

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**ATIVAÇÃO DE AUTOFAGIA FRENTE AO TRATAMENTO COM
OXALIPLATINA EM CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL**

Diana Lilian Bordin

Tese submetida 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 grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pegas Henriques

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Emmanuel Escargueil

Porto Alegre, Março de 2013.

We can be heroes,

just for one day....

David Bowie

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS

Esta tese foi desenvolvida principalmente no Laboratório de Reparo de DNA em Eucariotos, situado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte das atividades experimentais foram realizadas durante estágio-sanduíche no laboratório *Biologie et Thérapeutiques du Cancer* e no *Centre de Recherche Saint-Antoine* INSERM – UPMC (Paris, França). Este trabalho foi subsidiado pelo CNPq, o qual concedeu a bolsa de doutorado no país, e pelo Projeto PRONEX/FAPERGS/CNPq n° 10/0044-3. Este trabalho também recebeu auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Projeto CAPES/COFECUB n° 583/07), o qual concedeu a bolsa de estágio-sanduíche na França, e pelo *Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale* (INSERM, França).

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, **Prof. João Antonio Pegas Henriques**, pela confiança depositada em meu trabalho. Obrigada por acreditar em mim, por me proporcionar imensas oportunidades e por contribuir com a ciência. Obrigada por continuar acreditando e confiando em mim!

Ao meu co-orientador **Alexandre Escargueil** e à **Prof. Annette K. Larsen**, pelos ensinamentos, discussões, ideias, oportunidades, convivência e paciência durante o meu período de estágio-sanduíche na França.

À **Daniëlle Grazziotin Soares** pela amizade e por todo o tipo de ajuda que eu poderia e não poderia esperar durante minha estadia na França.

Ao **Prof. Guido Lenz** que contribuiu mais do que significativamente para este trabalho e sempre me incentivou, me inspirou e me ensinou muito sobre autofagia.

Ao **CNPq**, à **CAPES** e à **FAPERGS**, pelo suporte financeiro que proporcionou a realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular** pelas oportunidades.

A todos os meus colegas que passaram pelo **Laboratório 210 da Biofísica** durante esses anos: Cristiano, Ana Lúcia, Valéria, Larissa, Nusha, Albanin, Fernanda, Clara, Brunas, Jaque, Dinara, Angelo, André, Renata, Fabrício, Iuri, Grethel, Lyda, Bic!

Um agradecimento especial à **Michelle de Souza Lima** que foi bolsista de iniciação científica do Laboratório 210 e trabalhou intensamente durante a execução desta tese. Sem a ajuda da Michelle nada teria acontecido!

À minha amiga e colega **Miriana Machado** que sempre me apoiou de todas as formas, me incentivou e teve muita paciência e compreensão.

À **Ana Lúcia**, pela amizade, pelas conversas e desabafos nos tempos difíceis, e por sempre torcer e acreditar em mim.

Aos amigos e colegas do laboratório *Biologie et Thérapeutiques du Cancer* e no *Centre de Recherche Saint-Antoine* INSERM – UPMC (Paris, França): Meryam, Radia, Djamila, Karima, Amelie, Aude-Marie, Paul, Virginie M., Virginie P.

A todo o pessoal do laboratório **Genotox-Royal**: Luísa, Cristiano, Nusha, Márcia, Tamiris, Flávia, Paula, Rose, Val, Miriana, Mirian, Bel e Jackie!

À **equipe** Miriana, Luísa, Cecília e Raquel, minhas amigas que estiveram por perto em bons e maus momentos.

Um agradecimento muito especial à **minha família**: Mãe, Daiane e Deise, que sempre acreditaram em mim e me deram todo o apoio para a realização desta tese.

ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho está dividido na seguinte forma: Introdução, Objetivos (gerais e específicos), dois capítulos escritos na forma de artigos científicos contendo uma página de apresentação sobre o assunto, um terceiro capítulo contendo resultados adicionais obtidos durante o desenvolvimento do projeto de doutorado, Discussão Geral, Conclusões (gerais e específicas), Perspectivas, Anexos e Referências.

A Introdução contempla uma breve descrição do microambiente de tumores sólidos, bem como sua influência na resposta das células de câncer à quimioterapia. Em seguida, a introdução aborda a importância da autofagia como mecanismo de sobrevivência ou de morte celular de células de câncer expostas ao microambiente tumoral, além de seu papel durante o tratamento quimioterápico. Dando sequência, a introdução descreve os mecanismos de ação e de resistência do agente alquilante oxaliplatina, o qual é utilizado no tratamento principalmente do câncer colorretal. Além disso, também é descrito a relação da autofagia com o tratamento anti-câncer utilizando oxaliplatina e suas consequências na quimioterapia.

O Capítulo I consiste de um artigo de revisão na qual são descritos os principais agentes alquilantes antitumorais utilizados na clínica oncológica e a sua relação com a indução de autofagia em células de câncer. Neste Capítulo, buscou-se discutir o papel da autofagia induzida em células de câncer em resposta aos danos no DNA causados pelo tratamento com agentes alquilantes. Estes resultados deram origem a um manuscrito que foi recentemente submetido para publicação na revista *Reviews in Mutation Research*.

No Capítulo II estão apresentados os resultados obtidos com o estudo do papel da autofagia induzida pelo tratamento com oxaliplatina na linhagem de câncer colorretal HCT116 cultivada em baixa e alta disponibilidade de glicose. Este Capítulo deu origem a um manuscrito, o qual será submetido para publicação.

A Discussão Geral contempla os comentários sobre os resultados apresentados nos dois Capítulos e no Anexo I (resultados adicionais), bem como ressalta a importância científica deste estudo. Após, estão descritas as Conclusões e as Perspectivas geradas por este trabalho, as Referências utilizadas na elaboração desta tese e os Anexos.

ÍNDICE

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEIRAS.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
ESTRUTURA DA TESE.....	VI
ÍNDICE.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Microambiente de tumores sólidos.....	17
1.2. Alterações Metabólicas em Células Tumorais.....	17
1.3. Microambiente Tumoral e Resistência à Quimioterapia.....	21
1.4. Autofagia.....	24
1.4.1. Maquinaria Molecular da Autofagia.....	26
1.4.2. Regulação da Autofagia.....	29
1.4.3. Papel da Autofagia no Câncer.....	32
1.4.3.1. Autofagia como supressor tumoral.....	32
1.4.3.2. Autofagia como um mecanismo de sobrevivência e resistência à quimioterapia.....	33
1.4.3.3. Autofagia e morte celular.....	34
1.5. Oxaliplatina.....	35
1.5.1. Atividade antitumoral da oxaliplatina contra o câncer colorretal.....	37
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.2. Objetivos Específicos	41
3. CAPÍTULO I – DNA Alkylation Damage and Autophagy Induction.....	42
Apresentação.....	43
4. CAPÍTULO II – Autophagy induction in colorectal cancer contributes to the tolerance of oxaliplatin under low glucose condition.....	81

Apresentação.....	82
5. DISCUSSÃO GERAL.....	108
6. CONCLUSÕES.....	119
7. PERSPECTIVAS.....	122
8. REFERÊNCIAS.....	125
ANEXO I – Resultados Adicionais.....	137
ANEXO II – Carta do Editor da Revista <i>Reviews in Mutation Research</i> ...	147
ANEXO III – <i>Curriculum Vitae</i>	149

LISTA DE ABREVIATURAS

2DG 2-deoxiglicose (*2-deoxyglucose*)

3BP 3-bromopiruvato (*3-bromopyruvate*)

3MA 3-metiladenina (*3-methyladenine*)

5FU 5-Fluorouracila

AG bases adenina-guanina

Akt/PKB proteína cinase B (*kinase protein B*)

AMPK proteína cinase ativada por AMP (*AMP-activated protein kinase*)

ATG genes relacionados à autofagia (*autophagy-related genes*)

Atg proteínas relacionadas à autofagia (*autophagy-related proteins*)

ATM proteína mutada na ataxia telangiectasia (Ataxia Telangiectasia-mutated protein)

ATP adenosina trifosfato

ATR: cinase ataxia telangiectasia e RAD3 relacionada (*ATM and RAD3-related*)

Bad proteína pro-apoptótica de domínio BH3-*only* promotora de morte associada à Bcl-2 (*pro-apoptotic BH3-only protein Bcl-2-associated death promoter*)

Bak proteína pro-apoptótica de domínio BH3-*only* antagonista/exterminadora homóloga à Bcl-2 (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*)

Bax proteína pro-apoptótica de domínio BH3-*only* X associada à Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*)

Bcl-2 proteína 2 de linfoma de células B (*B-cell lymphoma 2*)

Bcl-w proteína anti-apoptótica 2 Bcl-2-like (*Bcl-2-like protein 2*)

Bcl-xL proteína anti-apoptótica de linfoma de células B extra grande (*B-cell lymphoma-extra large*)

BER reparo por excisão de bases (*base excision repair*)

Bik proteína pro-apoptótica de domínio BH3-*only* exterminadora de interação com Bcl-2 (*pro-apoptotic BH3-only protein Bcl-2-interacting killer*)

BimEL proteína pró-apoptótica de domínio BH3-only BCL2L11 da isoforma 1 (*pro-apoptotic BH3-only protein BCL2L11 isoform 1*)

BNIP3 proteína 3 de interação com a proteína E1B de 19 kD (*pro-apoptotic BH3-only protein BCL2/ E1B 19 kDa protein-interacting protein 3*)

Chk1 cinase de ponto de checagem 1 (*checkpoint kinase 1*)

Chk2 cinase de ponto de checagem 2 (*checkpoint kinase 1*)

CQ cloroquina (*chloroquine*)

DACH diaminociclohexano (*diaminocyclohexane*)

DAPK proteína cinase associada à morte (*death-associated protein kinase*)

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DRAM gene modulador de autofagia induzido por dano (*damage-regulated autophagy modulator*)

EDTA ácido etilenodiaminotetracético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

ERCC1 *excision repair cross complementing group 1*

FIP200 proteína de interação com a família FAK de 200 kD (*FAK family-interacting protein of 200 kDa*)

GAP proteína ativadora de GTPase (*GTPase activating protein*)

GG guanina-guanina

GLUT1 transportador de glicose 1 (*glucose transporter 1*)

GNG guanina-N-guanina

GTP guanina trifosfato (*guanine triphosphate*)

GβL subunidade β-like da proteína G (*G protein β-subunit-like protein*)

HCQ hidrocloroquina (*hydrochloroquine*)

HIF1 fator indutor de hipóxia 1 (*hypoxia-inducible factor 1*)

HR reparo por recombinação homóloga (*homologous recombination*)

INCA Instituto Nacional do Câncer

IGFR receptor do fator de crescimento insulina-like (*insulin-like growth factor receptor*)

LC3I/LC3II formas I e II da cadeia leve 3 das proteínas associadas ao microtúbulo 1 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3-I and II*)

LDH 1 e 5 lactato desidrogenase 1 e 5 (*lactate dehydrogenase 1 and 5*)

LKB1 cinase do fígado B1 (*liver kinase B1*)

MAP1-LC3/LC3 cadeia leve 3 das proteínas associadas ao microtúbulo 1 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*)

Mcl-1 proteína responsável pela diferenciação celular em leucemia mielóide induzida (*induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*)

MCT 1 e 4 transportadores de monocarboxilato 1 e 4 (*monocarboxylate transporter 1 and 4*)

MDR resistência a múltiplas drogas (*multiple drug resistance*)

MMR reparo por pareamento incorreto de bases (*mismatch repair*)

mTOR proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin*)

mTORC1 complexo da mTOR 1 (*mTOR complex 1*)

mTORC2 complexo da mTOR 2 (*mTOR complex 2*)

MTT sal de tetrazólio (*thiazolyl blue tetrazolium bromide*)

NADPH nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NER reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*)

NHEJ ligações de terminações não homólogas (*non-hologous end joining*)

Noxa proteína pró-apoptótica de domínio BH3-only (*pro-apoptotic BH3-only protein*)

PDK1 proteína cinase 1 dependente de fosfoinositol (*phosphoinositide-dependent kinase 1*)

PE fosfatidiletanolamina (*phosphatidylethanolamine*)

PFK-1 fosfofrutoquinase 1 (*phosphofructokinase 1*)

PFKFB 6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bifosfatase (*6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase*)

PI3KI fosfatidilinositol 3-cinase classe I (*phosphoinositide kinase-3 class I*)

PI3KIII fosfatidilinositol 3-cinase classe III (*phosphoinositide kinase-3 class I*)

PIP₂ fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate*)

PIP₃ fosfatidilinositol 3,4,5-fosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate*)

PRAS40 substrato de Akt de 40 kD rico em prolina (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*)

PTEN proteína homóloga à fosfatase e tensina (*phosphatase and tensin homolog*)

PUMA proteína moduladora de apoptose modulada positivamente por p53 (*p53 upregulated modulator of apoptosis*)

Raptor proteína regulatória associada a mTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR*)]

Ras pequena GTPase primeiramente identificada em sarcoma de rato, (*small GTPase first identified in rat sarcoma*)

Rheb GTPase homóloga de Ras enriquecida no cérebro (*GTPase Ras homolog enriched in brain*)

SDS dodecil sulfato de sódio (*dodecyl sulfate sodium*)

SGLT transportador de glicose acoplado ao íon sódio (*sodium-glucose transporter*)

TSC1 complexo da esclerose tuberosa 1 (*tuberous sclerosis complex 1*)

TSC2 complexo da esclerose tuberosa 2 (*tuberous sclerosis complex 2*)

Ulk1/Ulk2 cinases Unc-51-like 1 e 2 (*Unc-51-like kinases 1 and 2*)

UVRAG gene associado à resistência à radiação (*ultraviolet irradiation resistance-associated gene*)

XPF Xeroderma Pigmentoso grupo F (*Xeroderma Pigmentosum group F*)

