thymidine and (2) EBV reactivation

could be inhibited by an independent class of equilibrative nucleoside transporters inhibitor, NBMPR. DIP would so interfere with the high nucleotide demand that is required for viral transcription and replication as it was previously described for Herpes simplex virus (Sanchez and Lagunoff, 2015). Interestingly, one might also suggest that DIP may directly act on viral RNA synthesis. Previous report indeed showed that DIP can reversibly inhibit RNA synthesis in a viral *in vitro* transcription system (Fata-Hartley and Palmenberg, 2005). Taken together, our data as well as those published by others suggest that DIP antiviral activity is likely to be a multifactorial process even if its ability to interfere with nucleoside uptake appears to be a key determinant of its anti-EBV activity. The relative importance of salvage versus *de novo* nucleotides synthesis for viral and host nucleic acids metabolism is however still unclear and the precise characterization of the molecular mechanisms underlying DIP antiviral activity deserves a more detailed examination.

Compared to the several studies focused on the antioxidant (Ciacciarelli et al., 2015) and anticancer (Liu et al., 2014; Spano et al., 2013; Thomé et al., 2019) properties of DIP, its antiviral activity has been poorly explored. Of pharmacological importance, here, is the fact that antiviral nucleosides analogs use different membranous transporters to enter cells than those targeted by DIP to block the nucleosides uptake (Pastor-Anglada et al., 2005). Therefore, DIP is likely not to interfere with the import of this important class of antiviral compounds. On the contrary, combining nucleosides analogs with DIP might potentiate their antiviral activity by increasing the incorporation of their phosphorylated metabolites into the viral DNA. In that sense, it was described that DIP potentiates the antiviral activity of dideoxynucleoside drugs against HIV, probably by inhibiting the salvage of competing physiological nucleosides (Patel et al., 1991). Importantly, DIP concentrations used in the present study were also close to the range of the plasma concentration attained after oral administration in humans (Grem and Fischer, 1989). Remarkably, overdose case reports showed that higher DIP doses might effectively be tolerated in humans, suggesting that even higher dosing could be used in new clinical settings (Lagas et al., 2011). As a drug repurposing strategy, DIP holds so the benefit that it could be readily translated into clinical trials, when given alone or in combinations with other classes of antiviral molecules. Finally, it is worthy to

proceed with additional studies to determine whether DIP has a broad inhibitory effect on other families of viruses.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

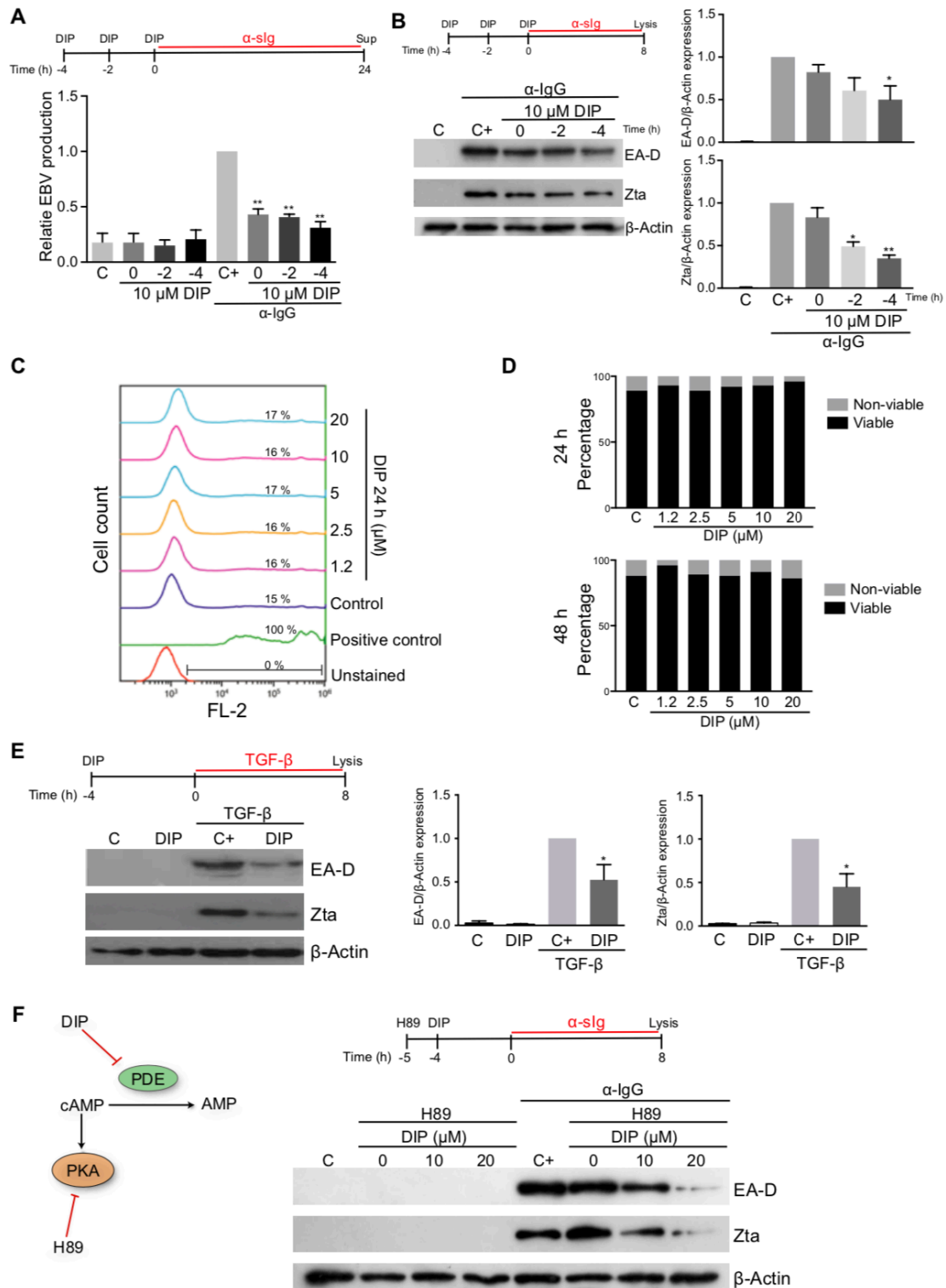
Funding/acknowledgments

This work was supported by CAPES/COFECUB (French-Brazilian collaborative research grant No. Me917/18), ICGEB/CNPq 405231/2015-6 and by ANRS. Marcos Thomé was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES), Brasil. Chloé Borde was supported by Sorbonne Université as an ATER.

Supplementary table 1

Real-time PCR primer sequences

Target	Forward primer 5'->3'	Reverse primer 5'->3'
BZLF1	TGAACAGTAGAATTGTCTCCAGGT	CCTCAGCTGTTCCCAGTCTC
BHRF1	GGAGATACTGTTAGCCCTG	GTGTGTTATAAATCTGTTCCAAG
BMRF1	AGGAGTGCTGCAGGTAAACC	GCTCTGGTGATTCTGCCACT
β -globin	TAGCAACCTCAAACAGACACCA	CAGCCTAAGGGTGGGAAAAT
Cyclophilin	GCCTTAGCTACAGGAGAGAA	TTTCCTCCTGTGCCATCTC
β -actin	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	GGACTTCGAGCAAGAGATGG



Supplementary figure 1.

Panels A and B show the effect of varying the time of DIP pre-incubation on EBV reactivation. Akata cells were exposed for 0, 2 or 4 hours to 10 μ M DIP and then EBV reactivation induced or not by anti-slg treatment for 24 h. Cell culture supernatants were collected after 24 h reactivation and subjected to real-time PCR for quantifying relative EBV production (virion release, panel A). Treatment with anti-slg alone was considered as the reference for EBV reactivation and normalized to 1 (column "C+").

Column "C" corresponds to the control mock-treated cells. Alternatively, total protein extracts were prepared after 8 h reactivation and analyzed by immunolabelling with antibodies directed against EA-D, Zta and β -actin. β -actin was used as a loading control (panel B). Digital images were collected, band intensities measured and normalized to β -actin signal. Treatment with anti-slg alone was considered as the reference for EBV reactivation and the ratio of either EA-D or Zta versus β -globin signals were normalized to 1 (columns "C+"). Column "C" corresponds to the control mock-treated cells. Plots, on the right of panel B, represent the average \pm SEM of 3 independent experiments. P values were calculated using a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical significance (p value) was indicated by * (P<0.05) and ** (P<0.01).

Panels C and D evaluate the toxicity of DIP on non-induced Akata cells. The viability of the Akata cells treated with increasing concentrations of DIP was evaluated by either propidium iodide staining followed by flow cytometry analysis (panel C) or trypan blue exclusion test (panel D). Cells were incubated for 24 to 48 hours at the indicated DIP concentrations (1.2, 2.5, 5, 10 and 20 μ M). On panel C, mock-treated cells served as a control and 0.01% Triton-X100-treated cells as a positive control for membrane dysfunction. On panel D, column "C" corresponds to the control mock-treated cells.

Panel E shows the effect of DIP on Zta and EA-D protein expression levels in Mutu-I cells reactivated by TGF- β . Mutu-I cells were exposed or not for 4 hours to 20 μ M DIP and then EBV reactivation induced or not by 2 ng/ml TGF- β . Total protein extracts were prepared after 8 h reactivation and analyzed by immunolabelling with antibodies directed against EA-D, Zta and β -actin. β -actin was used as a loading control. Digital images were collected, band intensities measured and normalized to β -actin signal. Treatment with TGF- β alone was considered as the reference for EBV reactivation and the ratio of either EA-D or Zta versus β -globin signals were normalized to 1 (columns "C+"). Plots, on the right of panel E, represent the average \pm SEM of 3 independent experiments. P values were calculated using a one-way analysis of variance test (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Statistical significance (p value) was indicated by * (P<0.05) and ** (P<0.01).

Panel F shows that DIP inhibition of EBV reactivation is not mediated through its phosphodiesterase inhibiting activity and cAMP/PKA signaling. As shown on the schematic representation, DIP inhibits phosphodiesterases activity and leads to the accumulation of cAMP, triggering PKA activation. The PKA inhibitor H89 should interfere with DIP if the antiviral activity of DIP is mediated through cAMP/PKA signaling. Akata cells were pre-incubated for 1 hour with 5 μ M of the PKA inhibitor H89 (columns 2 to 4 and 6 to 8) and then exposed to either 0 (columns 2 and 6), 10 (columns 3 and 7) or 20 (columns 4 and 8) μ M DIP for 4 hours. EBV reactivation was subsequently induced by anti-slg treatment for 8 hours (columns 5 to 8) and cell extracts subjected to immunoblot analysis with the indicated antibodies. Column "C" corresponds to the control mock-

treated cells. Column "C+" corresponds to the control mock-treated cells in which EBV reactivation was induced by the crosslinking of the surface immunoglobulins. H89 when given alone (column 6) does not affect EBV reactivation (compare column 6 to column 5) as DIP did (columns 7 and 8). When combined with DIP, H89 does not interfere with its antiviral activity.

References

- Altmann, M., Hammerschmidt, W., 2005. Epstein-Barr Virus Provides a New Paradigm: A Requirement for the Immediate Inhibition of Apoptosis. *PLoS Biol.* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030404>
- Andrei, G., Trompet, E., Snoeck, R., 2019. Novel Therapeutics for Epstein–Barr Virus. *Molecules* 24, 997. <https://doi.org/10.3390/molecules24050997>
- Beatty, P.R., Krams, S.M., Martinez, O.M., 1997. Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J. Immunol.* 158, 4045–4051.
- Boswell-Casteel, R.C., Hays, F.A., 2017. Equilibrative nucleoside transporters - A review. *Nucleos Nucleot Nucl.* 36, 7–30. <https://doi.org/10.1080/15257770.2016.1210805>
- Boulant, S., Stanifer, M., Lozach, P.-Y., 2015. Dynamics of Virus-Receptor Interactions in Virus Binding, Signaling, and Endocytosis. *Viruses* 7, 2794–2815. <https://doi.org/10.3390/v7062747>
- Chakrabarti, S., Freedman, J.E., 2008. Dipyridamole, cerebrovascular disease, and the vasculature. *Vascul. Pharmacol.* 48, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2007.12.004>
- Chiu, Y.-F., Sugden, B., 2016. Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annu. Rev. Virol.* 3, 359–372. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042358>
- Ciacciarelli, M., Zerbinati, C., Violi, F., Iuliano, L., 2015. Dipyridamole: a drug with unrecognized antioxidant activity. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 822–829. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150220111942>
- Cohen, J.I., 2000. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 343, 481–492. <https://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>
- De Clercq, E., Li, G., 2016. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
- Faggioni, A., Zompetta, C., Grimaldi, S., Barile, G., Frati, L., Lazdins, J., 1986. Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *Science* 232, 1554–1556. <https://doi.org/10.1126/science.3012779>
- Fata-Hartley, C.L., Palmenberg, A.C., 2005. Dipyridamole Reversibly Inhibits Mengovirus RNA Replication. *J. Virol.* 79, 11062–11070. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11062-11070.2005>
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., Delecluse, H.J., 2000. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the cooperative functions of two transactivators. *EMBO J.* 19, 3080–3089. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.3080>
- Gao, X., Wang, H., Sairenji, T., 2004. Inhibition of Epstein-Barr Virus (EBV) Reactivation by Short Interfering RNAs Targeting p38 Mitogen-Activated Protein Kinase or c-myc in EBV-Positive Epithelial Cells. *J. Virol.* 78, 11798–11806. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11798-11806.2004>
- Grem, J.L., Fischer, P.H., 1989. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole. *Pharmacol. Ther.* 40, 349–371. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90084-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90084-3)
- Gresele, P., Momi, S., Falcinelli, E., 2011. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 72, 634–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2125.2011.04034.x

- Griffiths, M., Beaumont, N., Yao, S.Y.M., Sundaram, M., Boumah, C.E., Davies, A., Kwong, F.Y.P., Coe, I., Cass, C.E., Young, J.D., Baldwin, S.A., 1997. Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the Cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat. Med.* 3, 89. <https://doi.org/10.1038/nm0197-89>
- Harker, L.A., Kadatz, R.A., 1983. Mechanism of action of dipyridamole. *Thromb. Res., Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Approach to Antithrombotic Therapy* 29, 39–46. [https://doi.org/10.1016/0049-3848\(83\)90356-0](https://doi.org/10.1016/0049-3848(83)90356-0)
- Hay, K.A., Gaydos, A., Tenser, R.B., 1996. Inhibition of herpes simplex virus reactivation by dipyridamole in a mouse model. *J. Med. Virol.* 50, 198–203. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199610\)50:2<198::AID-JMV15>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199610)50:2<198::AID-JMV15>3.0.CO;2-I)
- Hierro, L., Díez-Dorado, R., Díaz, C., Vega, A.D. la, Frauca, E., Camarena, C., Muñoz-Bartolo, G., Zárate, A.G. de, Santamaría, M.L., Jara, P., 2008. Efficacy and safety of valganciclovir in liver-transplanted children infected with Epstein-Barr virus. *Liver Transpl.* 14, 1185–1193. <https://doi.org/10.1002/lt.21498>
- Höcker, B., Böhm, S., Fickenscher, H., Küsters, U., Schnitzler, P., Pohl, M., John, U., Kemper, M.J., Fehrenbach, H., Wigger, M., Holder, M., Schröder, M., Feneberg, R., Köpf-Shakib, S., Tönshoff, B., 2012. (Val-)Ganciclovir prophylaxis reduces Epstein-Barr virus primary infection in pediatric renal transplantation. *Transpl. Int.* 25, 723–731. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2012.01485.x>
- Hong, G.K., Gulley, M.L., Feng, W.-H., Delecluse, H.-J., Holley-Guthrie, E., Kenney, S.C., 2005. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J. Virol.* 79, 13993–14003. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13993-14003.2005>
- Hutt-Fletcher, L.M., 2014. Epstein–Barr virus replicating in epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16242–16243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418974111>
- Jha, H.C., Pei, Y., Robertson, E.S., 2016. Epstein–Barr Virus: Diseases Linked to Infection and Transformation. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01602>
- Jiang, J.-H., Wang, N., Li, A., Liao, W.-T., Pan, Z.-G., Mai, S.-J., Li, D.-J., Zeng, M.-S., Wen, J.-M., Zeng, Y.-X., 2006. Hypoxia can contribute to the induction of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 37, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.06.013>
- Jones, R.J., Seaman, W.T., Feng, W.-H., Barlow, E., Dickerson, S., Delecluse, H.-J., Kenney, S.C., 2007. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int. J. Cancer* 121, 1274–1281. <https://doi.org/10.1002/ijc.22839>
- Kenney, S.C., Mertz, J.E., 2014. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* 26, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.01.002>
- Knabb, R.M., Gidday, J.M., Ely, S.W., Rubio, R., Berne, R.M., 1984. Effects of dipyridamole on myocardial adenosine and active hyperemia. *Am. J. Physiol.* 247, H804-810. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1984.247.5.H804>
- Kudoh, A., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Fujita, M., Kiyono, T., Nishiyama, Y., Tsurumi, T., 2004. Inhibition of S-Phase Cyclin-Dependent Kinase Activity Blocks Expression of Epstein-Barr Virus Immediate-Early and Early Genes, Preventing Viral Lytic Replication. *J. Virol.* 78, 104–115. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.1.104->

- Lagas, J.S., Wilhelm, A.J., Vos, R.M., van den Dool, E.-J., van der Heide, Y., Huissoon, S., Beijnen, J.H., Brandjes, D.P.M., 2011. Toxicokinetics of a dipyrindamole (Persantin) intoxication: case report. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 74–78. <https://doi.org/10.1177/0960327110368696>
- Li, H., Liu, S., Hu, J., Luo, X., Li, N., M.Bode, A., Cao, Y., 2016. Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 12, 1309–1318. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16564>
- Liu, X.-J., Zheng, Y.-B., Li, Y., Wu, S.-Y., Zhen, Y.-S., 2014. A Multifunctional Drug Combination Shows Highly Potent Therapeutic Efficacy against Human Cancer Xenografts in Athymic Mice. *PLOS ONE* 9, e115790. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115790>
- Luka, J., Kallin, B., Klein, G., 1979. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* 94, 228–231. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90455-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90455-0)
- Ma, S.-D., Hegde, S., Young, K.H., Sullivan, R., Rajesh, D., Zhou, Y., Jankowska-Gan, E., Burlingham, W.J., Sun, X., Gulley, M.L., Tang, W., Gumperz, J.E., Kenney, S.C., 2011. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J. Virol.* 85, 165–177. <https://doi.org/10.1128/JVI.01512-10>
- Malouf, M.A., Chhajed, P.N., Hopkins, P., Plit, M., Turner, J., Glanville, A.R., 2002. Anti-viral prophylaxis reduces the incidence of lymphoproliferative disease in lung transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.* 21, 547–554. [https://doi.org/10.1016/S1053-2498\(01\)00407-7](https://doi.org/10.1016/S1053-2498(01)00407-7)
- Manners, O., Murphy, J.C., Coleman, A., Hughes, D.J., Whitehouse, A., 2018. Contribution of the KSHV and EBV lytic cycles to tumorigenesis. *Curr. Opin. Virol., Engineering for viral resistance • Viruses and cancer* 32, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.014>
- Masud, H.M.A.A., Watanabe, T., Yoshida, M., Sato, Y., Goshima, F., Kimura, H., Murata, T., 2017. Epstein-Barr Virus BKRF4 Gene Product Is Required for Efficient Progeny Production. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.00975-17>
- Matusali, G., Arena, G., De Leo, A., Di Renzo, L., Mattia, E., 2009. Inhibition of p38 MAP kinase pathway induces apoptosis and prevents Epstein Barr virus reactivation in Raji cells exposed to lytic cycle inducing compounds. *Mol. Cancer* 8, 18. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-18>
- Murata, T., 2014. Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiol. Immunol.* 58, 307–317. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12155>
- Nyhan, W.L., 2014. Nucleotide Synthesis via Salvage Pathway, in: *ELS*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001399.pub3>
- Pagano, J.S., Whitehurst, C.B., Andrei, G., 2018. Antiviral Drugs for EBV. *Cancers* 10, 197. <https://doi.org/10.3390/cancers10060197>
- Pastor-Anglada, M., Cano-Soldado, P., Molina-Arcas, M., Lostao, M.P., Larráyoz, I., Martínez-Picado, J., Casado, F.J., 2005. Cell entry and export of nucleoside analogues. *Virus Res.* 107, 151–164. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.11.005>
- Patel, S. S., Szebeni, J., Wahl, L.M., Weinstein, J.N., 1991. Differential inhibition of 2'-deoxycytidine salvage as a possible mechanism for potentiation of the anti-human

- immunodeficiency virus activity of 2',3'-dideoxycytidine by dipyridamole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1250–1253. <https://doi.org/10.1128/aac.35.6.1250>
- Planz, O., 2013. Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral Res.* 98, 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.04.008>
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M., 2018. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>
- Renzo, L. di, Alttok, A., Klein, G., Klein, E., 1994. Endogenous TGF- β contributes to the induction of the EBV lytic cycle in two burkitt lymphoma cell lines. *Int. J. Cancer* 57, 914–919. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910570623>
- Sanchez, E.L., Lagunoff, M., 2015. Viral activation of cellular metabolism. *Virology* 479–480, 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.038>
- Scheuch, G., Canisius, S., Nocker, K., Hofmann, T., Naumann, R., Pleschka, S., Ludwig, S., Welte, T., Planz, O., 2018. Targeting intracellular signaling as an antiviral strategy: aerosolized LASAG for the treatment of influenza in hospitalized patients. *Emerg. Microbes Infect.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0023-3>
- Spano, D., Marshall, J.-C., Marino, N., De Martino, D., Romano, A., Scoppettuolo, M.N., Bello, A.M., Di Dato, V., Navas, L., De Vita, G., Medaglia, C., Steeg, P.S., Zollo, M., 2013. Dipyridamole prevents triple-negative breast-cancer progression. *Clin. Exp. Metastasis* 30, 47–68. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9506-0>
- Takada, K., 1984. Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *Int. J. Cancer* 33, 27–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910330106>
- Tenser, R.B., Gaydos, A., Hay, K.A., 2001. Inhibition of herpes simplex virus reactivation by dipyridamole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3657–3659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3657-3659.2001>
- Thomé, M.P., Pereira, L.C., Onzi, G.R., Rohden, F., Ilha, M., Guma, F.T., Wink, M.R., Lenz, G., 2019. Dipyridamole impairs autophagic flux and exerts antiproliferative activity on prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.001>
- Ville, S., Imbert-Marcille, B.-M., Coste-Burel, M., Garandeau, C., Meurette, A., Cantarovitch, D., Giral, M., Hourmant, M., Blancho, G., Dantal, J., 2018. Impact of antiviral prophylaxis in adults Epstein-Barr Virus-seronegative kidney recipients on early and late post-transplantation lymphoproliferative disorder onset: a retrospective cohort study. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 31, 484–494. <https://doi.org/10.1111/tri.13085>
- Wang, C., Lin, W., Playa, H., Sun, S., Cameron, K., Buolamwini, J., 2013. Dipyridamole analogues as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). *Biochem. Pharmacol.* 86. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.063>
- Wu, C.-C., Fang, C.-Y., Huang, S.-Y., Chiu, S.-H., Lee, C.-H., Chen, J.-Y., 2018. Perspective: Contribution of Epstein-Barr virus (EBV) Reactivation to the Carcinogenicity of Nasopharyngeal Cancer Cells. *Cancers* 10, 120.

<https://doi.org/10.3390/cancers10040120>

Yoshizaki, T., Wakisaka, N., Kondo, S., Muroso, S., Shimizu, Y., Nakashima, M., Tsuji, A., Furukawa, M., 2008. Treatment of locally recurrent Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma using the anti-viral agent cidofovir. *J. Med. Virol.* 80, 879–882. <https://doi.org/10.1002/jmv.21165>

zur Hausen, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K., Hecker, E., 1978. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* 272, 373–375. <https://doi.org/10.1038/272373a0>

CAPÍTULO IV

Discussão e conclusões

Capítulo II – bloqueio da autofagia pelo dipiridamol em células tumorais

Um crescente conjunto de evidências apontam para a implicação da desregulação da autofagia no câncer, onde as funções contrastantes de suprimir o processo oncogênico ou favorecer a progressão tumoral e resistência à terapia são dependentes do contexto e do estágio da doença (GALLUZZI et al., 2015). Em tumores avançados, a autofagia suporta a sobrevivência em condições adversas, tais como hipóxia, redução do aporte de nutrientes ou quimioterapia e, através da reciclagem, pode facilitar a remoção de componentes celulares danificados e promover processos anabólicos, favorecendo o crescimento e formação de metástases (AMARAVADI et al., 2011).