RESUMO

As células tumorais estão constantemente expostas a flutuações nas concentrações de nutrientes e oxigênio no microambiente tumoral. Através da ativação de diferentes vias de sinalização, as células tumorais sofrem uma reprogramação metabólica a fim de suportar as condições hostis impostas pelo microambiente tumoral. Uma das vias de sinalização ativada nessas condições é a autofagia, a qual tem sido considerada um dos principais mecanismos de sobrevivência celular em condições de estresse. Além disso, muitos medicamentos anti-câncer, como os agentes alquilantes, tem sido implicados na indução de autofagia. Apesar da autofagia contribuir com a sobrevivência da célula, uma superativação da via autofágica por períodos prolongados pode contribuir com a morte celular, o que faz com que o papel da autofagia no câncer seja ainda bastante debatido. Neste trabalho, buscou-se avaliar o papel da autofagia induzida em células de câncer colorretal da linhagem HCT116 continuamente cultivadas em baixa concentração de glicose e submetidas ao tratamento com o agente alquilante oxaliplatina. Os resultados demonstraram que a autofagia induzida em células HCT116 nessas condições exerce um papel citoprotetor, contribuindo para a resistência ao tratamento com oxaliplatina. A ativação da autofagia pelo tratamento com oxaliplatina em baixa concentração de glicose foi capaz de manter os níveis intracelulares de ATP e de reduzir a morte celular por apoptose. A utilização de inibidores ou de um ativador farmacológico da via autofágica, em combinação com a oxaliplatina, foi capaz de sensibilizar células HCT116 tratadas em baixa concentração de glicose, aumentando a morte celular por apoptose. Além disso, a indução de autofagia pela oxaliplatina foi mediada pela ativação de AMPK e inibição de mTOR. Estes dados demonstram que a ativação da autofagia em células de câncer colorretal HCT116 expostas a baixa concentração de glicose contribui para resistência ao tratamento com oxaliplatina. Estes dados também sugerem que a manipulação da via autofágica, pela sua inibição ou superativação, pode fornecer um maneira eficiente de limitar a progressão do tumor e aumentar a eficiência dos regimes quimioterápicos.

ABSTRACT

Tumor cells are constantly exposed to nutrients and oxygen concentration fluctuations at tumor microenvironment. Through activation of different signaling pathways, tumor cells undergo metabolic reprogramming to tolerate hostile conditions imposed by tumor microenvironment. One of the activated signaling pathways in such conditions is autophagy, which has been considered one of the central mechanisms of cell survival in stress conditions. Furthermore, many anticancer drugs, like alkylating agents, have been implicated in autophagy induction. Despite autophagy contribution to cell survival, the autophagic pathway activation for prolonged periods may contribute to cell death, which creates extensively debates about the role of autophagy in cancer. In the present work we intended to evaluate the role of autophagy induced in colorectal cancer cells HCT116 grown continuously in low glucose concentration and treated with the alkylating agent oxaliplatin. Our results showed that autophagy induced in HCT116 cells in these conditions plays a cytoprotective role, contributing to oxaliplatin resistance. The activation of autophagy by oxaliplatin in low glucose concentration was able to maintain the intracellular levels of ATP and to reduce apoptotic cell death. The combined use of pharmacologic inhibitors or an activator of autophagy with oxaliplatin was capable to sensitize HCT116 cells treated in low glucose concentration, increasing apoptotic cell death. Moreover, autophagy induction by oxaliplatin was mediated by the activation of AMPK and inhibition of mTOR. Our data demonstrate that autophagy activation in colorectal cancer cells HCT116 exposed to low glucose concentration contributes to the tolerance of oxaliplatin. These data also suggest that the manipulation of autophagic pathway, through its inhibition or hyperstimulation, may provide an effective manner of limiting tumor progression and increase chemotherapy effectiveness.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microambiente de Tumores Sólidos

O desenvolvimento do câncer é um processo composto de várias etapas na qual uma célula adquire sucessivas mutações em oncogenes e genes supressores tumorais (WHO, 2013). O resultado é um tumor constituído de células alteradas que proliferam descontroladamente e que possuem vantagens de sobrevivência em relação a células não tumorais. Tumores são considerados órgãos complexos, onde as células malignas estão em constante contato com células do estroma, como fibroblastos, células endoteliais e leucócitos (Swartz et al., 2012). Dessa forma, o produto da interação entre células malignas e do estroma, as quais podem interagir entre si ou fisicamente, ou através da secreção de moléculas de sinalização, caracterizam o microambiente tumoral (Mbeunkui & Johann Jr, 2009; Swartz et al., 2012).

As células tumorais estão em constante estado proliferativo e necessitam, portanto, de suprimento adequado de nutrientes, oxigênio. No entanto, uma das características marcantes dos tumores sólidos é a presença de áreas com difusão limitada de oxigênio e nutrientes (Vaupel, 2010). Essas condições são resultantes da formação insuficiente e irregular de novos vasos sanguíneos e que, dessa forma, não irrigam adequadamente o tumor (Kroemer & Pouyssegur, 2008; Vaupel, 2010). Neste contexto, um mecanismo adaptativo direciona as células tumorais a uma profunda reprogramação metabólica a fim de superar as restrições proporcionadas pelo microambiente tumoral (Berardi & Fantin, 2011).

1.2. Alterações Metabólicas em Células Tumorais

A primeira alteração metabólica observada em células tumorais foi descrita por Otto Warburg em 1920 (Warburg, 1956; Mathupala et al., 2010). Em células normais na presença de oxigênio, a via glicolítica implica na conversão de glicose em piruvato, o qual é completamente oxidado na mitocôndria pelo ciclo do ácido

cítrico e da fosforilação oxidativa em CO_2 e H_2O . Esse processo é altamente eficiente na produção de energia, gerando no total 38 moléculas de ATP por molécula de glicose. Em condições hipóxicas, as células normais convertem a glicose em lactato pela via glicolítica e interrompem a produção de energia pela fosforilação oxidativa, gerando apenas duas moléculas de ATP. Células de câncer comportam-se de maneira similar as células normais submetidas à hipóxia. No entanto, em contraste com as células não cancerosas, células tumorais mantêm constantemente a preferência pela produção de ATP pela via glicolítica mesmo em condições de alta disponibilidade de oxigênio (Bartrons & Caro 2007; Dang 2012). Essa alteração metabólica é conhecida como Efeito Warburg.

Embora o Efeito Warburg não se aplique a todos os cânceres, em certas células este efeito está ligado à ativação de oncogenes ou perda de supressores tumorais (Vander Heiden et al. 2009; Levine & Puzio-Kuter, 2010; Koppenol et al. 2011). Devido ao fato de que a via glicolítica gera apenas duas moléculas de ATP, o aumento do consumo de glicose pela célula tumoral é uma consequência direta dessa alteração metabólica. Além disso, as células tumorais utilizam elevadas quantidades de glicose como fonte de carbono para processos anabólicos, o que também explica um elevado consumo de glicose pelas células de câncer (Berardi & Fantin, 2011).

A reprogramação metabólica em células tumorais é promovida por vias de sinalização que estimulam a proliferação celular e que estão frequentemente alteradas em tumores (Cairns et al. 2011). Portanto, as alterações metabólicas na célula tumorais estão diretamente relacionadas com a transformação oncogênica. Alguns exemplos de vias de sinalização alteradas que contribuem para a readaptação metabólica são a superativação de Ras e da via fosfatidilinositol-3-cinase classe I (PI3K)/Akt (Cairns et al., 2011). Akt estimula a transcrição ou a atividade de enzimas glicolíticas como hexoquinase e fosfofrutoquinase, bem como de transportadores de glicose da membrana plasmática, enquanto que K-Ras promove a transcrição de diversas outras enzimas da via glicolítica (Elstrom et al., 2004; Fan et al., 2010). Além disso, a glicose não é a única molécula requerida para o crescimento das células tumorais. A utilização do aminoácido

glutamina também é estimulada, o que permite que as células produzam não somente proteínas, mas também ATP e ácidos nucleicos (El Mjiyad et al., 2011).

Existem diversas razões que explicam porque as alterações no metabolismo da glicose constitui uma vantagem para o crescimento do tumor:

1º) Em condições de superativação da via glicolítica, as células podem sobreviver durante flutuações na disponibilidade de oxigênio, o que poderia ser letal se as células utilizassem a fosforilação oxidativa para a geração de ATP (Pouyssegur et al., 2006; Levine & Puzio-Kuter, 2010).

2º) Apesar de a elevada produção de lactato proporcionar um ambiente ácido às células tumorais, o pH baixo inibe uma resposta imune contra o tumor, favorecendo sua capacidade invasiva (Kroemer & Pouyssegur, 2008). Além disso, o lactato produzido pelas células tumorais pode ser consumido pelas células do estroma, as quais desempenham um papel de tampão nesse ambiente. A enzima lactato desidrogenase tipo 1 (LDH1), a qual favorece preferencialmente a oxidação de lactato a piruvato, apresenta alta expressão na maioria das células que fazem parte do estroma (Koukourakis et al., 2006; Berardi & Fantin, 2011). Em contraste, a enzima lactato desidrogenase tipo 5 (LDH5), a qual possui uma capacidade maior de transformar piruvato em lactato, é altamente expressa nas células tumorais. Os transportadores monocarboxilato (MCT) também possuem um importante papel no metabolismo de células tumorais, mediando a troca bidirecional transmembrana de lactato e piruvato (Hirschhaeuser et al., 2011). A direção do transporte depende do gradiente de pH entre o ambiente intra e extracelular. A forte expressão de MCT4 nas membranas das células tumorais sugere o efluxo do lactato proveniente da glicólise. Já a expressão da isoforma MCT1 nas células do estroma associadas ao tumor, sugere um influxo do lactato liberado pelas células tumorais. Uma vez no interior das células do estroma, o lactato é oxidado a piruvato, o qual pode servir como combustível para suas próprias células ou então ser liberado no meio extracelular para o consumo das células tumorais (Sonveaux et al., 2008). Este comportamento demonstra que células do estroma associadas ao tumor contribuem para tamponar e reciclar os

produtos do metabolismo proveniente das células tumorais, facilitando a sobrevivência e proliferação do tumor (Zhang & Huang, 2011).

3º) O aumento do consumo de glicose assegura o funcionamento da via das pentoses-fosfato, via que metaboliza a glicose para a geração de NADPH, o qual é utilizado na produção de ácidos graxos. Esta via também é a única capaz de prover quantidades suficientes de ribose para a duplicação do DNA (Gatenby & Gillies, 2004; Vander Heiden et al., 2009).

4º) Uma das razões mais importantes para o aumento no aporte de glicose é que células de câncer utilizam intermediários da via glicolítica em reações anabólicas para síntese de aminoácidos e ácidos graxos, por exemplo (Gatenby & Gillies, 2004; Kroemer & Pouyssegur, 2008; Berardi & Fantin, 2011).

Alguns outros fatores importantes na readaptação metabólica de células tumorais estão relacionados com o transporte de glicose para dentro da células. Existem dois mecanismos de transporte de glicose através da membrana celular: o transporte facilitado, mediado por transportadores de membrana específicos (GLUT) e o co-transporte com o íon Sódio (SGLT). A expressão dos transportadores GLUT é tecido e célula específica, sendo que cada um dos tipos de GLUT identificados, apresenta um papel definido no metabolismo celular e na homeostase glicêmica (Szablewski, 2013). Tumores sólidos geralmente apresentam maior expressão de GLUT1, um transportador não sensível à insulina e responsável pela manutenção dos níveis basais de glicose intracelular. GLUT1 é expresso constitutivamente em todas as células, portanto o fluxo de glicose depende dos níveis de expressão do transportador, o qual em geral é muito mais alto em diversos tipos de câncer (Zhao & Keating, 2007; Herling et al., 2011). Portanto, a expressão de GLUT1, assim como de outros transportadores GLUT, pode ser diretamente correlacionada com o grau de malignidade do tumor (Szablewski, 2013).

Um dos principais efeitos gerados pela superativação da via glicolítica na célula tumoral, é a ativação do fator indutor de hipóxia 1 (HIF1), um fator de transcrição que é ativado por estresse hipóxico, mas também por estresse metabólico, oncogênico, inflamatório e oxidativo (Denko, 2008, Semenza, 2009).

O HIF1 estimula a conversão de glicose a piruvato e lactato pela superregulação de GLUT1, hexoquinase 1 e 2 (enzimas que catalisam a fosforilação de glicose a glicose-6-fosfato), LDH1 e MCT4 (Marín-Hernández et al., 2009; Semenza et al., 2010).

A adaptação metabólica das células tumorais também envolve a superexpressão da enzima bifuncional 6-fosfofrutoquinase-2/frutose-2,6-bifosfatase (PFKFB), a qual regula a velocidade da via glicolítica pela inibição/ativação da fosfofrutoquinase 1 (PFK-1) (Yalcin et al., 2009). A perda da função de supressores tumorais, como a proteína p53, também está implicada no aumento da síntese de isoenzimas PFKFB, favorecendo o consumo de glicose e o crescimento tumoral (Cheung & Vousden, 2010).

1.3. Microambiente Tumoral e Resistência à Quimioterapia

Diversos fatores no microambiente tumoral, entre eles o metabolismo alterado, a hipóxia, a acidez e a depleção de nutrientes, têm sido apontados como importantes causas de resistência no tratamento de tumores sólidos (Onozuka et al., 2011). Desta forma, a potencialização farmacológica dos agentes anti-câncer comumente utilizados na clínica oncológica é de grande importância para o tratamento eficiente de tumores sólidos (Vander Heiden, 2011). A combinação com compostos que interfiram diretamente com o metabolismo do tumor, ou que sejam ativados em condições específicas do microambiente tumoral, ou ainda, que possuam a capacidade de modificar características específicas do microambiente do tumor, tem sido intensamente investigadas a fim de superar a resistência ao tratamento, bem como evitar a utilização de altas doses e efeitos colaterais indesejáveis da quimioterapia (Jones & Schulze, 2012).