Durante a progressão e tratamento de PCa, três situações podem ocorrer em relação à modulação da autofagia pela sinalização androgênica, conforme ilustradas na figura 7. Foi demonstrado que em resposta à terapia de privação androgênica (1) na linhagem celular LNCaP, o modelo celular *in vitro* de câncer de próstata sensível a androgênios, a privação hormonal promove a inibição da atividade de mTOR (LI et al., 2008) e, associada à hipóxia, potencializa a ativação de AMPK (CHHIPA; WU; IP, 2011), sendo ambos sinais pró-autofágicos. Os androgênios estão envolvidos no transporte de nutrientes em células da próstata, assim como na regulação de processos anabólicos (XU et al., 2006), e a baixa disponibilidade desses hormônios e de oxigênio são duas condições frequentemente coexistentes em tumores de próstata após castração química ou cirúrgica. Portanto, diante dessa situação de estresse, a indução da autofagia atua como um mecanismo de sobrevivência para as células de PCa dependentes de androgênio se adaptarem a essas situações e, possivelmente, evoluírem para a forma resistente à terapia antiandrogênica, a fase chamada de câncer de próstata resistente à castração (CRPC), o estágio mais agressivo da doença.

A sinalização androgênica mediada pelo AR é ativada pela presença de testosterona e/ou diidrotestosterona ou, no estágio de CRPC, de maneira independente da presença desses hormônios, e a ativação desses receptores promove a transcrição de genes alvo, relacionados ao crescimento e inibição de apoptose (TAN et al., 2015). Além disso, conforme mencionado anteriormente, genes relacionado a autofagia são

alvos dessa sinalização (BLESSING et al., 2016) e a ativação da autofagia através dessa via promove crescimento de células de câncer tanto em modelos de linhagens sensível a androgênicos (2) quanto em modelos de CRPC, as linhagens 22Rv1 e PC-3 (3), cujo efeito pode ser revertido pela inibição farmacológica de etapas iniciais ou tardias do fluxo autofágico ou pelo silenciamento de ATG7 (SHI et al., 2013).

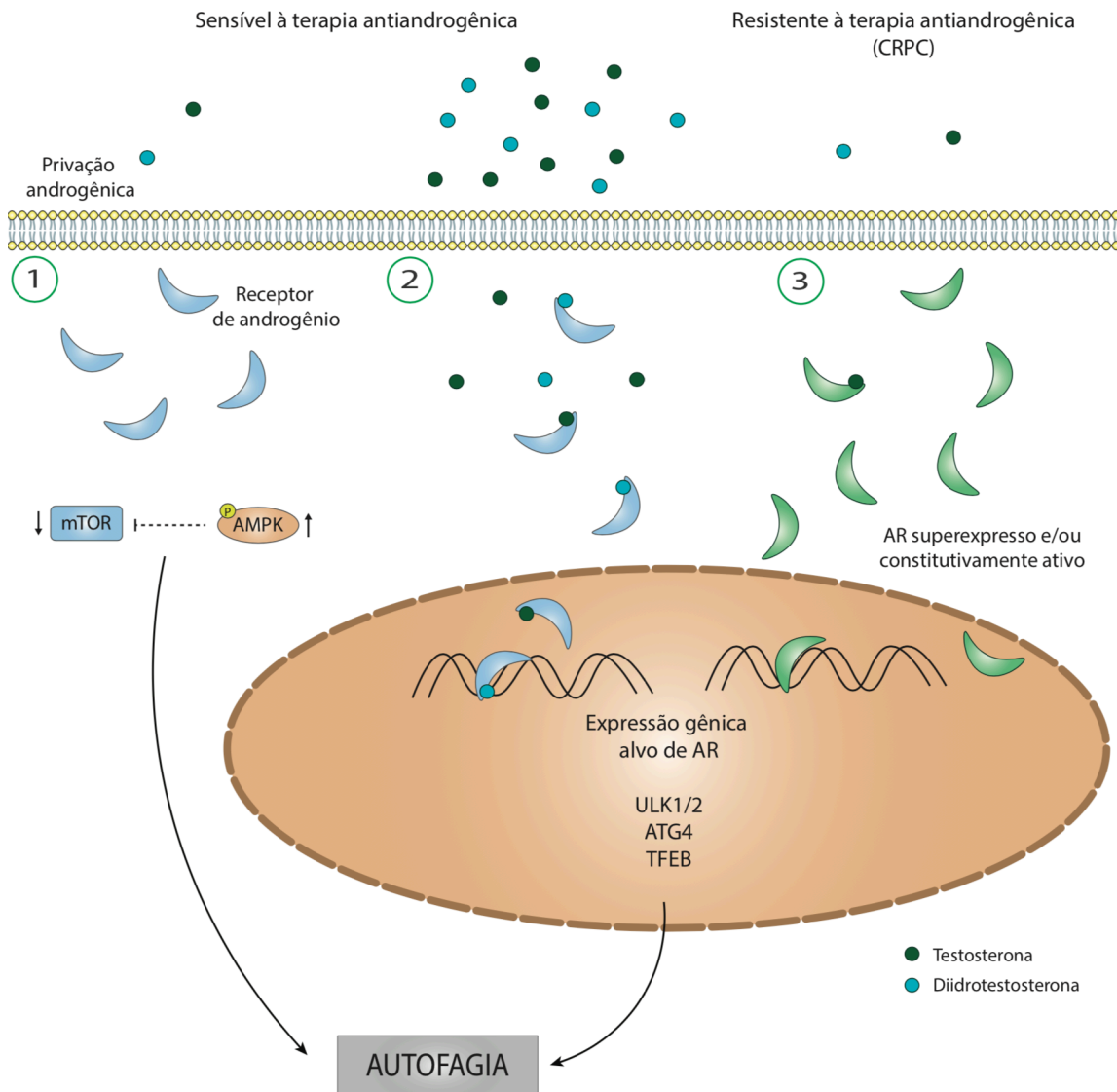


Figura 7 – Indução de autofagia pela sinalização androgênica. Em tumores sensíveis à terapia antiandrogênica, a privação hormonal promove a ativação da autofagia pela indução da sinalização de AMPK e mTOR (1). Em tumores sensíveis ou resistentes à terapia antiandrogênica, a atividade de receptores de androgênio (AR) promove a transcrição de genes relacionados a autofagia (ULK1, ULK2, ATG4B e ATG4D) e do regulador da transcrição de genes relacionado a atividade de lisossomos TFEB, promovendo a indução de autofagia e suportando o crescimento tumoral.

Além da modulação da autofagia pela sinalização androgênica, esse processo foi demonstrado ser induzido nas células tumorais de PCa por componentes do microambiente tumoral, levando a um fenótipo mais invasivo *in vitro* e a inibição da autofagia com cloroquina foi capaz de reduzir a formação de metástases *in vivo* (ZHAO et al., 2018). Além disso, em resposta ao tratamento quimioterápico, a autofagia é induzida e promove quimioresistência aos taxanos em modelos de CRPC (HU et al., 2018), a qual pode ser prevenida por compostos que inibem a autofagia através da ativação de mTOR ou inibição do complexo PI3K classe III (WANG et al., 2018).

Tomadas em conjunto, estas observações sugerem que a autofagia suporta a progressão, formação de metástases e resistência de PCa à terapia antiandrogênica e à quimioterapia na fase de resistência à castração. Com isso, estratégias de bloqueio de autofagia podem exercer efeitos antineoplásicos na terapia combinada com privação hormonal ou quimioterapia a fim de obter uma melhor remissão da doença.

A investigação de reguladores da autofagia tem sido em grande parte focada nas principais cinases reguladoras da autofagia, mTOR e AMPK. No entanto, um conjunto crescente de evidências aponta para outras cinases e outros processos pós-traducionais de acetilação e ubiquitinação como tendo papel importante na regulação da autofagia, que podem modular diversos estágios do fluxo autofágico e promover a indução, inibição ou bloqueio e a integração da resposta autofágica a outros estímulos (MCEWAN; DIKIC, 2011), abrindo caminho para a pesquisa de moduladores da autofagia em bibliotecas de compostos que afetam essas vias e com potencial de aplicações terapêuticas.

Nesse trabalho identificamos que o dipiridamol é capaz de impedir a progressão do fluxo autofágico em células de PCa e investigamos o mecanismo baseado nos alvos descritos desse fármaco. Através de diversas abordagens metodológicas, a análise integrada permite concluir que tal tratamento bloqueia a autofagia em etapas tardias. Quando combinado a tratamentos que induzem autofagia, o dipiridamol promove o acúmulo de estruturas autofágicas intermediárias, particularmente autofagossomos, sugerindo um desequilíbrio na progressão do fluxo autofágico sob esta condição. Além disso, concomitantemente ao aumento da proteína LC3-II, o acúmulo da proteína

SQSTM1/p62, sem alteração significativa dos níveis transcricionais, demonstra a prevenção da degradação e suporta a conclusão do bloqueio de fluxo autofágico.

A maioria dos compostos que têm sido identificados e utilizados para bloqueio do fluxo autofágico na fase tardia do processo normalmente inibem a função lisossomal, mais comumente elevando o pH dessa organela e, com isso, comprometendo a função das enzimas lisossomais de maneira geral e impedindo a degradação autofágica (YANG et al., 2013). Conforme evidenciado pelo ensaio da atividade da enzima lisossomal β -D-galactosidase ácida, o dipiridamol não mostrou inibir a função lisossomal por elevação de pH. Suportando essa evidência temos o resultado do marcador laranja de acridina, que demonstrou aumento da razão de fluorescência vermelho/verde, o que indica um aumento de acidez ou do volume de organelas ácidas (THOMÉ et al., 2016). Já foi demonstrado que cAMP pode aumentar a acidificação lisossomal (LIU et al., 2012; RAHMAN et al., 2016) e, possivelmente, o acúmulo de cAMP promovido pelo dipiridamol, pode estar contribuindo para esse resultado.

O bloqueio de fluxo autofágico diminui a reciclagem de componentes celulares e isso leva à insuficiência de substratos para o ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, redução dos níveis de ATP (QIU et al., 2014). Observamos esse efeito para o tratamento com Bafilomicina A1, um clássico bloqueador de fluxo autofágico pela inibição da função lisossomal. Da mesma maneira, o dipiridamol provocou a redução dos níveis intracelulares de ATP, e o tratamento combinado com Bafilomicina A1 não apresentou diferença nos níveis de redução, sugerindo um mecanismo compartilhado.

Com base nos dois alvos descritos do dipiridamol, isto é, inibição do transporte de nucleosídeos através do bloqueio de ENTs e inibição de PDEs e ativação da sinalização de cAMP/PKA, investigamos qual deles poderia estar envolvido no bloqueio do fluxo autofágico. A possibilidade do envolvimento da inibição do transporte de nucleosídeos foi excluída utilizando um outro inibidor de ENTs, o NBMPR (*Nitrobenzylthioinosine*). Conforme demonstrado pelo ensaio de captação de timidina, NBMPR e dipiridamol foram igualmente eficazes na inibição do transporte de nucleosídeos, porém aquele não preveniu a degradação da proteína SQSTM1/p62, sugerindo que o efeito não depende do bloqueio de ENTs. Demonstramos que o dipiridamol, conforme esperado, promoveu

o aumento da fosforilação da proteína CREB, um alvo bem descrito para avaliação do aumento de cAMP e ativação de PKA (YAN et al., 2016). O efeito de acúmulo da proteína SQSTM1/p62 pode ser revertido quando combinamos o tratamento do dipiridamol com H89, um inibidor de PKA, gerando a conclusão do envolvimento da via de cAMP/PKA na modulação da autofagia.

Normalmente é descrito que a PKA fosforila e inibe AMPK e ativa mTOR, inibindo a autofagia (CHEN; KLIONSKY, 2011). Porém, a evidência da regulação da autofagia em relação à interação de PKA com mTOR é baseada somente na demonstração que a perda da subunidade regulatória de PKA promove aumento da atividade de mTOR e redução do número de autofagossomos (MAVRAKIS et al., 2006) e a única demonstração da interação de PKA com AMPK em mamíferos foi provada em adipócitos, onde ocorre a inibição de lipólise, sem nenhuma evidência sobre regulação da autofagia (DJOUDER et al., 2010). Com isso, tais regulações e possível envolvimento na modulação da autofagia ainda necessitam de mais suporte experimental para suportar a conclusão de que PKA inibe autofagia em vias a montante da formação dos autofagossomos.