Baseado no fato de que a progressão do tumor e a resistência ao tratamento correlacionam muitas vezes com o metabolismo alterado das células tumorais, alguns inibidores farmacológicos que interferem no metabolismo tumoral têm sido desenvolvidos. A enzima hexoquinase tem sido inibida experimentalmente com o uso de 2-deoxiglicose (2DG) e 3-bromopiruvato (3BP) (Ganapathy-Kanniappan et al., 2013). 2DG é um análogo de glicose que entra

facilmente na célula via transportadores de glicose competindo com a glicose na via glicolítica (Hamanaka & Chandel, 2012). Uma vez no ambiente intracelular, 2-DG é fosforilada pela hexoquinase a 2DG-fosfato. No entanto, ao contrário da glicose, 2DG-fosfato não é metabolizada e acumula-se dentro da célula. Este acúmulo inibe efetivamente a via glicolítica e depleta a produção de energia. A subsequente queda no ATP intracelular leva à inibição da progressão do ciclo celular e eventual morte celular (Loar et al., 2010).

O agente alquilante 3BP é um análogo de lactato que entra na célula via transportadores de lactato. 3BP também é um potente inibidor da hexoquinase (Shoshan, 2012). No entanto, recentemente, tem sido demonstrado que o principal mecanismo de ação do 3-BP é a alquilação da enzima da via glicolítica gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e que a morte celular induzida por 3BP é mediada pela geração de radicais livres (Ganapathy-Kanniappan et al., 2010; Tennant et al., 2010). A depleção de ATP nas células tumorais pelo uso de 3BP e 2DG quando combinados com agentes antitumorais, tem demonstrado eficiência no tratamento de tumores resistentes, contribuindo para redução da síntese de macromoléculas e reparação de DNA (Ihrlund et al., 2008; Loar et al., 2010).

A presença de hipóxia em tumores é conhecida por levar à ativação de genes que estão associados com a angiogênese e sobrevivência celular, efeito mediado pelo fator de transcrição HIF1 (Adams et al., 2009). A expressão de genes induzidos pelo HIF1 resulta na expansão de populações de células com vias bioquímicas alteradas e que apresentam um fenótipo resistente. Células de câncer submetidas à hipóxia apresentam resistência por diversas razões: 1), células hipóxicas estão distantes dos vasos sanguíneos, e, portanto, não estão expostas igualmente ao agente anti-câncer em comparação com células que se encontram próximas dos vasos que irrigam o tumor (Vaupel, 2004; Rohwer & Cramer, 2011); 2), a velocidade da proliferação celular decresce com o aumento da distância dos vasos sanguíneos, portanto agentes anti-câncer que agem preferencialmente em células com alta taxa de proliferação, tornam-se menos eficientes (Rohwer & Cramer, 2011); 3) a hipóxia seleciona células que perderam a sensibilidade à apoptose mediada por p53 (Adams et al., 2009); 4) a eficiência da radioterapia, ou de agentes que mimetizam o efeito das radiações (bleomicina,

por exemplo) é progressivamente limitada quando a tensão parcial de oxigênio torna-se menor do que 25-30 mmHg (Vaupel et al., 2004; Pires et al., 2012); 5) a hipóxia regula genes envolvidos na resistência à quimioterápicos, incluindo genes que codificam a proteína MDR (resistência à múltiplas drogas), também conhecida como P-glicoproteína 1 (Milane et al., 2011). A fim de superar as limitações impostas pelas condições hipóxicas em tumores sólidos, algumas citotoxinas hipóxia-seletivas tem sido desenvolvidas. Citotoxinas inertes, como a tirapazamina, que são ativadas por enzimas redutoras no ambiente hipóxico, geram metabólitos tóxicos que causam danos e morte celular por diversos mecanismos (Lunt et al., 2010).

Células tumorais em proliferação produzem grandes quantidade de metabólitos ácidos gerados pela via glicolítica (Muñoz-Pinedo et al., 2012) Uma estratégia adotada por essas células é aumentar o efluxo de prótons, a fim de evitar a acidose intracelular e prevenir a apoptose. Desta forma o pH extracelular torna-se ácido, enquanto que o pH intracelular se mantém de neutro a alcalino (Webb et al., 2011). Normalmente, as moléculas de agentes anti-câncer se difundem através da membrana plasmática mais eficientemente na forma não-carregada. Desta forma, agentes básicos fracos que tem uma constante de dissociação ácida de 7,5 a 9,5, como doxorrubicina, mitoxantrona, vincristina e vinblastina acabam sendo protonados no ambiente extracelular e demonstram uma captação reduzida pela células de câncer (Gerweck et al., 2006; Tédran et al., 2007). O uso de compostos que aumentam o pH extracelular, como bicarbonato de sódio, inibidores de bombas de prótons e de transportadores monocarboxilato, têm mostrado eficiência em aumentar os efeitos quimioterapêuticos de diversos agentes *in vivo* e *in vitro* (Izumi et al., 2003; De Milito et al., 2005; Bellone et al., 2013).

Outras condições associadas ao microambiente tumoral, como a baixa disponibilidade de nutrientes, afetam a sensibilidade do tumor à quimioterapia (Akakura et al., 2001; Onozuka et al., 2011). Apesar de as células de câncer apresentarem uma grande avidez por glicose e uma superativação da via glicolítica, a limitação na concentração de glicose exige a modulação de outras vias metabólicas que permitam uma rápida adaptação celular a fim de manter a

proliferação descontrolada e a proteção contra os danos causados pela quimioterapia.

Dentre estas vias, a limitação de glicose ativa a autofagia, uma fonte alternativa de produção de energia na célula e que também tem papel na eliminação de macromoléculas e organelas danificadas (Lozy & Karantza, 2012). A autofagia é um processo altamente conservado evolutivamente, sendo ativada em resposta a diferentes estressores, como por exemplo, hipóxia, depleção de nutrientes e fatores de crescimento, estresse oxidativo e danos no DNA (Jung et al., 2010). A autofagia é também uma via utilizada na eliminação de patógenos e no engolfamento de células apoptóticas (Qu et al., 2007; Oh & Lee, 2012). Embora muitas evidências apontem a autofagia como uma forma de sustentar a viabilidade de células tumorais, paradoxalmente, a morte celular com aspectos autofágicos resultante do progressivo consumo de componentes celulares tem sido atribuída à autofagia desenfreada (Shen et al., 2012). Desta forma, a consequência funcional da indução da autofagia no câncer ainda é amplamente debatida. Portanto, um maior entendimento do papel da autofagia sob diferentes situações de estresses celulares e a sua consequência na tumorigênese, podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o tratamento do câncer.

1.4. Autofagia

Autofagia é um processo catabólico com funções críticas na manutenção da homeostase celular e que possui como finalidade, preservar a viabilidade celular em condições de estresse (Yang et al., 2010). Na autofagia, os componentes celulares a serem degradados, que podem ser macromoléculas ou até mesmo organelas inteiras, são englobados por estruturas de membrana dupla chamadas de autofagossomos (**Figura 1**).

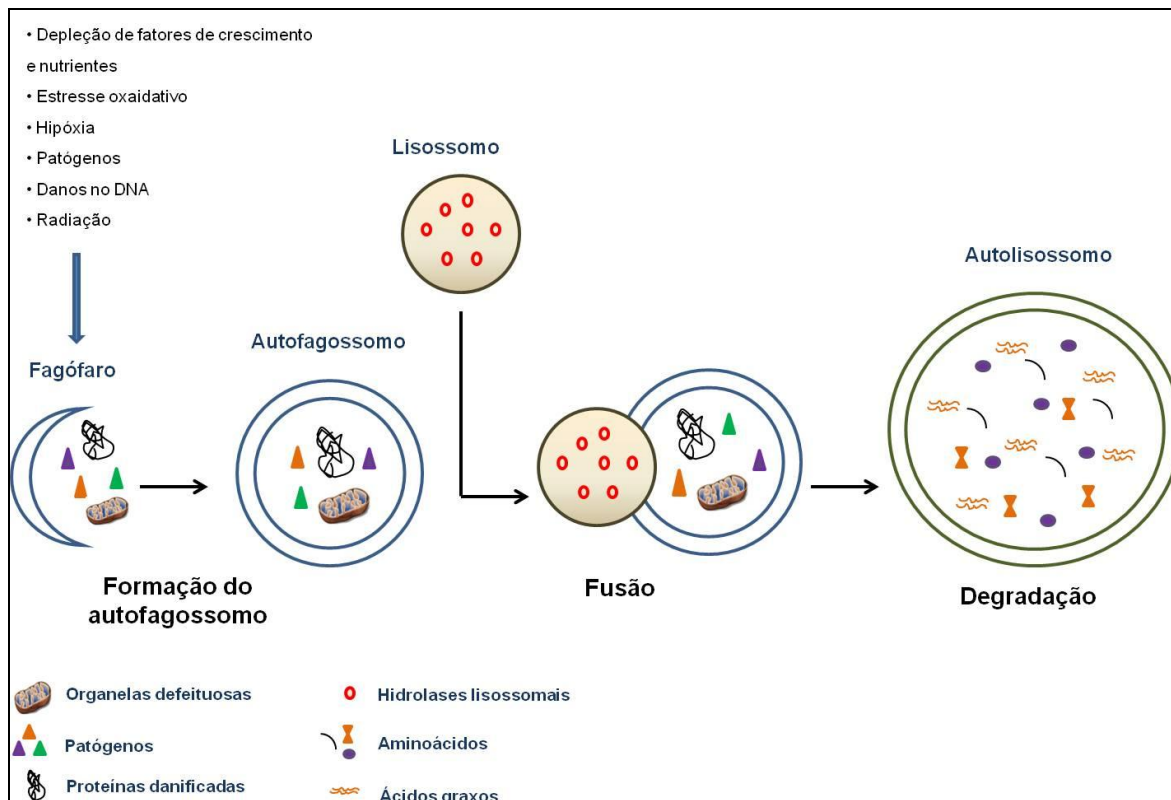


Figura 1. A via autofágica. A indução da autofagia ocorre em resposta a uma grande variedade de estressores celulares. A autofagia envolve o sequestro de proteínas, organelas citosólicas e patógenos em estruturas chamadas de autofagossomos. A fusão do autofagossomo com o lisossomo dá origem ao autolisossomo, onde os componentes citosólicos são degradados pelas hidrolases lisossomais. O processo de degradação libera aminoácidos e macromoléculas, como ácidos graxos, os quais são reutilizados pela célula. Adaptado de Rodriguez-Rocha et al., 2011.

A origem da membrana do autofagossomo ainda é amplamente debatida. Tem sido hipotetizado que os autofagossomos podem ser gerados *de novo* a partir de moléculas precursoras pré-existentes, ou então serem formados a partir do isolamento de outras membranas intracelulares como a do retículo endoplasmático (Tooze & Yoshimori, 2010).

Os autofagossomos, por sua vez, se fundem com lisossomos formando os autolisossomos, onde então o material celular é degradado através da ação das hidrolases lisossomais. O processo de degradação resulta na liberação de aminoácidos livres e macromoléculas, os quais são transportados de volta ao citosol para serem reutilizados (Kung et al., 2011).

Proteínas de vida curta são degradadas preferencialmente pelo sistema ubiquitina-proteassoma, enquanto que a autofagia degrada grandes agregados de proteínas e organelas citoplasmáticas inteiras (He & Klionsky, 2009, Kung et al., 2011). Inicialmente a autofagia foi considerada um processo predominantemente inespecífico e aleatório. No entanto, recentemente, tem sido observado que a autofagia também degrada seletivamente alguns constituintes celulares como a mitocôndria (mitofagia), o núcleo (nucleofagia) e o retículo endoplasmático (reticulofagia) em condições específicas de estresse (Hughson et al., 2012).

A autofagia foi primeiramente identificada em organismos eucarióticos unicelulares que sobrevivem em constantes flutuações no suprimento de nutrientes. No entanto, embora a maquinaria molecular autofágica seja notavelmente conservada, ela tem sido modificada de diversas formas de modo a favorecer a complexidade e diversidade celular de organismos eucarióticos superiores (Akers et al., 2012).

1.4.1. Maquinaria Molecular da Autofagia

A maquinaria molecular básica autofágica envolve a atividade de proteínas relacionadas à autofagia (Atg), as quais são codificadas pelos genes ATG (Yang & Klionsky, 2010). Os genes ATG foram inicialmente identificados em leveduras e são considerados marcadores específicos da via autofagia. A identificação dessas proteínas permitiu a compreensão da formação dos autofagossomos em nível molecular.

O processo de formação dos autofagossomos (**Figura 2**) pode ser dividido em etapas de iniciação, onde ocorre o início da formação da membrana, alongamento da membrana e maturação do autofagossomo.

A fase inicial da geração do autofagossomos em mamíferos é dependente de um complexo estável de proteínas quinase contendo a proteína Ulk1 (Atg 1 em leveduras) e diversas outras proteínas identificadas recentemente, como Atg13 e FIP200. Atg13 liga-se à Ulk1, ou ao seu homólogo Ulk2, e media sua interação com FIP200. Em condições limitadas de nutrientes, por exemplo, Atg13 e Ulk1/2

são desfosforiladas, o que ativa Ulk1/2 e induz a fosforilação de FIP200 dando início à formação do autofagossomo (Ravikumar et al., 2010). Esse complexo transloca-se até a membrana isolada que dará origem ao autofagossomo, a qual é conhecida como fagóforo.