As primeiras evidências da regulação da autofagia através de cAMP e ativação da cinase PKA foram demonstradas em leveduras, onde as vias de PKA e TOR (homólogo de mTOR em mamíferos) são geralmente consideradas duas vias paralelas que detectam as fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (STEPHAN et al., 2009). Em condições de disponibilidade de nutrientes, a PKA fosforila Atg1 e Atg13, inibindo a associação do complexo Atg1-Atg13-Atg17 (o homólogo do complexo ULK1 em mamíferos) ao PAS e formação do autofagossomo (BUDOVSKAYA et al., 2004). Em mamíferos, apenas um sítio putativo de fosforilação em ULK1 foi sugerido (DORSEY et al., 2009) e não existem evidências de que a ULK1 ou ATG13 sejam reguladas por fosforilação de PKA, mas a maneira de como a sinalização da via cAMP/PKA regula a autofagia foi demonstrada ocorrer através da fosforilação das proteínas LC3 e SQSTM1/p62.

A fosforilação por PKA da Ser12 na proteína LC3B é suficiente para inibir a sua incorporação nos autofagossomos e tal efeito pode ser revertido com a inibição farmacológica de PKA ou mutação do sítio de fosforilação (CHERRA et al., 2010). Esse sítio de fosforilação é altamente conservado em todas as isoformas de LC3 em humanos,

camundongos, ratos e *zebrafish* e está contido na porção N-terminal da proteína LC3, que é essencial para a ligação às proteínas que contém o domínio LIR, classicamente as proteínas adaptadoras da carga autofágica, como a SQSTM1/p62 (SHVETS et al., 2008). O mecanismo pelo qual a fosforilação de LC3 por PKA afeta a formação ou maturação de autofagossomos ainda não foi demonstrado experimentalmente. As hipóteses sugerem que a fosforilação inibe a interação de LC3 com as proteínas adaptadoras, com o sistema de conjugação e lipidação e/ou com a maquinaria de transporte pelo citoesqueleto (MCEWAN; DIKIC, 2011).

Outro mecanismo regulatório da autofagia através da via de cAMP/PKA ocorre pela fosforilação da Ser24 da proteína SQSTM1/p62 (CHRISTIAN et al., 2014). Esse sítio de fosforilação está localizado no domínio N-terminal PB1 (*Phex and Bem1p*), o qual é responsável pela interação dessa proteína com outras proteínas contendo o mesmo domínio ou entre si, formando hetero ou homodímeros (ou polímeros) (NAKAMURA et al., 2010). Durante a autofagia, a proteína SQSTM1/p62 atua como receptor da carga autofágica pelo reconhecimento de substratos ubiquitinados através do domínio UBA, agregando-os através de homopolimerização para permitir o carregamento nos autofagossomos por associação à proteína LC3, através do domínio LIR. Com isso, o efeito da fosforilação da Ser24 da SQSTM1/p62 é o defeito de polimerização e, possivelmente, da translocação (com a carga autofágica) para os autofagossomos.

Através da análise de fracionamento celular, observamos que o acúmulo da proteína SQSTM1/p62 em resposta ao tratamento com dipiridamol ocorre predominantemente na fração insolúvel a Triton X-100, sugerindo o acúmulo na forma polimerizada, como agregados insolúveis. Curiosamente, um efeito semelhante já foi observado quando a proteína LC3 foi silenciada (SHVETS et al., 2008), indicando que uma redução do carregamento de oligômeros contendo SQSTM1/p62 pode ser responsável pelos efeitos observados com o dipiridamol. A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de células tratadas com dipiridamol revelou o acúmulo de estruturas de dupla membrana no citoplasma das células, compatíveis com a estrutura das fases iniciais do processo de maturação dos autofagossomos, o que nos levou a concluir que o tratamento interfere no processo de maturação e/ou fechamento dos autofagossomos, acompanhado pelo defeito no carregamento dos substratos. Não

temos evidências diretas que nas nossas condições LC3 ou SQSTM1/p62 estejam sendo fosforiladas por PKA, o que deixa em aberto a perspectiva da comprovação do envolvimento dessa via no fenótipo observado.

De acordo com o que tem sido descrito na literatura, nossos dados corroboram a hipótese de que a autofagia tem um papel pró-tumoral em PCa e o tratamento com dipiridamol provocou efeito citotóxico e aumentou a sensibilidade a tratamentos quimioterápicos. Utilizamos para isso um modelo *in vitro* de crescimento independente de ancoragem. A lógica dessa técnica é que as células dependem do contato célula-célula ou célula-matriz para crescer e se dividir. Por outro lado, a capacidade de formar colônias de maneira independente de ancoragem está relacionada à agressividade *in vivo*, como o potencial tumorigênico e metastático após sobreviver a *anoikis* (BOROWICZ et al., 2014; MORI et al., 2009). As linhagens celulares utilizadas possuem fenótipo invasivo e de alto potencial metastático e englobam o modelo de células sensíveis à terapia antiandrogênica sob privação hormonal, a linhagem LNCaP, e o modelo de células resistentes à privação androgênica, PC3 (negativa para AR) e 22Rv1 (positiva para AR) (CUNNINGHAM; YOU, 2015). De maneira geral, o tratamento com dipiridamol, isolado ou combinado aos quimioterápicos, reduziu o número de colônias formadas e o tamanho dessas colônias. Também demonstramos que tal efeito não depende da inibição da captação de nucleosídeos, pois o tratamento com NBMPR, isolado ou combinado aos quimioterápicos, não alterou o número nem o tamanho das colônias.

Merece ser lembrado que o tratamento com dipiridamol, por inibir a captação de nucleosídeos, pode acarretar o acúmulo de adenosina no microambiente tumoral, embora não haja nenhuma demonstração experimental que isso aconteça. A adenosina atua sobre quatro receptores de adenosina (AR) – A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (GESSI et al., 2011), diferentemente determinando o papel pró ou antitumoral. Para PCa já foi demonstrado que a ativação de receptores A₃ reduz o crescimento *in vitro*, *in vivo* e a formação de metástases (FISHMAN et al., 2003; JAJOO et al., 2009). Já os receptores A₂ são os subtipos predominantemente expressos na maioria das células imunes e sua ativação promove imunossupressão, configurando seu papel pró-tumoral (OHTA, 2016). Porém, de maneira oposta a isso, foi demonstrado em um modelo *in vivo* de implante

xenográfico de câncer de mama que o tratamento com dipiridamol ao mesmo tempo reduziu o crescimento tumoral e a infiltração de células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs) (CD11b⁺ e Gr1⁺) e de macrófagos associados a tumor (TAMs) (CD163⁺ e CD68⁺) (SPANO et al., 2013). No microambiente tumoral, tanto os TAMs quanto os MDSCs possuem funções pró-tumorais, favorecendo a sobrevivência e proliferação das células cancerosas, bem como angiogênese, disseminação e repressão da imunidade adaptativa (GABRILOVICH, 2017; PATHRIA; LOUIS; VARNER, 2019).

Este trabalho destaca, em primeiro lugar, o envolvimento da atividade de PKA no controle do fluxo autofágico e demonstramos o potencial para o desenvolvimento de agentes visando à modulação da autofagia a partir de fármacos de uso clínico aprovado, com possibilidade de reposicionamento para aplicação terapêutica. Nesse sentido, mostramos que o bloqueio da autofagia pelo dipiridamol prejudica a sobrevivência de células de câncer de próstata, implicando o potencial benefício desse e de outros inibidores de autofagia no contexto de resistência antiandrogênica. Embora a quantidade de evidências que apontam para o benefício da modulação da autofagia como alvo terapêutico promissor, a disponibilidade de fármacos aprovados por agências reguladoras para uso clínico é bastante restrita.

Atualmente, os únicos inibidores de autofagia aprovados para uso clínico são a cloroquina (CQ) e seu derivado hidroxiclороquina (HCQ), ambos inibidores da atividade lisossomais usados anteriormente para a prevenção e tratamento de malária (NJARIA et al., 2015). De acordo com a base de dados <http://clinicaltrials.gov>, existem vários estudos de fase I e II em andamento avaliando a combinação de HCQ ou CQ com agentes quimioterápicos em pacientes com diversos tipos de câncer. Uma minoria dos estudos clínicos testa o tratamento de câncer com HCQ como agente único e os resultados indicam que, na maioria dos casos, a monoterapia demonstra eficácia terapêutica insignificante (MARINKOVIĆ et al., 2018; WOLPIN et al., 2014). No entanto, quando usada em combinações com outros quimioterápicos, em alguns tipos de câncer os resultados demonstram benefício terapêutico (BOONE et al., 2015). Uma importante limitação da CQ e HCQ é a potência, uma vez que uma concentração em micromolar elevado é necessário para bloquear completamente a autofagia e causar impacto no crescimento de células tumorais. Esses níveis não são alcançados em pacientes, e

normalmente a ineficácia terapêutica é atribuída a esse fato (ROSENFELD et al., 2014). Portanto, é esperado o desenvolvimento de compostos de baixa toxicidade com potencial aplicação terapêutica que possam alcançar níveis consistentes de inibição da autofagia. Notavelmente, a segurança e eficácia do dipiridamol estão bem estabelecidas no contexto de doenças vasculares, tornando-o um bom candidato ao reposicionamento para investigações em estudos clínicos.

As primeiras evidências de que o dipiridamol aumenta a citotoxicidade de agentes antitumorais eram baseadas em combinação com antimetabólitos. Conforme descrito anteriormente, tal combinação possui o racional de prevenir concomitantemente a síntese *de novo* de nucleotídeos e inibir a via de salvamento. Com base nessas evidências, ensaios clínicos de fase I e fase II foram realizados em pacientes com tumores refratários avançados, onde os pacientes receberam tratamentos combinados de quimioterápicos e dipiridamol (BUDD et al., 1990; BURCH et al., 2000; ISACOFF et al., 2007; RASCHKO et al., 2000). Embora houve respostas positivas em alguns pacientes, os resultados não foram encorajadores o suficiente para testes em estudos de fase III.

O potencial do dipiridamol como agente único foi demonstrando mais recentemente em um modelo *in vivo* de câncer de mama triplo-negativo, onde reduziu o crescimento tumoral primário e a formação de metástases se administrado por via intraperitoneal, mas não pela via oral (SPANO et al., 2013). Com isso, resultados conflitantes de eficácia podem ser atribuídos à via e ao regime de administração do fármaco. Estudos clínicos de fase I em pacientes com carcinoma ovariano confinados na cavidade peritoneal mostraram que maiores concentrações de dipiridamol livre são alcançadas com a administração intraperitoneal, comparado com a administração oral ou infusão intravenosa (GOEL et al., 1989; ISONISHI et al., 1991; WILLSON et al., 1988). Os baixos níveis plasmáticos de dipiridamol livre são atribuídos à sua ligação à proteína sérica alfa-1-glicoproteína ácida (GPA) (CURTIN et al., 1999) e as estratégias para contornar essa ligação e melhorar a distribuição são o uso de análogos com baixa afinidade à GPA (CURTIN et al., 1999) e o desenvolvimento de formulações que melhoram as características farmacocinéticas, tal como já descrita a formulação de administração intravenosa de dipiridamol em lipossomas (WENZEL et al., 2010; WENZEL;

ZEISIG; FICHTNER, 2009). Com isso, percebe-se que são necessários estudos para aprimorar os parâmetros farmacocinéticos, como via de administração e formulação para refinar as doses e regimes de administração a fim de aumentar a eficácia do dipiridamol em ensaios clínicos.

Capítulo III – inibição da captação de nucleosídeos na atividade antiviral do dipiridamol

Ultimamente tem sido demonstrado que vírus de diferentes famílias modificam drasticamente o metabolismo celular ao infectar as células hospedeiras, incluindo vias como glicólise, síntese de ácidos graxos e glutaminólise (SANCHEZ; LAGUNOFF, 2015). Os vírus provavelmente evoluíram para manipular vias metabólicas para múltiplos fins favoráveis à sua propagação, dentre as quais está a indução de vias sintéticas para fornecer quantidades suficientes de nucleotídeos necessários para a rápida replicação viral.