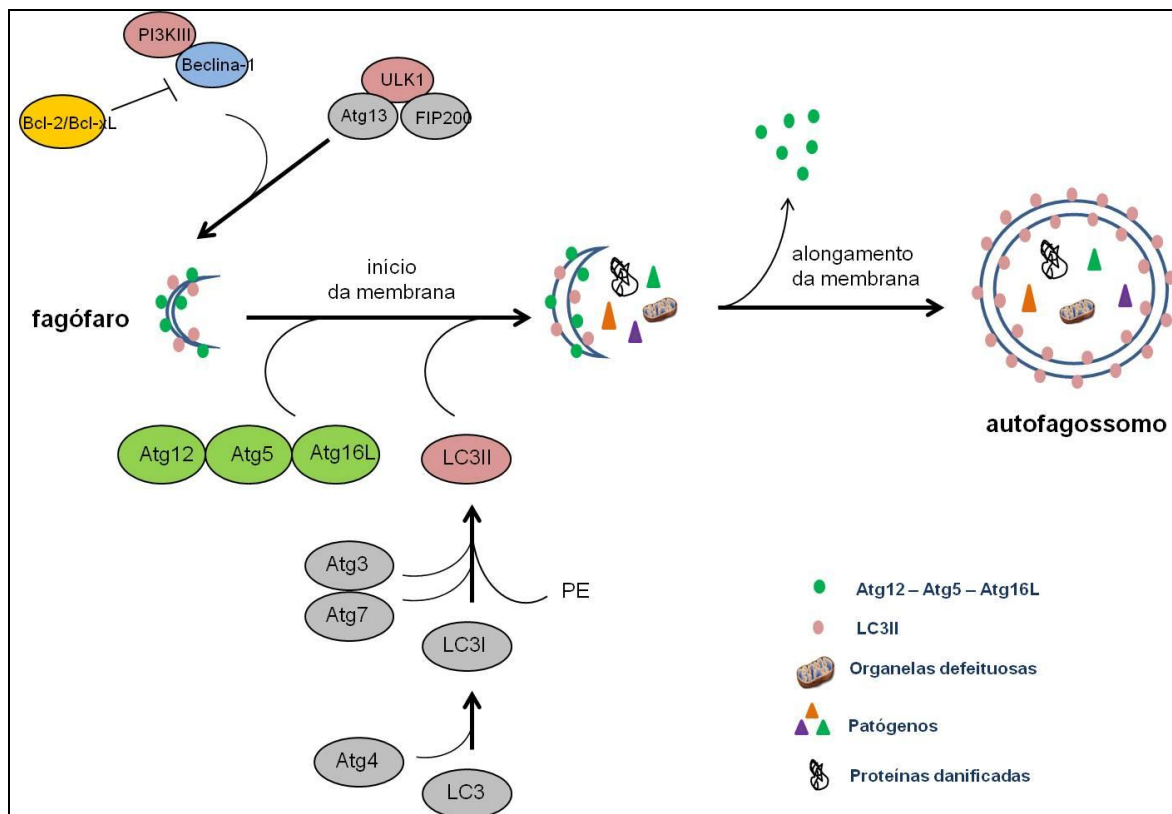


Figura 2. Maquinaria molecular básica envolvida no processo de formação dos autofagossomos. A autofagia é iniciada pelo complexo Ulk1/Atg13/FIP200. Nos passos iniciais da formação do autofagossomo ocorre a ativação de PI3KIII, a qual gera PIP3. Esta ativação depende da formação de um complexo multiprotéico que inclui a proteína Beclina-1. Beclina-1 interage constitutivamente com Bcl-2 e seu homólogo Bcl-xL, as quais agem como inibidoras da atividade de Beclina-1. A indução de autofagia requer, portanto, a dissociação de Beclina-1 dos seus inibidores. Para que ocorra o alongamento da membrana, dois sistemas de conjugação são necessários: o primeiro é formado pelas proteínas Atg5-Atg12-Atg16L, o qual se dissocia completamente da membrana quando o autofagossomo está maduro. O segundo complexo envolve a conjugação de fosfatidiletanolamina (PE) com LC3I pela ação sequencial de Atg4, Atg7 e Atg3. Essa conjugação de LC3I com PE leva a conversão da proteína à sua forma lipidizada (LC3II), a qual associa-se à membrana do autofagossomo permanecendo até que a estrutura seja finalizada. Adaptado de: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html> (acesso em 17/02/13).

A proteína quinase fosfatidilinositol-3-quinase classe III (PI3KIII), a qual se encontra complexada com a proteína Beclina-1 (ortólogo em mamíferos de Atg6 de leveduras) produz fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3), uma molécula lipídica sinalizadora que é crucial nas etapas iniciais da nucleação do autofagossomo (Ravikumar et al., 2010; Alers et al., 2012). Beclina-1 é essencial para a atividade de PI3KIII e para o início do processo autofágico, e é negativamente regulada pela interação com as proteínas antiapoptóticas Bcl₂/Bcl-x_L (Decuypere et al., 2012).

O alongamento da membrana do autofagossomo requer duas reações ubiquitina-*like*. Na primeira reação, Atg5 conjuga-se com Atg12, as quais então se ligam com Atg16L, formando um grande complexo multi-proteico que é recrutado até o fagóforo (Li et al., 2012). A segunda reação ubiquitina-*like* envolve a proteína MAP1-LC3 (*protein microtubule-associated protein 1 light chain 3*), também conhecida como LC3 e que é o ortólogo em mamíferos de Atg8 de leveduras (Mizushima, 2007). LC3 existe em duas isoformas na célula e é sintetizada como uma forma precursora, a qual sofre clivagem na sua extremidade carboxi-terminal pela protease Atg4B (Hemelaar et al., 2003) resultando na isoforma citosólica LC3-I. LC3-I é então conjugada à fosfatidiletanolamida em uma reação envolvendo Atg7 e Atg3 para formar LC3II (Kabeya et al., 2000). LC3II se une à membrana do fagóforo, sendo fundamental para a expansão da membrana do autofagossomo. Diferente do complexo Atg12-Atg5-Atg16L, LC3II permanece ligada as membranas interna e externa do autofagossomo até sua completa formação. Durante a fusão com o lisossomo, a proteína LC3II presente na membrana externa do autofagossomo é então delipidada por Atg4 e reciclada. A porção de LC3II presente na membrana interna do autofagossomo é degradada no autolisossomo. A associação específica de LC3II com a membrana do autofagossomo torna essa proteína um excelente marcador de indução de autofagia (Mizushima et al., 2011).

Fatores adicionais regulam o tráfego do autofagossomo, como as proteínas motoras dineína, para que ocorra a fusão com os autolisossomos (Kimura et al., 2008). Além disso, a adequada função lisossomal é também essencial para o

processo de fusão entre autofagossomos e lisossomos. A inibição de H⁺-ATPase por agentes químicos como a Bafilomicina-1, por exemplo, inibe esse processo (Ravikumar et al., 2010).

1.4.2. Regulação da Autofagia

Um esquema resumido dos principais controladores da via autofágica é demonstrado na **Figura 3**. Entre os numerosos reguladores da autofagia, a proteína-quinase mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) é o principal controlador da ativação/repressão da autofagia em resposta a condições celulares fisiológicas e de estresse (Jung et al., 2010). Além da autofagia, mTOR é o componente chave que coordena diversas funções celulares, como a transcrição e o início da tradução, crescimento celular e proliferação, biogênese de ribossomos e reorganização do citoesqueleto. mTOR pode formar dois complexos distintos, o complexo 1 da mTOR (mTORC1) e o complexo 2 da mTOR (mTORC2), sendo que mTORC1 tem como principal função a regulação da autofagia (**Figura 3**).

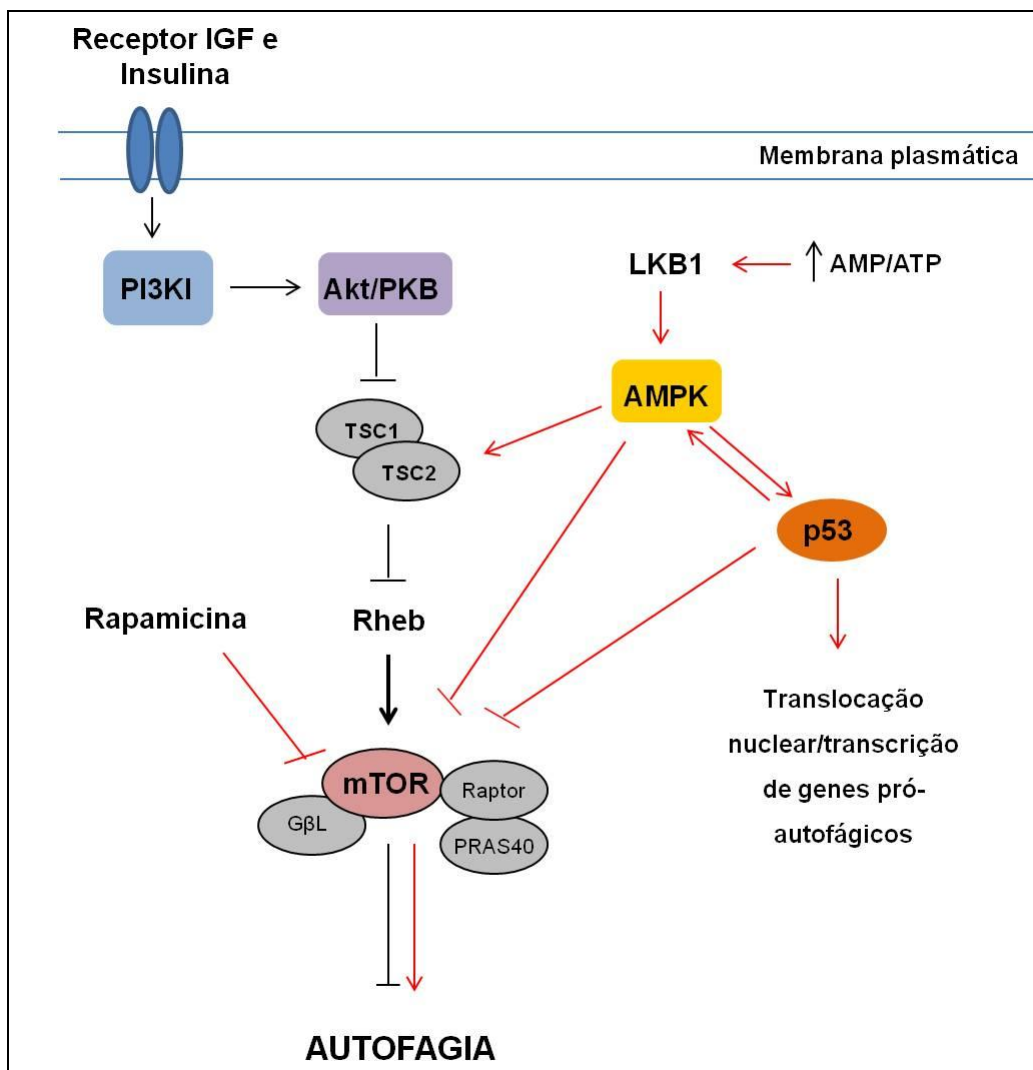


Figura 3. Principais vias de regulação da autofagia. PI3KI é ativada pela ligação de insulina ou fatores de crescimento nos receptores de insulina (IGFR), a qual ativa Akt/PKB. Akt fosforila e inibe TSC2, a qual está complexada com TSC1 e consequentemente inibe Rheb, ativando mTORC1. A ativação de mTORC1 inibe a autofagia. mTORC1 é inibida em resposta à ativação de p53, AMPK e pela presença de Rapamicina, resultando na ativação da autofagia. Vetores representados em preto indicam a sinalização de repressão da autofagia, enquanto que vetores em vermelho demonstram as vias responsáveis pela ativação da autofagia. Adaptado de: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html> (acesso em 17/02/13).

O complexo 1 da mTOR consiste da subunidade catalítica da mTOR, Raptor, GβL (também conhecida como mLST8) e PRAS40. (Hara et al., 2002; Vander Haar et al., 2007; Jung et al., 2010). A depleção de nutrientes ou a disponibilidade reduzida de fatores de crescimento inibem a atividade de mTORC1, o que tem sido considerado um passo crucial para a indução de

autofagia em células eucarióticas que necessitam de ajuste metabólico para sobreviver. A atividade de mTORC1 também pode ser inibida pela rapamicina, um antibiótico macrolídeo lipofílico isolado de *Streptomyces hygroscopicus* (Ravikumar et al., 2010). Em células de mamíferos, a rapamicina estabiliza a associação entre mTOR e Raptor, inibindo a atividade quinase de mTOR e agindo como um potente indutor da autofagia (Oshiro et al., 2004).

mTORC1 é ativado pela via PI3KI, a qual regula o crescimento celular ao sentir a disponibilidade de nutrientes através de fatores de crescimento e insulina. A ativação de PI3KI converte o lipídio de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-bifosfato (PIP3), o qual recruta proteínas com domínio de homologia à *pleckstrin*, como as serinas-treoninas quinases PDK1 e Akt/PKB à membrana plasmática (Yang & Klionsky, 2010).

A ativação de PI3KI/Akt inibe o heterodímero formado por TSC1/TSC2 (complexo da esclerose tuberosa 1 e 2), através da fosforilação de TSC2 por Akt, ativando mTORC1. TSC2 atua como uma GAP (proteína ativadora de GTPase) para a pequena GTPase homóloga de Ras enriquecida no cérebro (Rheb) (Huang & Manning, 2009). Rheb liga-se à mTOR de uma maneira dependente de GTP o que induz uma mudança conformacional em mTORC1 e ativação e fosforilação dos alvos a jusante de mTORC1. Em ausência da ativação da via PI3KI/Akt, TSC1/TSC2 inibe mTORC1 e ativa a autofagia (Akers et al., 2012).

A proteína-quinase AMPK (proteína cinase ativada por AMP) é outra importante reguladora da via autofágica (Kim et al., 2011). AMPK é sensível ao estado de energia na célula, sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP através da quinase LKB1. AMPK ativada leva à fosforilação e ativação de TSC1/TSC2, o que, por sua vez, inibe mTORC1 e induz autofagia. Portanto, a fosforilação de TSC1/TSC2 por AMPK e pela via PI3KI/Akt tem efeitos opostos sobre mTORC1.

Outro importante modulador da autofagia é a proteína supressora tumoral p53 (Maiuri et al., 2010). p53 regula a autofagia positivamente ou negativamente, dependendo da sua sublocalização celular. Em resposta ao estresse genotóxico,

ativação oncogênica, ou estresse por baixa disponibilidade de nutrientes, p53 é fosforilado e translocado até o núcleo onde age como fator de transcrição de genes envolvidos na autofagia. p53 pode induzir autofagia também pela inibição direta de mTORC1. Além disso, p53 pode fosforilar diretamente AMPK ou pode ativá-la pela indução da transcrição de genes específicos. Por sua vez, AMPK também fosforila e ativa p53, o que sugere um efeito de *feedback* positivo entre p53 e AMPK (Moruno et al., 2012). Outro mecanismo de indução de autofagia por p53 ocorre pela ativação transcricional de DRAM (gene modulador de autofagia induzido por dano), uma proteína lisossomal implicada na indução de autofagia. Contrastando com o fato de que p53 nuclear funciona como um fator de transcrição de genes pró-autofágicos, observações recentes e ainda pouco esclarecidas, demonstram que o *pool* citoplasmático de p53 suprime a autofagia, como evidenciado pela redução da fosforilação de AMPK e TSC2, bem como um aumento da atividade de mTOR (Tasdemir et al., 2008).

Proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w e Mcl-1, podem inibir a autofagia (Erlich et al., 2007). A ligação de Bcl-2, ou de seu homólogo Bcl-xL com Beclina-1 evita a associação de Beclina-1 com PI3KIII, o que inibe a formação de autofagossomos. No entanto, outras proteínas com domínios BH3, como as proteínas pró-apoptóticas com domínios BH3-*only* (BNIP3, Bad, Bik, Noxa, Puma e BimEL) podem competitivamente interromper a interação entre Beclina-1 e Bcl-2/Bcl-xL e induzir autofagia (Levine et al., 2008). Portanto, proteínas antiapoptóticas membros da família Bcl-2 e proteínas pró-apoptóticas BH3-*only*, participam da inibição e indução de autofagia, respectivamente.

1.4.3. Papel da Autofagia no Câncer

1.4.3.1. Autofagia como supressor tumoral

Um número crescente de estudos tem revelado a associação da autofagia com o surgimento de diversos tipos de tumores. Defeitos na via autofágica estão relacionados ao acúmulo de macromoléculas e organelas danificadas, o que contribui para o estresse oxidativo, danos no DNA e, portanto, instabilidade

genômica (Chen and Karantza, 2011). Desta forma, defeitos na autofagia têm sido associados ao acúmulo de mutações oncogênicas, o que aumenta consideravelmente a suscetibilidade ao câncer (Karanta-Wadsworth *et al.*, 2007; Mathew *et al.*, 2007). Além do câncer, o desenvolvimento de outras doenças, incluindo neurodegeneração, envelhecimento, infecções e miopatias, também está relacionado com defeitos na via autofágica (Levine and Kroemer, 2008). Uma das mais importantes evidências que suporta o papel da autofagia como supressora tumoral vem de estudos que demonstram que cerca de 75% dos cânceres de ovário, 50% dos cânceres de mama e 40% dos cânceres de próstata apresentam uma deleção monoalélica de Beclina-1 (Li *et al.*, 2012). Além disso, camundongos com genes Beclina-1 interrompidos mostram alta incidência de linfoma, câncer de pulmão e de fígado (Qu *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2003). Ainda neste contexto, uma grande variedade de proteínas supressoras tumorais possuem capacidade de induzir autofagia, como as proteínas com domínio BH3-*only* (Maiuri *et al.*, 2007), DAPK, uma serina/treonina cinase regulada por Ca^{+2} /calmodulina (Bialik and Kimchi, 2010), LKB1 (Liang *et al.*, 2007), UVRAG (gene associado à resistência à radiação ultravioleta) (Liang *et al.*, 2006), PTEN (proteína homóloga à fosfatase e tensina) (Arico *et al.*, 2001), TSC1/TSC2 (Zhou *et al.*, 2009), p53 nuclear (Maiuri *et al.*, 2010) e AMPK (Luo *et al.*, 2010). Coletivamente, estes fatos sustentam a ideia de que a autofagia desenvolve um papel de supressor tumoral, além de sugerir que a diminuição da atividade autofágica pode constituir uma característica marcante no desenvolvimento do câncer.

1.4.3.2. Autofagia como um mecanismo de sobrevivência e resistência à quimioterapia

Em células tumorais, o estresse metabólico resultante do suprimento insuficiente de oxigênio e nutrientes e da alta demanda metabólica, a autofagia é induzida como uma forma alternativa de obtenção de energia. Dessa forma, células tumorais acabam se tornando mais dependentes da autofagia para a sobrevivência em comparação às células não cancerosas (Lozy *et al.*, 2012). Além disso, a autofagia tem um papel proeminente em sustentar a viabilidade

celular em células tumorais com defeitos na apoptose. Nesse contexto, as células tumorais com apoptose defeituosa possuem marcadamente a capacidade de tolerar longos períodos de estresse metabólico ou por hipóxia ou por baixa concentração de glicose (Mathew et al., 2007; Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Por outro lado, a autofagia também é induzida como uma resposta celular adaptativa à diversas terapias anti-câncer, levando à quimioresistência e à sobrevivência das células de câncer (Chen and Karantza-Wadsworth, 2011). Diversas terapias antineoplásicas, incluindo radio e quimioterapia (doxorrubicina, temozolomida e cisplatina, por exemplo), inibidores de histona deacetilase, trióxido de arsênio, terapia hormonal e de inibição de receptores tirosina-quinase, induzem autofagia como uma forma citoprotetora em células de câncer (Notte et al., 2011; Yang et al., 2011). Dessa forma, um grande número de estudos utilizando modelos de tumores *in vitro* e *in vivo* tem avaliado os efeitos da inibição da autofagia empregando inibidores farmacológicos, como 3-metiladenina (3-MA, um inibidor de PI3KIII), bafilomicina 1 (um inibidor específico de H⁺-ATPase vacuolar), cloroquina (CQ) ou hidrocloroquina (HCQ) (agentes lisossomotrópicos que impedem a fusão entre autofagossomos e lisossomos), ou pelo *knockdown* de genes como ATG5, ATG6 e ATG7 (Chen et al., 2010). Notavelmente esses inibidores sensibilizam as células tumorais a uma grande variedade de modalidades terapêuticas. Neste aspecto, a inibição da autofagia combinada com agentes anti-câncer comumente utilizados na clínica oncológica, parece representar um importante recurso na sensibilização de células tumorais.

1.4.3.3. Autofagia e morte celular

A definição do papel da autofagia no câncer ainda é bastante discutida e permanece controversa. Enquanto a indução de autofagia parece ter um papel supressor tumoral em células saudáveis, a ativação da autofagia na célula tumoral parece contribuir com a sobrevivência celular durante a progressão do câncer (Rouschop and Wouters, 2009). Além disso, em paradoxo com seu papel citoprotetor, tem sido proposto que a ativação da autofagia por períodos prolongados pode levar à morte celular, provavelmente devido à excessiva

degradação dos constituintes celulares. Inicialmente a morte celular induzida por autofagia foi reconhecida como uma forma de morte celular não programada tipo II, em contraste com a apoptose, conhecida como morte celular programada tipo I (Choi et al., 2012). No entanto, a presença de autofagossomos em células que estão morrendo não indica necessariamente um aumento do fluxo autofágico. Este acúmulo pode resultar, por exemplo, do uso de inibidores da fusão de autofagossomos com lisossomos, o que neste caso, contribui com a morte celular, mas não por autofagia, pois interrompe o fluxo autofágico. Através de inúmeras pesquisas, atualmente tem se tornado claro que a autofagia constitui uma tentativa fútil de células que estão morrendo, a se adaptarem ao estresse letal, e não um mecanismo de morte celular programada (Shen et al., 2012). Dessa forma, o uso de indutores autofagia em combinação com outros agentes antineoplásicos, também proporciona uma interessante alternativa terapêutica para sensibilizar células de câncer ao tratamento (Yang et al., 2011).

1.5. Oxaliplatina

O agente alquilante oxaliplatina ((trans-R,R)1,2-diaminociclohexano oxalato platina (II)) é um derivado de terceira geração da platina e que apresenta uma ampla atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas e de camundongos (Alcindor & Beauger, 2011). A citotoxicidade da oxaliplatina tem sido demonstrada em modelos tumorais *in vitro* como leucemia, neuroblastoma, melanoma, câncer de pulmão, colorretal, mama, gástrico e de bexiga. De maneira interessante, os efeitos citotóxicos da oxaliplatina não são afetados em linhagens celulares resistentes à cisplatina ou carboplatina. Isso sugere um mecanismo de ação e de resistência diferenciado de outros compostos platinados, tornando-a potencialmente efetiva no tratamento de tumores com resistência intrínseca ou adquirida à cisplatina/carboplatina (Trigg & Flanigan-Minnick, 2011).

Embora a oxaliplatina seja estruturalmente diferente a cisplatina (**Figura 4**), ambos compostos tem a capacidade de formar os mesmo tipos de lesões nos mesmos locais do DNA.

No lugar dos grupos amino presentes na molécula de cisplatina, a oxaliplatina apresenta um ligante diaminociclohexano (DACH). Cisplatina e oxaliplatina formam predominantemente lesões do tipo pontes intracadeia, sendo aproximadamente 60 – 65% entre bases GG, 20 – 30% entre bases AG, 5 – 10% entre bases GNG, e somente de 1 – 3 % de pontes intercadeia entre bases GG (Todd & Lippard, 2009). No entanto, estudos sugerem que a oxaliplatina induz um número menor de lesões no DNA em comparação com quantidades equimolares de cisplatina (Woynarowski et al., 1998; Woynarowski et al., 2000; Solier et al., 2012). Estes dados sugerem que aos danos induzidos no DNA pela oxaliplatina apresentam consequências biológicas distintas daquelas induzidas por cisplatina. Embora ambas as drogas sejam capazes de formar os mesmos tipos de lesões no DNA, os adutos no DNA formados pela oxaliplatina tornam-se mais volumosos e hidrofóbicos do que os adutos formados pela cisplatina devido a presença do anel DACH na sua estrutura. Como resultado, os adutos da oxaliplatina tornam-se mais eficientes em inibir a síntese de DNA, sendo geralmente mais citotóxicos (Woynarowski et al., 2000; Todd & Lippard, 2009).

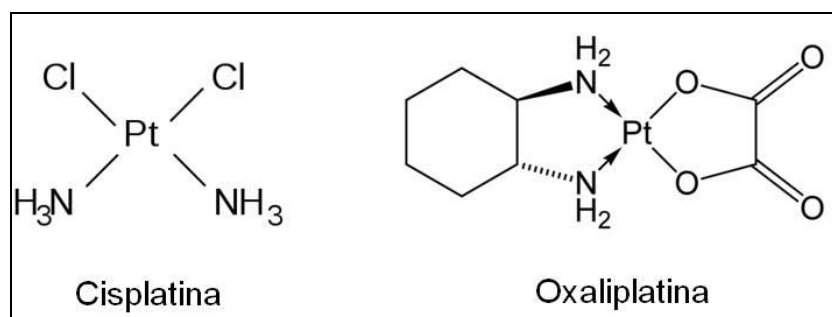


Figura 4. Estruturas moleculares dos agentes alquilantes platinados Cisplatina e Oxaliplatina.

Outra importante diferença entre os mecanismos de ação entre cisplatina e oxaliplatina ocorre no reconhecimento e processamento das lesões causadas por esses agentes. Por exemplo, proteínas da maquinaria do sistema *Mismatch Repair* (MMR) e algumas proteínas de reconhecimento de danos, ligam-se a adutos de cisplatina-GG com maior afinidade do que aos adutos oxaliplatina-GG, o que contribui para as diferenças observadas na citotoxicidade dos dois compostos (Faivre et al., 2003; Zaanani et al., 2013).

Combinações pré-clínicas de estudos *in vitro* e *in vivo* mostram interações aditivas ou sinérgicas de oxaliplatina com 5-fluorouracil (5FU), gemcitabina, irinotecano, paclitaxel, cisplatina ou ciclofosfamida (Misset et al., 2000; Lucas et al., 2011). Notavelmente, o sinérgismo entre 5FU é também mantido em linhagens resistentes a 5FU e cisplatina, sugerindo um papel terapêutico em regimes de tratamento de primeira e segunda linha. Atualmente, a oxaliplatina faz parte dos protocolos de tratamento contra o câncer colorretal, de estômago e de fígado (Kelland, 2007; Cunningham et al., 2010; Ding et al., 2011).

1.5.1. Atividade antitumoral da oxaliplatina contra o câncer colorretal

O câncer colorretal representa de 10 a 15 % de todos os cânceres diagnosticados, sendo considerada a segunda causa de morte por câncer nos países ocidentais (de Gramont et al., 2000; Hagggar et al., 2009). O prognóstico para estes pacientes é pobre, embora a quimioterapia paliativa tenha se mostrado capaz de melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevivência. Além disso, aproximadamente metade dos pacientes desenvolve metástase. Até o momento, nenhum outro agente único tem se mostrado mais eficaz no tratamento do câncer colorretal que o antimetabólito 5FU. Na tentativa de aprimorar o tratamento, estudos combinando leucovorin, um derivado do ácido fólico, com 5FU, mostraram uma moderada resposta, mas sem impactos na sobrevida dos pacientes (Rodel et al., 2012).