A alteração do metabolismo de nucleotídeos já foi demonstrada em células infectadas por diferentes famílias de vírus. A infecção por adenovírus leva ao aumento do fluxo glicolítico para, a partir de intermediários dessa via, aumentar a biossíntese de nucleotídeos e promover a replicação viral (THAI et al., 2014). A infecção por Citomegalovírus humano, um vírus da família *Herpesviridae*, está associada a maior captação de glicose por fibroblastos infectados, além do aumento de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico para serem utilizados em vias de síntese de nucleotídeos de pirimidina (MUNGER et al., 2008). Já durante a infecção com Herpesvírus simples tipo 1, o vírus reduz a glicólise aeróbica nas células hospedeiras e, com isso, o carbono proveniente da glicose não é majoritariamente utilizado para o ciclo do ácido tricarboxílico, como para citomegalovírus, mas é desviado diretamente para a síntese de nucleotídeos (VASTAG et al., 2011).

Como todos os vírus, os herpesvírus dependem do aporte de metabólitos, como energia, aminoácidos, lipídios e nucleotídeos, das células hospedeiras para garantir a replicação. No entanto, o genoma de todos os herpesvírus codifica enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e evidências crescentes sugerem que os pools de nucleotídeos gerados por essas enzimas podem ser importantes para orquestrar o

metabolismo do hospedeiro a favor da replicação viral (XIE et al., 2019), como por exemplo, regular o ciclo celular para garantir substratos e tempo suficiente para a produção viral (GILL; KUTOK; FINGEROTH, 2007).

A enzima envolvida no metabolismo mais consistentemente expressa pelos vírus de DNA é a timidina quinase (TK). Essa enzima catalisa a transferência de um fosfato do ATP para a deoxitimidina na via de salvamento desse nucleosídeo, formando a timidina monofosfato, que recebe subsequentemente mais dois fosfatos para ser utilizada na síntese de DNA (XIE et al., 2019). A perda da expressão da TK viral está associada com a atenuação da atividade viral em dois modelos animais, reduzindo a habilidade de estabelecer infecção, replicar e de produzir vírions (COLEMAN et al., 2003; SANFORD et al., 2016). Juntas, essas evidências apontam a relevância da via de síntese de nucleotídeos através da via salvamento na replicação viral.

Baseado nisso, na segunda parte do trabalho exploramos o envolvimento da captação de nucleosídeos extracelulares na replicação viral focando na aplicação de uma hipótese racional de reposicionamento do dipiridamol como agente antiviral. Demonstramos que o dipiridamol reduz a reativação do ciclo lítico do EBV, comprometendo desde as etapas mais iniciais e culminando na redução da replicação do genoma viral e da produção de vírions.

Nossos dados sugerem que a atividade antiviral do dipiridamol se deve principalmente à sua capacidade de bloquear o transporte de nucleosídeos, que é apoiada pela evidência de que a inibição mediada por dipiridamol pode ser revertida por um excesso de adenosina ou timidina extracelular. É provável que o dipiridamol interfira com a alta demanda metabólica que está associada à reativação viral, em especial a demanda de nucleotídeos. Espera-se, portanto, que pela interferência na via de salvamento um pool intracelular reduzido de ribonucleotídeos tenha um grande impacto na síntese *de novo* de RNA, tal como genes virais *immediate early*. É importante ressaltar que o RNA celular que já está acumulado pode ser menos afetado pelo tratamento com dipiridamol, dependendo de sua meia-vida. Essa hipótese é compatível com o fato de que o nível de transcritos de genes celulares não foram afetados.

De fato, defendemos um modelo no qual a reativação viral é inibida pelo dipiridamol ao nível da proteína da fase *immediate early* Zta. Como mostrado, a inibição

de Zta resulta em grande parte da repressão da transcrição do seu gene, BZLF1. A repressão da transcrição do gene BZLF1 é suficiente para inibir a reativação do EBV, uma vez que Zta é necessária para sua própria transcrição e para induzir a transcrição de genes da fase *early*. Além disso, Zta liga-se à origem de replicação lítica do genoma do EBV e é necessária para o início da replicação (KENNEY; MERTZ, 2014). Os fatos a seguir devem ser levados em conta na interpretação da inibição da transcrição de BZLF1 pelo dipiridamol:

- a. É improvável que o dipiridamol atue em uma via específica de sinalização que ativa a transcrição do gene BZLF1, pois a inibição foi observada em três situações distintas: (1) reativação espontânea em células B95.8, (2) ativação do receptor de células B em células Akata e (3) indução por via dependente do TGF- β em células Mutu-I;
- b. O promotor de BZLF1 é regulado através de uma interação complexa entre os fatores de transcrição celulares e perfis de metilação de ilhas CpG em locais dentro do promotor (KENNEY; MERTZ, 2014). Portanto, o dipiridamol pode inibir a ativação do promotor BZLF1 modulando a ligação de um ou vários fatores de transcrição, embora não haja evidências experimentais até o momento;
- c. Já foi demonstrado que o dipiridamol pode inibir de maneira reversível a síntese de RNA, onde a inibição não depende apenas da via de salvamento de nucleosídeos, uma vez que também ocorre em um sistema de transcrição *in vitro* (FATA-HARTLEY; PALMENBERG, 2005), embora a maneira como isso acontece é totalmente desconhecida;
- d. É razoável a hipótese da redução da transcrição simplesmente por déficit no *pool* de nucleotídeos em decorrência da inibição da via de salvamento, embora não esteja caracterizada a contribuição relativa de nucleotídeos provenientes da via *de novo versus* a via salvamento para síntese de DNA ou RNA viral.

A inibição de etapas a montante da replicação viral é de particular importância porque a grande maioria das drogas disponíveis atualmente para tratamento de herpesvírus bloqueiam essa etapa intermediária do ciclo de infecção viral. Estratégias eficazes para inibir as etapas iniciais da reativação lítica do EBV podem ser valiosas no tratamento de doenças associadas ao EBV, especialmente se pode ser aplicada de

maneira profilática, pelo fato da expressão das proteínas de fase lítica estarem associadas na patogênese viral, como demonstrado no desenvolvimento de linfomas (MA et al., 2011). Nesse sentido, o tratamento antiviral somente se usado de maneira profilática para prevenir a reativação de EBV já teve seu benefício demonstrado por diminuir a ocorrência de doenças linfoproliferativas após transplante de células tronco hematopoiéticas ou de órgãos sólidos (DARENKOV et al., 1997; HIERRO et al., 2008; MALOUF et al., 2002).

Este estudo, além de apresentar a atividade antiviral do dipiridamol, aponta o envolvimento de uma via celular na reativação viral que pode ser explorada como alvo para novas estratégias terapêuticas e, por se tratar de um alvo celular que participa no metabolismo de substratos que são utilizados por todos os vírus para a replicação, pode ser aplicado para tratamento de vírus de outras famílias.

Com isso, a combinação de potenciais e questões em aberto geram as perspectivas da elucidação do mecanismo de repressão da transcrição de genes virais pelo dipiridamol e da compreensão se nucleotídeos provenientes da via de salvamento são essenciais para a eficiente reativação viral. Além disso, a combinação com fármacos antivirais que atuem em etapas a jusante da reativação pode apresentar benefício terapêutico ainda maior para o tratamento de EBV e outros herpesvírus e doenças associadas ou vírus de outras famílias que venham a ser investigados quanto a sensibilidade ao dipiridamol.

Referências

- AKTAS, B. et al. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. **Stroke**, v. 34, n. 3, p. 764–769, mar. 2003.
- AMARAVADI, R. K. et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 4, p. 654–666, 15 fev. 2011.
- ANDERSON, K. C. Dark Remedy: The Impact of Thalidomide and Its Revival as a Vital Medicine. **Nature Medicine**, v. 7, n. 3, p. 275, mar. 2001.
- ANDING, A. L.; BAEHRECKE, E. H. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. **Developmental Cell**, v. 41, n. 1, p. 10–22, 10 2017.
- ANDREI, G.; TROMPET, E.; SNOECK, R. Novel Therapeutics for Epstein–Barr Virus. **Molecules**, v. 24, n. 5, 12 mar. 2019.
- ANTCZAK, C. et al. Revisiting old drugs as novel agents for retinoblastoma: in vitro and in vivo antitumor activity of cardenolides. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 50, n. 7, p. 3065–3073, jul. 2009.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, ago. 2004.
- BALDWIN, S. A. et al. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 735–743, fev. 2004.
- BAUDINO, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 12, n. 1, p. 3–20, 2015.
- BENNETT, H. L. et al. Does androgen-ablation therapy (AAT) associated autophagy have a pro-survival effect in LNCaP human prostate cancer cells? **BJU international**, v. 111, n. 4, p. 672–682, abr. 2013.
- BLESSING, A. M. et al. Transcriptional regulation of core autophagy and lysosomal genes by the androgen receptor promotes prostate cancer progression. **Autophagy**, v. 13, n. 3, p. 506–521, 15 dez. 2016.
- BOLLARD, C. M.; ROONEY, C. M.; HESLOP, H. E. T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 9, n. 9, p. 510–519, set. 2012.
- BOONE, B. A. et al. Safety and Biologic Response of Pre-operative Autophagy Inhibition in Combination with Gemcitabine in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 13, p. 4402–4410, dez. 2015.
- BOROWICZ, S. et al. The Soft Agar Colony Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 92, 27 out. 2014.
- BOSWELL-CASTEEL, R. C.; HAYS, F. A. Equilibrative Nucleoside Transporters – A Review. **Nucleosides, nucleotides & nucleic acids**, v. 36, n. 1, p. 7, 2 jan. 2017.
- BOYER, C. R. et al. Nucleoside transport inhibitors, dipyridamole and p-nitrobenzylthioinosine, selectively potentiate the antitumor activity of NB1011. **Anti-Cancer Drugs**, v. 13, n. 1, p. 29–36, jan. 2002.
- BREHMER, D. et al. Cellular Targets of Gefitinib. **Cancer Research**, v. 65, n. 2, p. 379–382, 15 jan. 2005.
- BUDD, G. T. et al. Phase I trial of dipyridamole with 5-fluorouracil and folinic acid. **Cancer Research**, v. 50, n. 22, p. 7206–7211, 15 nov. 1990.
- BUDOVSKAYA, Y. V. et al. The Ras/cAMP-dependent Protein Kinase Signaling Pathway Regulates an Early Step of the Autophagy Process in *Saccharomyces*

cerevisiae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 20663–20671, 14 maio 2004.

BUMBACA, B.; LI, W. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 8, n. 4, p. 518–529, jul. 2018.

BURCH, P. A. et al. Phase II evaluation of continuous-infusion 5-fluorouracil, leucovorin, mitomycin-C, and oral dipyridamole in advanced measurable pancreatic cancer: a North Central Cancer Treatment Group Trial. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 534–537, out. 2000.

BURNSTOCK, G. Purine and purinergic receptors. **Brain and Neuroscience Advances**, v. 2, p. 2398212818817494, 1 jan. 2018.

CAMPILLOS, M. et al. Drug target identification using side-effect similarity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 321, n. 5886, p. 263–266, 11 jul. 2008.

CAPPATO, S. et al. High-throughput screening for modulators of ACVR1 transcription: discovery of potential therapeutics for fibrodysplasia ossificans progressiva. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 6, p. 685–696, 1 jun. 2016.

CARREIRA, S. et al. Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 254, p. 254ra125, 17 set. 2014.

CASTRO-OBREGON, S. The Discovery of Lysosomes and Autophagy. v. 3, n. 9, p. 49, 2010.

CAYROL, C.; FLEMINGTON, E. K. Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1. **Journal of Virology**, v. 69, n. 7, p. 4206–4212, jul. 1995.

CHEN, Y.; KLIONSKY, D. J. The regulation of autophagy – unanswered questions. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 2, p. 161–170, 15 jan. 2011.

CHEN, Z. et al. NPRL2 enhances autophagy and the resistance to Everolimus in castration-resistant prostate cancer. **The Prostate**, v. 79, n. 1, p. 44–53, 2019.

CHERRA, S. J. et al. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. **The Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 4, p. 533–539, 23 ago. 2010.

CHHIPA, R. R.; WU, Y.; IP, C. AMPK-mediated autophagy is a survival mechanism in androgen-dependent prostate cancer cells subjected to androgen deprivation and hypoxia. **Cellular signalling**, v. 23, n. 9, p. 1466–1472, set. 2011.

CHIU, S.-H. et al. Epstein-Barr virus BALF3 mediates genomic instability and progressive malignancy in nasopharyngeal carcinoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8583–8601, 30 set. 2014.

CHRISTIAN, F. et al. PKA phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates PB1 domain interaction partner binding. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2765–2774, nov. 2014.

CIACCIARELLI, M. et al. Dipyridamole: a drug with unrecognized antioxidant activity. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 822–829, 2015.

CIANFANELLI, V. et al. AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 20–30, jan. 2015.

COLEMAN, C. M. et al. Abelson Kinase Inhibitors Are Potent Inhibitors of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion. **Journal of Virology**, v. 90, n. 19, p. 8924–8933, 12 set. 2016.

COLEMAN, H. M. et al. Murine Gammaherpesvirus 68 Lacking Thymidine Kinase Shows Severe Attenuation of Lytic Cycle Replication In Vivo but Still Establishes Latency. **Journal of Virology**, v. 77, n. 4, p. 2410–2417, 15 fev. 2003.

COLOMBO, M. I. **Pathogens and autophagy: subverting to survive**. News. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/4401767>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

CUERVO, A. M.; WONG, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 92–104, jan. 2014.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, nov. 2004.

CUNNINGHAM, D.; YOU, Z. In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. **Journal of biological methods**, v. 2, n. 1, 2015.

CURTIN, N. J. et al. Potentiation of the cytotoxicity of thymidylate synthase (TS) inhibitors by dipyridamole analogues with reduced α 1-acid glycoprotein binding. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 11, p. 1738–1746, ago. 1999.

DARENKOV, I. A. et al. Reduced incidence of Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder using preemptive antiviral therapy. **Transplantation**, v. 64, n. 6, p. 848–852, 27 set. 1997.

DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695–747, jul. 2016.

DECKER, L. L.; KLAMAN, L. D.; THORLEY-LAWSON, D. A. Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, p. 3286–3289, maio 1996.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51–64, jul. 2006.

DEGRAFF, A. C.; LYON, A. F. Evaluation of dipyridamole (Persantin). **American Heart Journal**, v. 65, n. 3, p. 423–424, 1 mar. 1963.

DELECLUSE, H. J. et al. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. **Journal of Virology**, v. 67, n. 3, p. 1292–1299, mar. 1993.

DHARNIDHARKA, V. R. et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 15088, 28 jan. 2016.

DIENER, H. C. et al. European Stroke Prevention Study. 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 143, n. 1–2, p. 1–13, nov. 1996.

DJOUDE, N. et al. PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 2, p. 469–481, 20 jan. 2010.

DORSEY, F. C. et al. Mapping the phosphorylation sites of Ulk1. **Journal of Proteome Research**, v. 8, n. 11, p. 5253–5263, nov. 2009.

DYALL, J. et al. Repurposing of Clinically Developed Drugs for Treatment of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4885–4893, ago. 2014.

ELIOPOULOS, A. G.; HAVAKI, S.; GORGOULIS, V. G. DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. **Frontiers in Genetics**, v. 7, 21 nov. 2016.

EL-SHARKAWY, A.; AL ZAIDAN, L.; MALKI, A. Epstein–Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2 ago. 2018.

EVANS, D. R.; GUY, H. I. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 32, p. 33035–33038, 6 ago. 2004.

FAGGIONI, A. et al. Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 232, n. 4757, p. 1554–1556, 20

jun. 1986.

FAIRMAN, J. W. et al. Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 18, n. 3, p. 316–322, mar. 2011.

FANG, C.-Y. et al. Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells.

International Journal of Cancer, v. 124, n. 9, p. 2016–2025, 1 maio 2009.

FARROW, J. M.; YANG, J. C.; EVANS, C. P. Autophagy as a Modulator and Target in Prostate Cancer. **Nature reviews. Urology**, v. 11, n. 9, p. 508–516, set. 2014.

FATA-HARTLEY, C. L.; PALMENBERG, A. C. Dipyridamole Reversibly Inhibits Mengovirus RNA Replication. **Journal of Virology**, v. 79, n. 17, p. 11062–11070, 1 set. 2005.

FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 24–41, jan. 2014.

FINGEROTH, J. D. et al. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 14, p. 4510–4514, jul. 1984.

FISHMAN, P. et al. Targeting the A3 adenosine receptor for cancer therapy: inhibition of prostate carcinoma cell growth by A3AR agonist. **Anticancer Research**, v. 23, n. 3A, p. 2077–2083, jun. 2003.

GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. **Cancer immunology research**, v. 5, n. 1, p. 3–8, jan. 2017.

GALLUZZI, L. et al. Metabolic Control of Autophagy. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1263–1276, 4 dez. 2014.

GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO journal**, v. 34, n. 7, p. 856–880, 1 abr. 2015.

GARCÍA-SERRADILLA, M.; RISCO, C.; PACHECO, B. Drug repurposing for new, efficient, broad spectrum antivirals. **Virus Research**, v. 264, p. 22–31, 15 2019.

GATICA, D.; LAHIRI, V.; KLIONSKY, D. J. Cargo Recognition and Degradation by Selective Autophagy. **Nature cell biology**, v. 20, n. 3, p. 233–242, mar. 2018.

GENG, J.; KLIONSKY, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. ‘Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects’ Review Series’. **EMBO Reports**, v. 9, n. 9, p. 859–864, set. 2008.

GEQUELIN, L. C. F. et al. Epstein-Barr virus: general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 5, p. 383–388, 2011.

GERMAN, D. C.; KREDICH, N. M.; BJORNSSON, T. D. Oral dipyridamole increases plasma adenosine levels in human beings. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 45, n. 1, p. 80–84, jan. 1989.

GESSI, S. et al. Adenosine receptors and cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1808, n. 5, p. 1400–1412, maio 2011.

GIBBS, C. R.; LIP, G. Y. H. Do we still need dipyridamole? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 323–328, abr. 1998.

GILL, M. B.; KUTOK, J. L.; FINGEROTH, J. D. Epstein-Barr Virus Thymidine Kinase Is a Centrosomal Resident Precisely Localized to the Periphery of Centrioles. **Journal of Virology**, v. 81, n. 12, p. 6523–6535, 15 jun. 2007.

GIRKE, C. et al. Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, maio 2010.

GOEL, R. et al. Selective intraperitoneal biochemical modulation of methotrexate by dipyridamole. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 262–269, fev. 1989.

GOWANS, G. J. et al. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 556–566, 1 out. 2013.

GRAY, J. H.; OWEN, R. P.; GIACOMINI, K. M. The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 728–734, fev. 2004.

GREM, J. L.; FISCHER, P. H. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, n. 3, p. 349–371, 1989.

GRESELE, P.; MOMI, S.; FALCINELLI, E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 634–646, out. 2011.

GUIDRY, J. T.; BIRDWELL, C. E.; SCOTT, R. S. Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Oral Cancers. **Oral diseases**, v. 24, n. 4, p. 497–508, maio 2018.

HAMASAKI, M. et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 389–393, 21 mar. 2013.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 251–262, 22 mar. 2012.

HARKER, L. A.; KADATZ, R. A. Mechanism of action of dipyridamole. **Thrombosis Research. Supplement**, v. 4, p. 39–46, 1983.

HATTON, O. L. et al. The Interplay Between Epstein Barr Virus and B Lymphocytes: Implications for Infection, Immunity, and Disease. **Immunologic research**, v. 58, n. 0, p. 268–276, maio 2014.

HAY, K. A.; GAYDOS, A.; TENSER, R. B. Inhibition of herpes simplex virus reactivation by dipyridamole in a mouse model. **Journal of Medical Virology**, v. 50, n. 2, p. 198–203, out. 1996.

HIERRO, L. et al. Efficacy and safety of valganciclovir in liver-transplanted children infected with Epstein-Barr virus. **Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society**, v. 14, n. 8, p. 1185–1193, ago. 2008.

HIKITA, H.; SAKANE, S.; TAKEHARA, T. Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. **Liver Research**, v. 2, n. 3, p. 120–124, 1 set. 2018.

HONG, G. K. et al. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 13993–14003, nov. 2005a.

HONG, G. K. et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. **Journal of Virology**, v. 79, n. 22, p. 13984–13992, nov. 2005b.

HOSHINO, Y. et al. Long-Term Administration of Valacyclovir Reduces the Number of Epstein-Barr Virus (EBV)-Infected B Cells but Not the Number of EBV DNA Copies per B Cell in Healthy Volunteers. **Journal of Virology**, v. 83, n. 22, p. 11857–11861, 15 nov. 2009.

HSU, M. et al. Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3679–3688, abr. 2008.

HU, F. et al. Docetaxel-mediated autophagy promotes chemoresistance in castration-

resistant prostate cancer cells by inhibiting STAT3. **Cancer Letters**, v. 416, p. 24–30, 01 2018.

HURLEY, J. H.; YOUNG, L. N. Mechanisms of Autophagy Initiation. **Annual review of biochemistry**, v. 86, p. 225–244, 20 jun. 2017.

ILJIN, K. et al. High-throughput cell-based screening of 4910 known drugs and drug-like small molecules identifies disulfiram as an inhibitor of prostate cancer cell growth. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6070–6078, 1 out. 2009.

IORIO, F. et al. Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 33, p. 14621–14626, 17 ago. 2010.

ISACOFF, W. H. et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, leucovorin, mitomycin, and dipyridamole in locally advanced unresectable pancreatic adenocarcinoma: SWOG S9700. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 25, n. 13, p. 1665–1669, 1 maio 2007.

ISONISHI, S. et al. Phase I and Pharmacokinetic Trial of Intraperitoneal Etoposide in Combination With the Multidrug-Resistance-Modulating Agent Dipyridamole. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 9, p. 621–626, 1 maio 1991.

JAFFER, I. H.; WEITZ, J. I. Chapter 149 - Antithrombotic Drugs. In: HOFFMAN, R. et al. (Eds.). **Hematology (Seventh Edition)**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 2168–2188.

JAHREISS, L.; MENZIES, F. M.; RUBINSZTEIN, D. C. The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 9, n. 4, p. 574–587, 1 abr. 2008.

JAJOO, S. et al. Adenosine A3 Receptor Suppresses Prostate Cancer Metastasis by Inhibiting NADPH Oxidase Activity. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 11, p. 1132–1145, nov. 2009.

JIANG, J.-H. et al. Hypoxia can contribute to the induction of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 37, n. 2, p. 98–103, out. 2006.

JOG, N. R. et al. Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 9 out. 2018.

JOHANSEN, L. M. et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 290, p. 290ra89, 3 jun. 2015.

JOHANSEN, T.; LAMARK, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. **Autophagy**, v. 7, n. 3, p. 279–296, mar. 2011.

JONES, R. J. et al. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 6, p. 1274–1281, 15 set. 2007.

JORDHEIM, L. P. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 6, p. 447–464, jun. 2013.

KANG, M.-S.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus latent genes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, p. e131, 23 jan. 2015.

KATSUMURA, K. R.; MARUO, S.; TAKADA, K. EBV lytic infection enhances transformation of B-lymphocytes infected with EBV in the presence of T-lymphocytes. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 3, p. 504–510, mar. 2012.

KEISER, M. J. et al. Predicting new molecular targets for known drugs. **Nature**, v. 462, n. 7270, p. 175–181, 12 nov. 2009.

KENNEY, S. C.; MERTZ, J. E. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr

virus. **Seminars in Cancer Biology**, v. 26, p. 60–68, jun. 2014.

KHAN, G.; HASHIM, M. J. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, 17 nov. 2014.

KHARKAR, P. S.; WARRIER, S.; GAUD, R. S. Reverse docking: a powerful tool for drug repositioning and drug rescue. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 333–342, mar. 2014.

KIM, H.-H.; LIAO, J. K. Translational Therapeutics of Dipyridamole. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 28, n. 3, p. s39, mar. 2008.

KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 2, p. 132–141, fev. 2011.

KIMMELMAN, A. C.; WHITE, E. Autophagy and Tumor Metabolism. **Cell metabolism**, v. 25, n. 5, p. 1037–1043, 2 maio 2017.

KIMURA, H.; COHEN, J. I. Chronic Active Epstein–Barr Virus Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 22 dez. 2017.

KINNINGS, S. L. et al. Drug discovery using chemical systems biology: repositioning the safe medicine Comtan to treat multi-drug and extensively drug resistant tuberculosis. **PLoS computational biology**, v. 5, n. 7, p. e1000423, jul. 2009.