Dados experimentais mostraram uma forte atividade sinérgica de oxaliplatina com 5FU em linhagens de câncer colorretal. Além de apresentar um espectro de atividade antitumoral diferente da cisplatina e carboplatina, a oxaliplatina não apresenta toxicidade renal (um dos principais fatores limitantes no tratamento com cisplatina e carboplatina) e a hematotoxicidade induzida é mínima (Alcindor & Beauger, 2011). Outro aspecto importante é que a toxicidade da oxaliplatina é considerada aguda e reversível, sendo caracterizada por disestesia relacionada ao frio e uma neuropatia sensorial periférica dose-limitante que geralmente regride rapidamente com a interrupção do tratamento (Alcindor & Beauger, 2011).

O uso da oxaliplatina como agente único demonstrou uma modesta atividade em pacientes com câncer colorretal metastático, produzindo uma taxa de resposta de 10 a 24 %. No entanto, devida a atividade sinérgica da oxaliplatina com 5FU, a combinação dos dois agentes mostrou uma taxa de resposta que variou de 20 a mais de 50 % (Comella et al., 2009). Por esse motivo a oxaliplatina foi introduzida em todas as fases de tratamento do câncer colorretal desde 2003.

Assim como qualquer regime quimioterápico, a resistência adquirida durante o tratamento torna-se um sério problema na clínica oncológica. A resistência pode ser devida ao decréscimo no acúmulo do medicamento ou ao aumento do efluxo deste, ambos dos quais levam a um decréscimo nas concentrações intracelulares do fármaco (Liu, 2009). A inativação da oxaliplatina por moléculas citoplasmáticas ou nucleares contendo grupos sulfidril também contribui para a resistência ao tratamento, levando a uma diminuição da disponibilidade da droga e diminuindo a capacidade de formar lesões no DNA (Mishima et al., 2002; Liu, 2009). Células resistentes ainda podem demonstrar o aumento da capacidade de reparar os danos induzidos pela oxaliplatina no DNA. Neste caso, a via de reparação de DNA por excisão de nucleotídeos (NER) desempenha um papel importante. O sistema NER é composto de um complexo multienzimático que age no reconhecimento, incisão, excisão, síntese de reparo e ligação das fitas de DNA. A enzima ERCC1 (*excision repair cross complementing group 1*), juntamente com XPF (Xeroderma Pigmentoso grupo F), forma um heterodímero ativo na via NER, clivando a fita de DNA na porção 5' no local do dano. Tem sido demonstrado que altos níveis de expressão da enzima ERCC1 correlacionam inversamente com a sensibilidade à oxaliplatina em pacientes com câncer colorretal avançado, fazendo com que elevados níveis desta proteína estejam relacionados à diminuição da sobrevivência desses pacientes (Yin et al., 2011).

Recentemente, a indução de autofagia também tem sido considerada uma forma de resistência ao tratamento por agentes anti-câncer. Estudos relatando o papel da autofagia na terapia anti-câncer conduzida com oxaliplatina ainda são

escassos, especialmente em câncer colorretal. Em câncer gástrico, a oxaliplatina induz autofagia pela inibição da via PI3K/Akt/mTOR retardando a morte celular por apoptose (Xu et al., 2011). Além disso, dois recentes trabalhos demonstram que a indução de autofagia por oxaliplatina também contribui para a resistência em hepatocarcinoma (Ding et al., 2012; Du et al., 2012). Por outro lado, Altmeyer et al. (2010) demonstrou que células de hepatocarcinoma tratadas com radiação e oxaliplatina simultaneamente, apresentaram morte celular com aspectos autofágicos, o que sugere que a autofagia também desempenha uma função na morte celular induzida por oxaliplatina.

Em vista do papel ambíguo exercido pela autofagia, e do fato que o câncer colorretal é um dos tipos de câncer mais agressivos e com grande incidência na população, a determinação do papel da autofagia no tratamento com oxaliplatina pode contribuir com o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas no combate a este tipo de câncer. Além disso, o câncer colorretal é um modelo de tumor sólido, onde as células de câncer estão expostas às condições rigorosas do microambiente tumoral. Portanto, a resposta das células tumorais à quimioterapia nessas condições também pode fornecer informações valiosas para o melhoramento da terapia antineoplásica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a contribuição da autofagia induzida pela oxaliplatina na sobrevivência ou morte celular de células de câncer colorretal da linhagem HCT116 expostas a baixa concentração de glicose, uma típica condição de estresse encontrada no microambiente de tumores sólidos.

2.2. Objetivos Específicos

- Discutir, através da elaboração de um artigo de revisão, o papel exercido pela autofagia na quimioterapia de diferentes tipos de cânceres tratados com agentes alquilantes.
- Avaliar a capacidade de formação de colônias de células de câncer colorretal HCT116 cultivadas continuamente em baixa concentração de glicose em comparação com células cultivadas com alta disponibilidade de glicose.
- Avaliar a citotoxicidade da oxaliplatina em células de câncer colorretal HCT116 expostas continuamente a baixa e alta concentração de glicose.
- Avaliar a indução de autofagia em células de câncer colorretal HCT116 tratadas com oxaliplatina em baixa concentração de glicose e condições com alta disponibilidade de glicose.
- Determinar a contribuição da autofagia para a sobrevivência ou morte celular utilizando inibidores e ativadores farmacológicos da via autofágica em células de câncer colorretal HCT116 tratadas com oxaliplatina em baixa e alta disponibilidade de glicose.
- Avaliar a indução de morte celular por apoptose em células de câncer colorretal HCT116 com a via autofágica ativada ou inibida quando tratadas com oxaliplatina em baixa e alta disponibilidade de glicose.
- Verificar se a indução de autofagia por oxaliplatina em baixa concentração de glicose ocorre via inibição da atividade de mTOR e pela ativação da proteína-quinase sensora de energia AMPK.

CAPÍTULO I

DNA ALKYLATION DAMAGE AND AUTOPHAGY INDUCTION

*Manuscrito submetido para publicação na revista Reviews in Mutation
Research*

APRESENTAÇÃO

Neste Capítulo será apresentado o artigo de revisão elaborado sobre os principais agentes alquilantes utilizados na clínica oncológica, bem como seus mecanismos de danos no DNA, e a sua relação com a indução de autofagia em células de câncer. O artigo apresentado a seguir está submetido para publicação na revista *Reviews in Mutation Research*.

O artigo detalha os tipos de lesões induzidas no DNA e a aplicação na clínica oncológica dos **agentes alquilantes clássicos**, os quais compreendem as mostardas nitrogenadas, alquilsulfonados, nitrosoureas e aziridinas, **os agentes alquilantes não-clássicos**, dos quais fazem parte as triazinas, **os agentes alquilantes platinados**, também conhecidos como agentes alquilantes-*like*, e por último, uma breve descrição dos principais **agentes alquilantes derivados de compostos naturais**.

Em seguida, o artigo descreve os mecanismos de reparo de DNA acionados em resposta a cada tipo de lesão gerada pelos agentes alquilantes, além dos de mecanismos de morte e sobrevivência adotados pela célula (apoptose, necrose, autofagia, catástrofe mitótica e senescência) em resposta ao tratamento com os agentes alquilantes.

Por fim, o artigo apresenta uma discussão do papel exercido pela autofagia em diferentes tipos de tumores tratados com agentes alquilantes *in vitro* e *in vivo*.

DNA Alkylation Damage and Autophagy Induction

Diana L. Bordin^a, Michelle Lima^a, Guido Lenz^a, Jenifer Saffi^b, Lisiane B. Meira^c, Daniele G. Soares^{d,e,f}, Annette K. Larsen^{d,e,f}, Alexandre E. Escargueil^{d,e,f,h}, João A.P. Henriques^{a,g,h*}

^a Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Bioquímica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmento Leite 245/201 Anexo II, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, GU2 7XH, Surrey, UK.

^d Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris 75571, France.

^e Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U938, Paris, France.

^f Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

^g Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

^h A.E.E. and J.A.P.H. contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed:

Laboratório de Reparo de DNA em Eucariotos, Avenida Bento Gonçalves 9500,
Prédio 43422/sala 210, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: + 55 51 33087602

Fax: + 55 51 33087309

Email: pegas.henriques@gmail.com

Abstract

Alkylating agents are chemotherapeutic drugs with a long history of clinical application. Since alkylating agents inflict a wide range of DNA damage, cellular response becomes complex. After DNA damage, cells trigger a series of responses that include DNA damage checkpoints and blockade of cell cycle which enables time for DNA repair to occur. More recently, induction of autophagy has been observed in cancer cells after treatment with a number of chemotherapeutic drugs that target the DNA molecule, including alkylating agents. Several studies have demonstrated that induction of autophagy after DNA damage delays apoptotic cell death and therefore leads to chemoresistance, which becomes a limiting factor for the success of chemotherapy. On the other hand, depending on the extent of damage and the cellular context, the induction of autophagy may contribute to the cell death. Given these conflicting results, numerous studies have been conducted to establish the role of autophagy in cancer cells in response to chemotherapy. In this review, we describe the main alkylating agents used in clinical oncology and discuss the role of autophagy induced in response to DNA alkylation damage in cancer cells.

Introduction

Alkylating agents were first used in cancer chemotherapy in the 1940's when nitrogen mustard was used to treat Hodgkin's lymphoma (Hurley, 2002). Since then, alkylating agents have been included in practically all drug regimens used for cancer treatment. From a chemical point of view, alkylating agents act by transferring an alkyl group to a wide variety of biological molecules. They preferentially react with the N^7 - position of guanine in DNA and can directly react with DNA or undergo chemical activation (Hartley et al., 1992). During the last decade, the expression "alkylating agent" has increasingly been used to denote any compound able to bind covalently to DNA, which is particularly prominent in the medical literature. The modified DNA interferes with essential processes in cancer cells such as DNA replication and protein synthesis. Because these agents are also toxic to non-cancer cells, especially highly proliferative cells present in the bone marrow, the digestive system, ovaries and testicles, the design of novel alkylating agents that can more specifically target cancer cells is needed to improve the outcome of cancer patients. Alternatively, it might be possible to obtain more efficient treatment by identification of patients most likely to benefit from the treatment.

The regulation of cell death mechanisms plays an important role in both the pathogenesis of cancer and the response to therapy. In chemotherapy, the destruction of neoplastic cells is achieved not only by apoptosis, but also by necrosis, mitotic catastrophe and autophagy. Autophagy seems to play a dual role in the cellular response to antineoplastic drugs. In some cases, activation of autophagy serves as a pro-death mechanism blocking tumor progression. Alternatively, autophagy may also contribute to tumor growth and survival. In this review, we briefly review the major classes of alkylating agents in clinical use. We then describe the cellular response to this group of agents with emphasis on autophagy.

1. Alkylating Agents

Alkylating agents covalently modify DNA and are often mutagenic and cytotoxic. These agents act by transferring an alkyl, chloroethyl or, in the case of platinum compounds, a platinum group, to DNA in chemical reactions called nucleophilic substitutions. Nitrogen, oxygen and phosphates are common targets for alkylation, although the specificity of the reaction may vary widely for different alkylating agents. The N^7 -atom of guanine is particularly susceptible to alkylation. In addition, other atoms in the purine and pyrimidine bases of DNA, such as the N^1 - or N^3 -atoms of adenine, the N^3 - of cytosine, and the O^6 - of guanine, may be modified. RNA adducts and DNA-protein cross-links can also be formed and contribute to the cytotoxicity of alkylating agents (Michaelson-Richie et al., 2011).

Alkylating drugs used in chemotherapy include agents that alkylate through both S_N1 and S_N2 mechanisms. The S_N1 reaction, a first order nucleophilic substitution, is dependent on the concentration of the alkylating agent while the S_N2 alkylation is a second order reaction where the rate is dependent on both the alkylating agent and the nucleophilic target. The S_N1 -type nucleophilic substitution results in alkylation at both nitrogen and oxygen atoms whereas S_N2 -reaction mainly alkylates nitrogen atoms (Fu et al., 2012).

Alkylating agents are further classified as monofunctional or bifunctional. Monofunctional alkylating agents transfer a single alkyl group to DNA and the major adducts formed are N^7 -alkylguanine (N^7 -alkylG) and O^6 -alkylguanine (O^6 -alkylG). Bifunctional alkylators, on the other hand, can react at two different sites in the DNA resulting in the generation of a cross-link. If the resulting cross-link is between two complementary strands of DNA it is called an interstrand DNA crosslink (ICL) and if it is within the same strand of DNA it is known as an intrastrand DNA crosslink. In addition to the monofunctional and bifunctional classification, alkylating agents can be divided into three categories: classical, nonclassical and platinum compounds (Fig. 1). In addition, some natural compounds are able to form bulky covalent adducts with anticancer activity. A more detailed description of each category is provided in the following.

1.1. Classical Alkylating Agents

Classical alkylating agents include nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosureas and aziridines. These bifunctional alkylating agents have two electrophilic sites and can form intrastrand or interstrand cross-links in DNA (Fig. 2). The formation of ICLs strongly correlates with the cytotoxicity of nitrogen mustards (Osawa et al., 2011). Nitrogen mustards are mainly used for the treatment of lymphoid malignancies. In addition, they are, or have been, part of the drug regimens used in the treatment of breast, lung and some types of brain cancer. Mechlorethamine, a bifunctional nitrogen mustard, was the first antitumor drug introduced into clinical practice over 50 years ago. Since the discovery of its therapeutic potential, several derivatives have been used and developed to fight cancer.

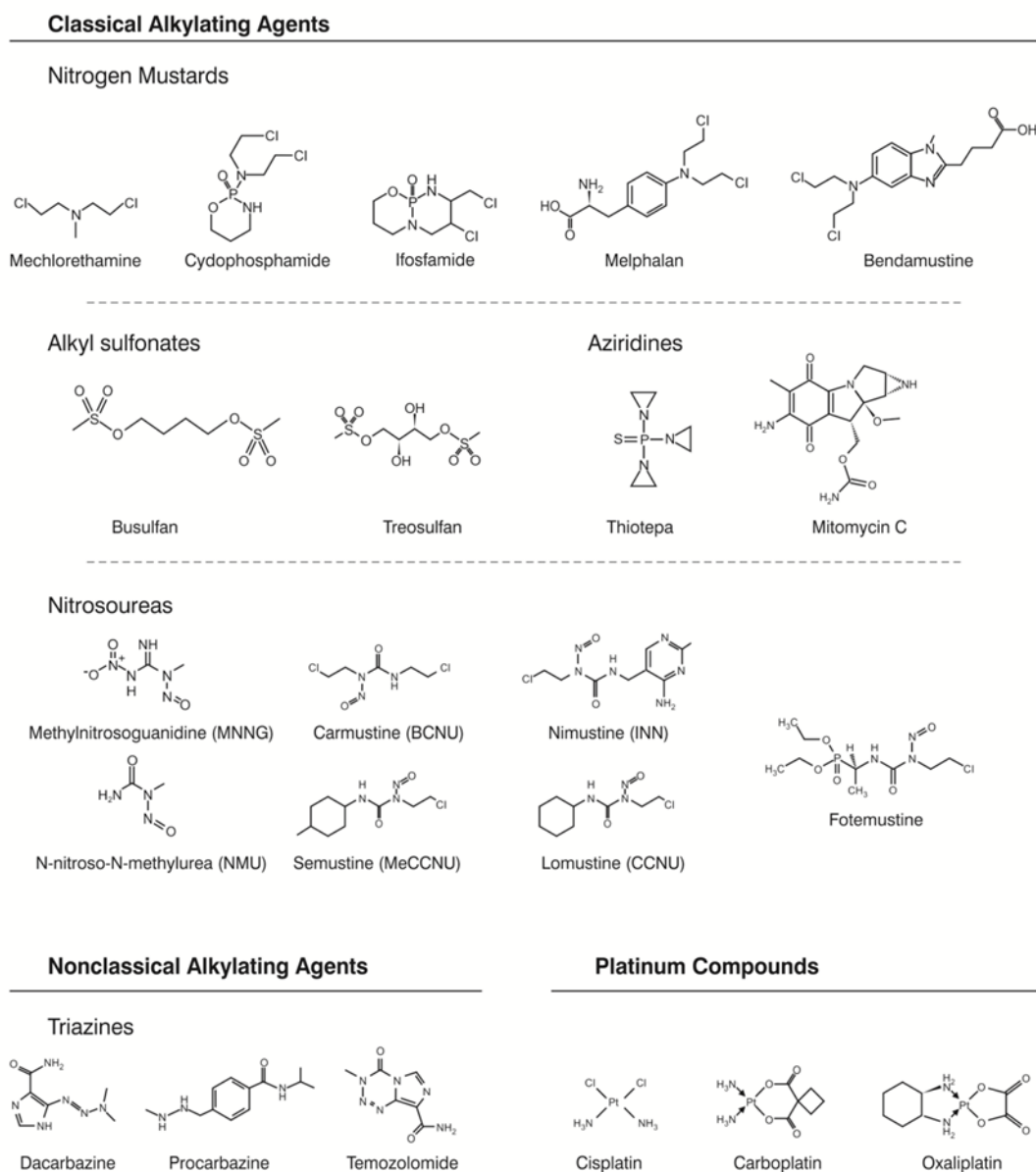


Fig. 1. Chemical structures of the main alkylating agents used in cancer therapy.

Alkyl sulfonates can alkylate the N^7 -atom of guanine and induce various types of DNA damage, including ICLs (Fig. 2). The most representative alkyl sulfonates are busulfan and treosulfan. The chemotherapeutic agents of this class are noted for their immunosuppressive effect on the bone marrow in addition to present their clinical activity for the treatment of solid tumors, such as renal cell

carcinoma (Rigos et al., 1999), malignant melanoma (Atzpodien et al., 2011) and malignant glioma (Wick et al., 2002).

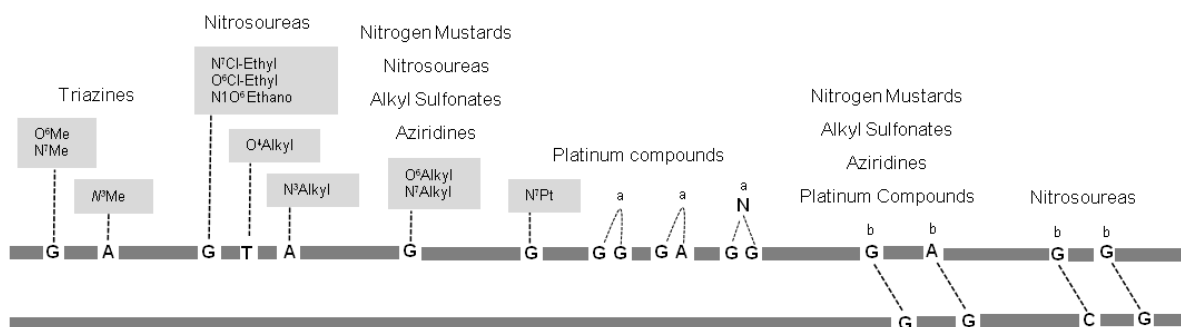


Fig. 2. Major lesions caused in DNA by different classes of alkylating agents. ^a intrastrand cross-links; ^b interstrand cross-links.

Nitrosoureas are choroethyl alkylating agents derived from methylnitrosoguanidine (MNNG) and *N*-nitroso-*N*-methylurea (NMU) compounds that, in general, present good blood-brain barrier permeability and show clinical activity against brain tumors (Carrillo and Munoz, 2012). The nitrosoureas that are used in cancer therapy include nimustine, carmustine, lomustine, semustine and fotemustine. Nitrosoureas inflict a wide variety of DNA lesions (Fig. 2). The predominant alkylation site is the N^7 -atom of guanine, which is followed by the N^3 -atom of adenine, the O^6 -atom of guanine and also, as a minor adduct, the O^4 -atom of thymine (Sedgwick, 2004). The formation and persistence of O^6 alkylG/ O^6 Cl-EthylG adducts are believed to be the principal cause of the cytotoxic effects of this class of agents. Interestingly, even nitrosoureas with only one alkylating group have the ability to form ICLs. Initially, there is a chloroethylation of a guanine on one strand of DNA. This reaction is followed by a slow reaction with the opposite DNA strand to form G-C and G-G cross-links (Bacolod et al., 2004).

Aziridines, also known as ethylenimines, are molecules based on an iminium ring of nitrogen mustards which has a number of alkylating groups projected. Aziridines, such as thiotepa and mitomycin C, are less reactive than nitrogen mustards because the iminium ring is uncharged. The major damages

induced in DNA by aziridines are shown in Fig. 2. The reactivity of aziridines is increased by protonation and occurs at low pH, a condition commonly found in tumors.

1.2. *Nonclassical Alkylating Agents*

Nonclassical alkylating agents used in chemotherapy are represented by triazines, which are monofunctional alkylating agents able to methylate DNA, with O^6 -MeG being the major lesion induced. The best-studied drugs of this family of clinically relevant alkylating agents are dacarbazine, temozolomide and procarbazine. These compounds are pro-drugs that need to be activated enzymatically, or by spontaneous decomposition, to produce alkylating molecules (Marchesi et al., 2007). Temozolomide and procarbazine can cross the blood-brain barrier and have therefore gained importance in the treatment of brain tumors, whereas dacarbazine is used in chemotherapy regimens to treat advanced melanoma (Algazi et al., 2012; Hersh et al., 2011) and Hodgkin's lymphoma (Meyer et al., 2012; Straus, 2011).

1.3. *Platinum Compounds*

Platinum compounds have become one of the most commonly prescribed chemotherapeutic drugs for treatment of human malignancies. Unlike bifunctional alkylating agents, which have the central carbon as pivot DNA binding atom, platinum compounds have a platinum core, which is responsible for DNA-Pt adduct formation. Therefore, platinum compounds are considered as alkylating-like drugs even if they do not have a true alkyl group. Three platinum drugs are currently used in clinical practice: cisplatin, carboplatin and oxaliplatin (Burger et al., 2011). The three molecules share many physiochemical and pharmacological properties, in particular the ability to form DNA adducts. The three molecules share physiochemical and pharmacological properties and react mainly with the N^7 -atom of purine bases to form intrastrand cross-links, between GG bases, AG bases or GNG (Fig. 2). ICLs and monofunctional binding can also be formed

(Blommaert et al., 1995; Chaney et al., 2005; Crul et al., 2002; Jamieson and Lippard, 1999).

1.4. Alkylating Agents Derived from Natural Sources

Alkylating agents derived from natural sources represent an attractive alternative for the treatment of tumors resistant to conventional alkylating drugs. Although there are several compounds in clinical trials, some of them deserve special mention (Fig. 3).

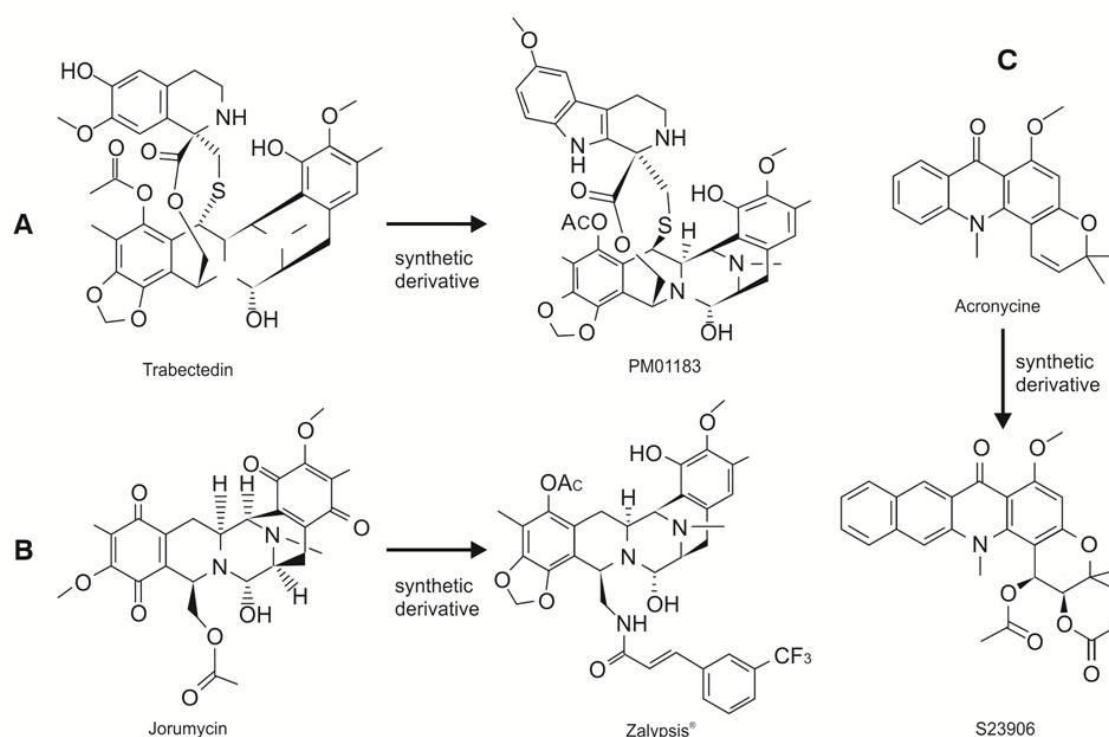


Fig. 3. Chemical structures of alkylating agents derived from natural sources. (A) The ecteinascidin trabectedin and its synthetic derivative lurbinectedin (PM01183). (B) Jorumycin, a natural alkylating agent and its derivative compound Zalypsis®. (C) The novel alkylating agent S23906 is derived from the alkaloid acronycine.

Trabectedin, (ET-743, Yondelis[®]), an alkaloid isolated from the marine tunicate *Ecteinascidia turbinata*, forms nonfunctional adducts with the exocyclic N^2 -atom of guanine in the minor groove of DNA which bends toward the major groove. Trabectedin adducts strongly stabilize the DNA double helix which explains why these monofunctional adducts show certain functional similarities to classical cross-linking agents (Pommier et al., 1996). Since 2007, trabectedin has been approved by the European Commission for treatment of advanced tissue sarcoma and, more recently, to treat patients with relapsed platinum-sensitive ovarian cancer. Structurally similar compounds include lurbinectedin (PM01183) and Zalypsis[®] (PM00104), a jorumucyn derivative. Both compounds are able to form monoadducts with the guanines in the minor groove of DNA, thereby leading to the induction of DNA double-strand breaks (DSBs), attenuation of DNA repair and consequently, apoptosis (D'Incalci et al., 2003; Guirouilh-Barbat et al., 2009; Ocio et al., 2009; Soares et al., 2007; Soares et al., 2011b; Vidal et al., 2012)

S23906 is an anticancer agent derived from acronycine that has shown strong activity against solid tumors. Although the chemical structure of S23906 is quite different from the ecteinascidins, S23906 is also able to bind covalently to the same N^2 -atom of guanine in the minor groove of DNA and to induce DSBs (Leonce et al., 2006). However, in the case of S23906, the initial adduct formation is associated with opening of the DNA helix, rather than in its stabilization (David-Cordonnier et al., 2002; David-Cordonnier et al., 2005).

Undoubtedly, a better mechanistic understanding of these unusual natural compounds presents interesting opportunities to enhance cancer treatment and overcome tumor resistance to conventional chemotherapy.

2. Cellular Responses to Alkylating Agents

In agreement with the diversity of DNA damage caused by alkylating agents, the response to these drugs is quite complex. After DNA damage, cells orchestrate a series of responses that include the triggering of DNA damage checkpoints and cell cycle blockade. This cell cycle arrest enables additional time

for DNA repair. If the DNA repair is not successful or if the DNA damage is too abundant, signaling cascades that lead to cell death will be activated.