KINSELLA, A. R.; SMITH, D. Tumor resistance to antimetabolites. **General Pharmacology**, v. 30, n. 5, p. 623–626, maio 1998.

KNABB, R. M. et al. Effects of dipyridamole on myocardial adenosine and active hyperemia. **The American Journal of Physiology**, v. 247, n. 5 Pt 2, p. H804-810, nov. 1984.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–715, 2004.

KUMAR, S.; KUMAR, S. Chapter 6 - Molecular Docking: A Structure-Based Approach for Drug Repurposing. In: ROY, K. (Ed.). . **In Silico Drug Design**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 161–189.

KÜPPERS, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 10, p. 801–812, out. 2003.

LAMB, J. et al. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5795, p. 1929–1935, 29 set. 2006.

LANE, A. N.; FAN, T. W.-M. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 4, p. 2466–2485, 27 fev. 2015.

LAZOVA, R. et al. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 2, p. 370–379, 15 jan. 2012.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. **Cell**, v. 176, n. 1–2, p. 11–42, 10 jan. 2019.

LI, H. et al. Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 11, p. 1309–1318, 18 out. 2016.

LI, M. et al. Autophagy protects LNCaP cells under androgen deprivation conditions. **Autophagy**, v. 4, n. 1, p. 54–60, jan. 2008.

LI, W.; LI, J.; BAO, J. Microautophagy: lesser-known self-eating. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 69, n. 7, p. 1125–1136, abr. 2012.

LIANG, X. H. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 672–676, 9 dez. 1999.

LIM, C.-Y.; ZONCU, R. The lysosome as a command-and-control center for cellular metabolism. **The Journal of Cell Biology**, v. 214, n. 6, p. 653–664, 12 set. 2016.

LITWIN, M. S.; TAN, H.-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. **JAMA**, v. 317, n. 24, p. 2532–2542, 27 jun. 2017.

LIU, J. et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contributes to reacidification of alkalinized lysosomes in RPE cells. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 303, n. 2, p. C160–C169, 15 jul. 2012.

LOOS, B.; DU TOIT, A.; HOFMEYR, J.-H. S. Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. **Autophagy**, v. 10, n. 11, p. 2087–2096, 18 dez. 2014.

LU, J. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. **Cancer Research**, v. 63, n. 1, p. 256–262, 1 jan. 2003.

MA, S.-D. et al. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. **Journal of Virology**, v. 85, n. 1, p. 165–177, jan. 2011.

MACKEY, J. R. et al. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 58, n. 19, p. 4349–4357, 1 out. 1998.

MAEDA, H.; KHATAMI, M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, 1 mar. 2018.

MALOUF, M. A. et al. Anti-viral prophylaxis reduces the incidence of lymphoproliferative disease in lung transplant recipients. **The Journal of Heart and Lung Transplantation: The Official Publication of the International Society for Heart Transplantation**, v. 21, n. 5, p. 547–554, maio 2002.

MANIC, G. et al. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 1, n. 1, 15 jul. 2014.

MARINKOVIĆ, M. et al. **Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/8023821/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

MARIÑO, G. et al. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18573–18583, 22 jun. 2007.

MAVRAKIS, M. et al. Depletion of type IA regulatory subunit (RI α) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 19, p. 2962–2971, 1 out. 2006.

MCEWAN, D. G.; DIKIC, I. The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 4, p. 195–201, abr. 2011.

MERCORELLI, B.; PALÙ, G.; LOREGIAN, A. Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We? **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 865–876, 2018.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728–741, 11 nov. 2011.

MOFFATT, B. A.; ASHIHARA, H. Purine and Pyrimidine Nucleotide Synthesis and Metabolism. **The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists**, v. 1, 4 abr. 2002.

MONASTYRSKA, I. et al. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 84, n. 3, p. 431–448, ago. 2009.

MORI, S. et al. An Anchorage-Independent Cell Growth Signature Identifies Tumors with Metastatic Potential. **Oncogene**, v. 28, n. 31, p. 2796–2805, 6 ago. 2009.

MOWERS, E. E.; SHARIFI, M. N.; MACLEOD, K. F. Autophagy in cancer metastasis.

Oncogene, v. 36, n. 12, p. 1619–1630, mar. 2017.

MUNGER, J. et al. Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1179–1186, out. 2008.

MURATA, T. Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 6, p. 307–317, jun. 2014.

NAIR, U. et al. A role for Atg8–PE deconjugation in autophagosome biogenesis. **Autophagy**, v. 8, n. 5, p. 780–793, 1 maio 2012.

NAKAMURA, K. et al. PB1 Domain Interaction of p62/Sequestosome 1 and MEKK3 Regulates NF- κ B Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 2077–2089, 15 jan. 2010.

NAKAMURA, S.; YOSHIMORI, T. New insights into autophagosome–lysosome fusion. **J Cell Sci**, v. 130, n. 7, p. 1209–1216, 1 abr. 2017.

NAKATOGAWA, H. et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 458–467, jul. 2009.

NAKATOGAWA, H. et al. Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. **Autophagy**, v. 8, n. 2, p. 177–186, 1 fev. 2012.

NELSON, J. A.; DRAKE, S. Potentiation of methotrexate toxicity by dipyridamole. **Cancer Research**, v. 44, n. 6, p. 2493–2496, jun. 1984.

NERI SERNERI, G. G. et al. Enhanced prostacyclin production by dipyridamole in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 9–15, 1981.

NGUYEN, H. G. et al. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. **Oncogene**, v. 33, n. 36, p. 4521–4530, 4 set. 2014.

NIKOOBAKHT, M. et al. Evaluation of Epstein-Barr virus load in saliva before and after renal transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 43, n. 2, p. 540–542, mar. 2011.

NJARIA, P. M. et al. Chloroquine-containing compounds: a patent review (2010 - 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 9, p. 1003–1024, 2015.

NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314–316, 16 2016.

OAKHILL, J. S. et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6036, p. 1433–1435, 17 jun. 2011.

ODUMADE, O. A.; HOGQUIST, K. A.; BALFOUR, H. H. Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 193–209, jan. 2011.

OHTA, A. A Metabolic Immune Checkpoint: Adenosine in Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 29 mar. 2016.

ONZI, G. R. Abordagem de diferentes aspectos do microambiente e da heterogeneidade tumoral e sua influência no comportamento de gliomas. 2018.

PAGANO, J. S.; WHITEHURST, C. B.; ANDREI, G. Antiviral Drugs for EBV. **Cancers**, v. 10, n. 6, 13 jun. 2018.

PANTZIARKA, P. et al. The Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) Project. **ecancermedicalsecience**, v. 8, 10 jul. 2014.

PANTZIARKA, P. et al. ReDO_DB: the repurposing drugs in oncology database. **ecancermedicalsecience**, v. 12, 6 dez. 2018.

PANTZIARKA, P.; BOUCHE, G.; ANDRÉ, N. “Hard” Drug Repurposing for Precision Oncology: The Missing Link? **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 14 jun. 2018.

PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 3, p. 460–473, 20 jan. 2014.

PASTOR-ANGLADA, M.; PÉREZ-TORRAS, S. Emerging Roles of Nucleoside Transporters. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

PATEL, S. S. et al. Differential inhibition of 2'-deoxycytidine salvage as a possible mechanism for potentiation of the anti-human immunodeficiency virus activity of 2',3'-dideoxycytidine by dipyridamole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 6, p. 1250–1253, jun. 1991.

PATHRIA, P.; LOUIS, T. L.; VARNER, J. A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 4, p. 310–327, 1 abr. 2019.

PERLMUTTER, M. A.; LEPOR, H. Androgen Deprivation Therapy in the Treatment of Advanced Prostate Cancer. **Reviews in Urology**, v. 9, n. Suppl 1, p. S3–S8, 2007.

PROIKAS-CEZANNE, T. et al. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 2, p. 207–217, 15 jan. 2015.

PURI, C. et al. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1285–1299, 12 set. 2013.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews. Drug Discovery**, 12 out. 2018.

QIU, W. et al. Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 3, p. e1123, mar. 2014.

RAAB-TRAUB, N. Novel Mechanisms of Oncogenesis by the Epstein Barr Virus. **Current opinion in virology**, v. 2, n. 4, p. 453–458, ago. 2012.

RABANAL-RUIZ, Y.; OTTEN, E. G.; KOROLCHUK, V. I. mTORC1 as the main gateway to autophagy. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 565–584, 12 dez. 2017.

RAHMAN, N. et al. Soluble adenylyl cyclase is essential for proper lysosomal acidification. **The Journal of General Physiology**, v. 148, n. 4, p. 325–339, 1 out. 2016.

RASCHE, L. et al. EBV-induced post transplant lymphoproliferative disorders: a persisting challenge in allogeneic hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, n. 2, p. 163–167, fev. 2014.

RASCHKO, J. W. et al. A phase I study of carboplatin and etoposide administered in conjunction with dipyridamole, prochlorperazine and cyclosporine A. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 403–410, 2000.

REGGIORI, F.; UNGERMANN, C. Autophagosome Maturation and Fusion. **Journal of Molecular Biology**, Molecular Mechanisms of Autophagy, Part B. v. 429, n. 4, p. 486–496, 17 fev. 2017.

RENZO, L. DI et al. Endogenous TGF- β contributes to the induction of the EBV lytic cycle in two burkitt lymphoma cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 57, n. 6, p. 914–919, 1994.

ROGOSNITZKY, M. et al. Ocular Applications of Dipyridamole: A Review of Indications and Routes of Administration. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 32, n. 2, p. 83–89, 1 mar. 2016.

ROSENFELD, M. R. et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Autophagy**, v. 10, n. 8, p. 1359–1368, 1 ago. 2014.

RUSSELL, R. C.; YUAN, H.-X.; GUAN, K.-L. Autophagy regulation by nutrient signaling. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 42–57, jan. 2014.

SANCAK, Y. et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface

and is necessary for its activation by amino acids. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 290–303, 16 abr. 2010.

SANCHEZ, E. L.; LAGUNOFF, M. Viral activation of cellular metabolism. **Virology**, v. 479–480, p. 609–618, maio 2015.

SANFORD, B. et al. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. **Virus Research**, v. 213, p. 165–171, 2 fev. 2016.

SCHER, H. I. et al. Prevalence of Prostate Cancer Clinical States and Mortality in the United States: Estimates Using a Dynamic Progression Model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 13 out. 2015.

SETTEMBRE, C. et al. Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 5, p. 283–296, maio 2013.

SHI, Y. et al. Androgens Promote Prostate Cancer Cell Growth through Induction of Autophagy. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 280–295, fev. 2013.

SHVETS, E. et al. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. Pt 16, p. 2685–2695, 15 ago. 2008.

SIXBEY, J. W. et al. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 310, n. 19, p. 1225–1230, 10 maio 1984.

SPANO, D. et al. Dipyridamole prevents triple-negative breast-cancer progression. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 30, n. 1, p. 47–68, jan. 2013.

STEPHAN, J. S. et al. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 40, p. 17049–17054, 6 out. 2009.

SZEBENI, J. et al. Dipyridamole potentiates the inhibition by 3'-azido-3'-deoxythymidine and other dideoxynucleosides of human immunodeficiency virus replication in monocyte-macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 10, p. 3842–3846, maio 1989.

TAKADA, K. Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. **International Journal of Cancer**, v. 33, n. 1, p. 27–32, 15 jan. 1984.

TAKADA, K. Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 2, p. 162–165, abr. 2012.

TAKAMURA, A. et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. **Genes & Development**, v. 25, n. 8, p. 795–800, 15 abr. 2011.

TAKEBE, T.; IMAI, R.; ONO, S. The Current Status of Drug Discovery and Development as Originated in United States Academia: The Influence of Industrial and Academic Collaboration on Drug Discovery and Development. **Clinical and Translational Science**, v. 11, n. 6, p. 597–606, nov. 2018.

TAN, M. E. et al. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 3–23, jan. 2015.

TENSER, R. B.; GAYDOS, A.; HAY, K. A. Inhibition of herpes simplex virus reactivation by dipyridamole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3657–3659, dez. 2001.

TEPLY, B. A.; HAUKE, R. J. Chemotherapy options in castration-resistant prostate cancer. **Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India**, v. 32, n. 4, p. 262–270, 2016.

THAI, M. et al. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell

anabolic glucose metabolism and virus replication. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 694–701, 1 abr. 2014.

THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 24, p. 4622–4632, 15 dez. 2016.

THOMPSON, M. P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr Virus and Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 803–821, 1 fev. 2004.

THOMPSON, S. K.; DOERR, T. D.; HENGERER, A. S. Infectious mononucleosis and corticosteroids: management practices and outcomes. **Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery**, v. 131, n. 10, p. 900–904, out. 2005.

THORLEY-LAWSON, D. A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v. 1, n. 1, p. 75–82, out. 2001.

THORLEY-LAWSON, D. A.; GROSS, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 13, p. 1328–1337, 25 mar. 2004.

TSAO, S.-W. et al. The role of Epstein–Barr virus in epithelial malignancies. **The Journal of Pathology**, v. 235, n. 2, p. 323–333, jan. 2015.

UNDERWOOD, M. R. et al. Mechanism of Action of the Ribopyranoside Benzimidazole GW275175X against Human Cytomegalovirus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1647–1651, maio 2004.

VASTAG, L. et al. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 7, p. e1002124, jul. 2011.

VIDAL, I. et al. Novo Teste Combinado Exercício-Dipiridamol para Cardiologia Nuclear no Esforço Insuficiente: Adequada Sensibilidade Diagnóstica Mantendo Prognóstico do Exercício. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, n. 2, p. 123–129, ago. 2015.

WALCZAK, M.; MARTENS, S. Dissecting the role of the Atg12–Atg5–Atg16 complex during autophagosome formation. **Autophagy**, v. 9, n. 3, p. 424–425, 1 mar. 2013.

WANG, C. et al. Dipyrindamole analogues as pharmacological inhibitors of equilibrative nucleoside transporters. Identification of novel potent and selective inhibitors of the adenosine transporter function of human equilibrative nucleoside transporter 4 (hENT4). **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 11, 1 dez. 2013.

WANG, F.-Z. et al. Maribavir Inhibits Epstein-Barr Virus Transcription in Addition to Viral DNA Replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 23, p. 12108–12117, dez. 2009.

WANG, Q. et al. Anti-apoptotic role of BAF1 in gastric cancer cells. **Cancer Letters**, v. 238, n. 1, p. 90–103, 8 jul. 2006.

WANG, Q. et al. Inhibiting autophagy overcomes docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer cells. **International Urology and Nephrology**, v. 50, n. 4, p. 675–686, abr. 2018.

WEI, Y. et al. Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1012789, 2018.

WENZEL, J. et al. Inhibition of pulmonary metastasis in a human MT3 breast cancer xenograft model by dual liposomes preventing intravasal fibrin clot formation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 1, p. 13–22, maio 2010.

WENZEL, J.; ZEISIG, R.; FICHTNER, I. Inhibition of breast cancer metastasis by dual liposomes to disturb complex formation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, n. 1, p. 121–128, 31 mar. 2009.

WHITE, E.; MEHNERT, J. M.; CHAN, C. S. Autophagy, Metabolism, and Cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 21, n. 22, p. 5037–5046, 15 nov. 2015.

WILLSON, J. K. V. et al. Phase I Clinical Trial of a Combination of Dipyridamole and Acivicin Based upon Inhibition of Nucleoside Salvage. **Cancer Research**, v. 48, n. 19, p. 5585–5590, 1 out. 1988.

WIRECKI, M. Treatment of angina pectoris with dipyridamole: A long-term double blind study. **Journal of Chronic Diseases**, v. 20, n. 3, p. 139–145, 1 mar. 1967.

WOLPIN, B. M. et al. Phase II and pharmacodynamic study of autophagy inhibition using hydroxychloroquine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma. **The Oncologist**, v. 19, n. 6, p. 637–638, jun. 2014.

WU, C.-C. et al. Epstein-Barr virus DNase (BGLF5) induces genomic instability in human epithelial cells. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 6, p. 1932–1949, abr. 2010.

XIE, Y. et al. Alpha-Herpesvirus Thymidine Kinase Genes Mediate Viral Virulence and Are Potential Therapeutic Targets. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

XU, Y. et al. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7783–7792, 1 ago. 2006.

XUE, H. et al. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1232–1244, 13 jul. 2018.

YAN, K. et al. The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 5, p. 3715–3723, maio 2016.

YANG, Y. et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 625–635, maio 2013.

YANG, Z. J. et al. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1533–1541, set. 2011.

YOSHIZAKI, T. et al. Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 17, n. 5, p. 431–436, jul. 1999.

YOUNG, J. D. et al. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 529–547, jun. 2013.

YU, X.; LONG, Y. C.; SHEN, H.-M. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. **Autophagy**, v. 11, n. 10, p. 1711–1728, 3 out. 2015.

YUN, C. W.; LEE, S. H. The Roles of Autophagy in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 5 nov. 2018.

ZACHARI, M.; GANLEY, I. G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. **Essays in Biochemistry**, v. 61, n. 6, p. 585–596, 12 dez. 2017.

ZHANG, L. et al. Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 48, p. 19023–19028, 27 nov. 2007.

ZHAO, R. et al. Endothelial cells promote metastasis of prostate cancer by enhancing autophagy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 37, 10 set. 2018.

ZUR HAUSEN, H. et al. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promoter TPA. **Nature**, v. 272, n. 5651, p. 373–375, 23 mar. 1978.



Marcos Paulo Thomé

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3081965459219273>

Última atualização do currículo em 29/07/2019

Resumo informado pelo autor

Bacharel em Biomedicina com habilitações em Biologia Molecular e Reprodução Humana Assistida, formado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul com período sanduíche na Universidade do Porto. Mestre em Biologia Celular e Molecular e atualmente é bolsista de doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com período sanduíche na Sorbonne Université, desenvolvendo atividade de pesquisa na área de modulação da autofagia na terapia tumoral e reposicionamento farmacológico.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Marcos Paulo Thomé

Dados pessoais

Nascimento 23/08/1991 - Campinas do Sul/RS - Brasil

CPF 024.649.810-28

Formação acadêmica/titulação

2015 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
com período sanduíche em Sorbonne Université (Orientador: Alexandre Escargueil)
Título: IMPACTO DA AUTOFAGIA INDUZIDA PELA CAPTAÇÃO DE ADENOSINA EXTRACELULAR EM GLIOBLASTOMA

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impevtrata

1/6



Orientador: Guido Lenz
Co-orientador: Márcia Rosângela Wink
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2013 - 2015 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Análise de autofagia pela razão de fluorescências do marcador laranja de acridina, Ano de obtenção: 2015



Orientador: Guido Lenz
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2018 - 2019 Especialização em Medicina Legal e Ciências Forenses.
UNYLEYA EDITORA E CURSOS S/A, Unyleya, Brasília, Brasil
Título: Evolução da identificação criminal no Brasil

2017 - 2017 Especialização em Análises Clínicas.
UNYLEYA EDITORA E CURSOS S/A, Unyleya, Brasília, Brasil
Título: microRNAs seminais com potencial diagnóstico para câncer de próstata
Orientador: Ana Isabel de Camargo

2009 - 2013 Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
com período sanduíche em Universidade do Porto (Orientador: Olga Lage)
Título: Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina
Orientador: Guido Lenz

Formação complementar

2009 - 2009 Extensão universitária em Identificação Fúngica Laboratorial.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

2002 - 2007 Oral and Written Communication Course . (Carga horária: 456h).
Centro de Cultura Anglo-Americana, CCAA, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2013 - Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado Acadêmico, Regime: Dedicção exclusiva

2012 - 2013 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitoria Acadêmica da disciplina de Biofísica Biomédica III (Bio10016)

2010 - 2010 Vínculo: Monitoria Acadêmica , Enquadramento funcional: Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD , Carga horária: 20, Regime: Parcial

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impevtrata

2/6

Outras informações:
Monitoria Acadêmica da disciplina de Anatomia Humana I para Biomedicina (CBS05032).

2010 - 2013 Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividade realizada no Laboratório de Sinalização e Plasticidade celular do Departamento de Biofísica. Bolsista do programa PROBIC FAPERGS-UFRGS.

Atividades

08/2012 - 01/2013 Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica

Estágio:
Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD da disciplina de Biofísica Biomédica III

08/2010 - 12/2010 Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica

Estágio:
Monitoria Voluntária na disciplina de Biofísica Biomédica I (BIO10013).

04/2010 - 08/2013 Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica

Estágio:
Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular

03/2010 - 07/2010 Estágio, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Ciências Morfológicas

Estágio:
Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD da disciplina de Anatomia Humana I para Biomedicina (CBS05032)

07/2009 - 10/2009 Estágio, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos

Estágio:
Estágio Voluntário de Iniciação Científica. Ênfase em microbiologia e biologia molecular.

2. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Atividade didática orientada , Enquadramento funcional: Estágio de docência, Regime: Parcial
Outras informações:
Disciplina ministrada: Biologia Molecular e Genética para Enfermagem

Atividades

08/2014 - 09/2014 Graduação, Enfermagem

Disciplinas ministradas:
Biologia Molecular e Genética

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvtrata

3/6

3. Hospital Femina - FEMINA

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Curricular Supervisionado , Carga horária: 36, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio realizado em Reprodução Humana Assistida

Atividades

02/2013 - 08/2013 Estágio, Setor de Reprodução Assistida

Estágio:
Estágio realizado em Reprodução Humana Assistida

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos


- 1.** [doi](#) THOMÉ, MARCOS P.; PEREIRA, LUIZA C.; ONZI, GIOVANA R.; ROHDEN, FRANCIELLI; ILHA, MARIANA; GUMA, FÁTIMA T.; WINK, MÁRCIA R.; LENZ, GUIDO. Dipyridamole impairs autophagic flux and exerts antiproliferative activity on prostate cancer cells. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH. [2019](#), v.382, p.1114564 - , 2019.
- 2.** [doi](#) GONÇALVES, ROSÂNGELA MAYER; AGNES, JONATHAN PAULO; DELGOBO, MARINA; DE SOUZA, PRISCILA OLIVEIRA; THOMÉ, MARCOS P.; HEIMFARTH, LUANA; LENZ, GUIDO; MOREIRA, JOSÉ CLÁUDIO FONSECA; ZANOTTO-FILHO, ALFEU. Late autophagy inhibitor chloroquine improves efficacy of the histone deacetylase inhibitor SAHA and temozolomide in gliomas. BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY. [2019](#), v.163, p.440 - 450, 2019.
- 3.** [doi](#) LIMA, KELLY GOULART; KRAUSE, GABRIELE CATYANA; SCHUSTER, ALINE DANIELE; CATARINA, ANDERSON VELASQUE; BASSO, BRUNO SOUZA; DE MESQUITA, FERNANDA CRISTINA; PEDRAZZA, LEONARDO; MARCZAK, ELISA SIMON; MARTHA, BIANCA ANDRADE; NUNES, FERNANDA BORDIGNON; CHIELA, EDUARDO CREMONESE FILIPPI; JAEGER, NATÁLIA; THOMÉ, MARCOS PAULO; HAUTE, GABRIELA VIEGAS; DIAS, HENRIQUE BREGOLIN; DONADIO, MÁRCIO VINÍCIUS FAGUNDES; DE OLIVEIRA, JARBAS RODRIGUES. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY. [2016](#), v.84, p.1282 - 1290, 2016.
- 4.** [doi](#) Klionsky, Daniel J; Abdelmohsen, Kotb; Abe, Akhisa; Abedin, Md Joynal; Abelovich, Hagai; Acevedo Arozena, Abraham; Adachi, Hiroaki; Adams, Christopher M; Adams, Peter D; Adeli, Khosrow; Adhithy, Peter J; Adler, Sharon G; Agam, Galia; Agarwal, Rajesh; Aghi, Manish K; Agnello, Maria; Agostinis, Patricia; Aguilár, Patricia Y; Aguirre-Chiso, Julio; Airoldi, Edoardo M; Alt-Si-Ali, Silmane; Akematsu, Takahiko; Akporiaye, Emmanuel T; Al-Rubeal, Mohamed; Albaladejo, Guillermo M; *et al* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy (Georgetown, TX). [2016](#), v.12, p.1 - 222, 2016.

https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impvtrata

4/6

03/08/2019

Currículo Lattes

8.  THOMÉ, M. P.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; Lenz, G.
Vincristina induz apoptose, parada no ciclo celular e autofagia em células de gliomas In: XXIII Salão de Iniciação Científica, 2011, Porto Alegre.
XXIII Salão de Iniciação Científica ., 2011.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 03/08/2019 às 16:17:58.