2.1. DNA repair

Alkylating agents induce different types of DNA damage. The primary products of monofunctional methylating agents can be efficiently removed by direct base repair (hAlkB, MGMT/AGT), mismatch repair (MMR), base excision repair (BER) and to some extent, nucleotide excision repair (NER) (Drablos et al., 2004). The mutagenic O^6 -alkylG lesion is repaired by the protein O^6 -methylG DNA methyltransferase or MGMT. MGMT repairs this lesion by transferring the alkyl group from the lesion to a cysteine in its active site in a stoichiometric and suicidal reaction (Nakada et al., 2012). However, O^6 -alkylG can pair with T (thymine) during DNA replication. The resulting mismatch is recognized by the MutS α complex (hMSH2 and hMSH6) making MMR important for the repair of such lesions.

MMR recognizes bases that have been paired incorrectly following DNA replication or recombination and replaces the newly-synthesized nucleotide to correct the mispairing. In the absence of O^6 -alkylG repair, O^6 -alkylG:T mispairing cause persistent DNA single- and double-strand breaks as a result of repeated attempts to repair the mismatch (Kondo et al., 2010). MGMT repairs the lesion prior to the formation of the mismatch, and is therefore considered a key mechanism of resistance against methylating agents (Naumann et al., 2009). One MGMT molecule is able to repair only one methylation injury. Thus, the efficiency of repair of O^6 -alkylG from DNA depends on the amount of MGMT present in the cells. Furthermore, MGMT removes O^6 -MeG more efficiently than other alkyl products (Kaina et al., 2007). This means that tumors treated with drugs that induce O^6 -MeG as the major lesion are more likely to suffer chemoresistance. MGMT expression has been shown to be important in the resistance of brain tumors to nitrosoureas (Hegi et al., 2005). Although NER is principally involved in the repair of bulky lesions that perturb the DNA double helix, NER is also capable

of removing O^6 -MeG and O^4 -MeT lesions as a backup role for the other repair mechanisms (Sancar, 1996).

Besides reversal of base damage by the MGMT protein, alkylation DNA damage can be reversed by the action of the human AlkB homologues 2 and 3 (hABH2 and hABH3). Conserved from bacteria to eukaryotic cells, AlkB proteins are members of the non-heme F_{ell}/α-ketoglutarate-dependent superfamily, with eight homologues identified in humans. Despite their differences in specificity, hABH2 and hABH3, both catalyze the direct repair of the cytotoxic lesions N^1 -MeA, N^3 -MeC, N^3 -MeT and N^1 -MeG in DNA by oxidative demethylation (Kaina et al., 2007; Sedgwick, 2004). ABH3 has been shown to be overexpressed in some cancers including prostate and non-small cell lung carcinoma, contributing to alkylation damage resistance (Tasaki et al., 2011).

Finally, a third repair mechanism dealing with alkylation DNA damage is base excision repair or BER. BER is responsible for the repair of bases damaged by oxidation, depurination and alkylation. In terms of alkylated DNA bases, BER removes N^7 -MeG, N^3 -MeA, and N^3 -MeG (Kaina et al., 2007). Initially, lesion-specific DNA glycosylases remove the lesion creating an abasic site. The abasic site is then processed by an AP endonuclease that cleaves 5' to the abasic site generating a 5'dRP moiety and a 3'OH. DNA polymerase β removes the toxic 5'dRP moiety and fills the gap with the correct base. The process is completed when the new DNA strand is sealed by DNA ligase. Imbalance in levels of BER enzymes has detrimental consequences and can alter the cellular responses to alkylating agents (Hofseth et al., 2003; Meira et al., 2009).

The most widely used bifunctional alkylating agents produce intrastrand and interstrand DNA cross-links. Intrastrand cross-links, such as those caused by platinum compounds, are primarily repaired by NER. A covalent cross-link in the same DNA strand can be bypassed by specific post-replication/translesion DNA polymerases, making these injuries less toxic during S-phase (Ho and Scharer, 2010). The role of NER is however not limited to repair of lesions induced by bifunctional alkylating agents. Indeed, NER also plays a pivotal role in bulky adducts recognition induced by monofunctional alkylating agents derived from

natural sources (Escargueil et al., 2008a; Koeppl et al., 2004; Rocca et al., 2010; Soares et al., 2011b; Soares et al., 2005).

The NER pathway can be divided in three essential steps: damage recognition, dual incision, and gap-filling DNA synthesis, restoring an intact undamaged strand. Damage recognition can be coupled to transcription (TC-NER) or happen independently of transcription (global genomic or GG-NER). TC-NER and GG-NER differ only in the initial DNA damage recognition step. The protein complex XPC-hHR23B is responsible for the recruitment of NER components to sites of DNA damage in GG-NER. A stalled RNA polymerase II and the Cockayne syndrome proteins, CSA and CSB, are responsible for performing this function in TC-NER. After the recognition step, the incision at the lesion site is executed by ERCC1-XPF (which requires a physical interaction with XPA) and XPG, respectively, to release a 24–32 nucleotide segment (Tsodikov et al., 2007). The TFIIH complex is then recruited by ERCC1-XPF whereas the XPA-RPA complex recruits other NER components to the repair site. The final steps are DNA resynthesis by polymerases δ or ϵ and ligation of the new strand by DNA ligase I.

The formation of ICLs is the critical step in the cytotoxicity of bifunctional alkylating agents, such as chloroethylnitrosoureas, alkyl sulfonates, nitrogen mustards and platinum compounds. The cytotoxicity of ICLs is pronounced in cells with a high rate of cell division because the cross-link prevents the opening of the DNA strands during replication. A single ICL leads to a stalled replication fork in S-phase. ICLs require complex repair mechanisms and a number of multi-step DNA repair pathways including NER, homologous recombination (HR), Fanconi anemia (FA) proteins and post-replication/translesion polymerases.

In order to repair ICLs or DSBs, HR proteins search for homology in an intact DNA strand to be used as a repair template in order to maintain fidelity. BRCA1 and BRCA2 are two proteins known to be involved in HR and interact with FA proteins. ICL repair can initiate in early or late S-phase and repair failure contributes to sustained G₂-phase arrest and apoptosis induction (Osawa et al., 2011). Besides occurring during the S-phase, ICL repair can also occur in the G₁-

phase involving NER and translesion synthesis polymerases (Deans and West, 2011).

The repair of an ICL in replicating cells involves the formation of DSBs, the most deleterious lesions in DNA (Deans and West, 2011). Detection of DSBs triggers the DNA damage response through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase-like family members, ATM (ataxia telangiectasia mutated) and ATR (ATM and Rad3 related), which in turn activate downstream checkpoint kinases (Chk 1 and Chk 2). Chk1 and Chk2 phosphorylate and stabilize p53, a transcription factor that then translocates to the nucleus and induces the transcription of genes involved in cell cycle arrest, DNA repair and cell death. ATM is activated during all phases of the cell cycle and initiates the repair in response to DSBs, whereas ATR functions at several points of the cell cycle acting preferentially in response to agents blocking DNA replication (Soares et al., 2011a). Nevertheless, ATR also plays a key role in the cellular response to DSBs (Hurley and Bunz, 2007). So, after activation of the DNA damage response machinery, DSBs are repaired via an error-prone nonhomologous end joining (NHEJ) or relatively error-free HR pathways. Finally, in addition to the presence of repair proteins, efficient DNA repair also relies on the local chromatin structure changes associated with histone modifications as recently reviewed (Escargueil et al., 2008b).

Effective DNA repair mechanisms can lead to tumor resistance to genotoxic chemotherapeutic agents. Thus, the ability to modulate DNA repair in cancer cells treated with alkylating agents, as well as other genotoxic drugs, may be an attractive target for successful chemotherapy.

2.2. *Cell death*

Excessive DNA damage often results in the elimination of the damaged cell by a variety of cell death pathways. Here, we focus on the main mechanisms affecting cell death or survival that can be induced by alkylating agents.

Apoptosis is a well-characterized form of programmed cell death which is under strict genetic control. An apoptotic cell displays specific morphological

characteristics such as chromatin condensation, DNA fragmentation, shrunken cytoplasm and cell membrane blebbing. DNA damage can trigger the intrinsic pathway of apoptosis, known as the mitochondria-mediated pathway. In this pathway, a balance between anti- and proapoptotic Bcl-2 family members plays a key role in regulating mitochondrial function and cell death. Antiapoptotic members of this family of proteins include Bcl-2, Bcl-xL, while examples of proapoptotic family members are the proteins Bax and Bak. Bax and Bak exert their proapoptotic activity by facilitating pore opening in the outer membrane of the mitochondria, leading to the release of cytochrome c and caspase activation, which are the proteases that ultimately are responsible for the execution of the cellular elimination process.

In addition to apoptosis, autophagy can also direct cells to death in response to various stress stimuli. There is currently no consensus on whether autophagic death should be considered as a form of programmed cell death or if it only represents dying cells with autophagic features (Shen et al., 2012). Although cell death with autophagic features can occur at the same time as other cell death mechanisms, especially in cases where a massive amount of cells are going to be eliminated, autophagy is particularly associated with defective apoptosis (Buytaert et al., 2006; Dalby et al., 2010). Current data suggest that autophagy can be both cytoprotective and cytotoxic mechanism dependent on the tumor type, the type of chemotherapeutic drug used and the extent of DNA damage.

Necrosis, also called immunogenic cell death, is a type of cell death which is less well defined. During necrotic death, damaged cells swell, lose membrane integrity and spill their cytoplasmic content leading to inflammatory responses. Although necrotic death is most pronounced in cells with defective apoptosis, induction of necrosis may also occur when the apoptotic pathway is activated (Guerriero et al., 2008).

Other mechanisms for the loss of cellular viability play a role in cancer cell death following genotoxic chemotherapy. Mitotic catastrophe is one such mechanism and is a result of aberrant mitosis with the hallmark of improper sister chromatid separation, leading to morphological alterations such as larger cell size,

multinucleation and micronucleation. Extensive DNA damage, abrogation of G2-M checkpoint control and inefficient DNA repair can all result in activation of mitotic catastrophe (Leoni, 2011).

Senescence is a form of irreversible loss of proliferative potential making the cells large, flat and positive for the senescence-associated β -galactosidase marker. Senescence was first attributed to telomere shortening after many replication cycles but it can also be triggered by different types of stress, including DNA damage. Indeed, some studies on the cellular responses to DNA damaging agents, such as temozolomide, BCNU and cyclophosphamide, report a role for senescence in halting the proliferation of tumor cells after chemotherapy (Papait et al., 2009; Schmitt et al., 2002). However, the real relevance of senescence in cancer treatment is still unclear. Although there is no consensus on whether mitotic catastrophe or senescence are independent forms of cell death or simply a stage preceding another death pathway, it is clear that both can modulate cell death and prevent tumor growth.

3. Alkylating Agents and Autophagy

Although three types of autophagic processes are known, namely microautophagy, chaperone-mediated autophagy and macroautophagy, only the latter type will be discussed here and will be referred to as autophagy. However, it is worth noting that the common feature among the three types of autophagy is the delivery of cellular constituents to lysosomes for degradation.

Autophagy is a highly conserved evolutionary process that destroys cellular components in response to stress. Autophagy can be induced in normal and cancer cells as a survival mechanism or can contribute to the induction of cell death. Stimuli such as hypoxia, infections caused by viruses and bacteria, oxidative stress, starvation and DNA damage are responsible for triggering autophagy. Both autophagy and the proteasome system are able to degrade proteins, but only autophagy is capable of degrading entire organelles. For this reason, when compared to the proteasome system, autophagy is normally considered a less selective process of degrading both biomolecules and more

complex cellular components. However, some organelles such as mitochondria, endoplasmic reticulum (ER) and peroxisome can be selectively degraded in processes called mitophagy, reticulophagy and peroxyphagy, respectively (Alers et al., 2012a).

The molecular machinery involved in the control of autophagy is modulated by different signaling pathways. The major regulator of autophagy is the mammalian target of rapamycin complex I (mTORC1), which is regulated by the class I phosphoinositide 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway. PI3K/Akt responds to nutrient availability in the environment through growth factors activating mTORC1 thereby controlling cell growth and autophagy. AMPK, another protein kinase involved in the regulation of autophagy, acts by sensing the decrease in the ratio of intracellular ATP/AMP and is a positive regulator of autophagy (Li et al., 2012).

In response to genotoxic stress, autophagy can be induced through the signaling pathways summarized in Figure 4. These pathways link the DNA damage response involving ATM, Chk1/2 and p53 to the autophagy-regulating machinery, mainly AMPK and mTORC1. p53 can either activate AMPK, which inhibits mTORC1 thereby inducing autophagy, or induce the expression of the damage-regulated autophagy modulator (DRAM), a lysosomal protein facilitating the autophagic process. Interestingly, p53, one of the most important tumor suppressor genes, has been described as both a positive and a negative regulator of autophagy depending on its subcellular localization. In contrast to nuclear p53, cytoplasmic p53 prevents autophagy in a poorly characterized manner (Maiuri et al., 2010).

Autophagy starts with the nucleation of membranes that are expanded in an elongation step to form double-membrane vesicles called autophagosomes, a morphological hallmark of autophagy. These structures envelop the cellular material to be degraded and fuse it with lysosomes forming the autolysosomes. Once in contact with lysosomal hydrolases, proteins and organelles contained in autolysosomes are degraded and free amino acids are released. The formation and expansion of the autophagosomes are mediated by autophagy-specific genes (Atg), and their products have been described as markers for autophagy. Beclin-1

and LC3 (the mammalian orthologs of the yeast genes Atg 6 and Atg 8, respectively) are the most widely autophagic proteins studied. Beclin 1 is one of the first proteins to be recruited to the formation of autophagosomes whereas LC3 is integrated in the membrane of autophagosomes during the elongation step.

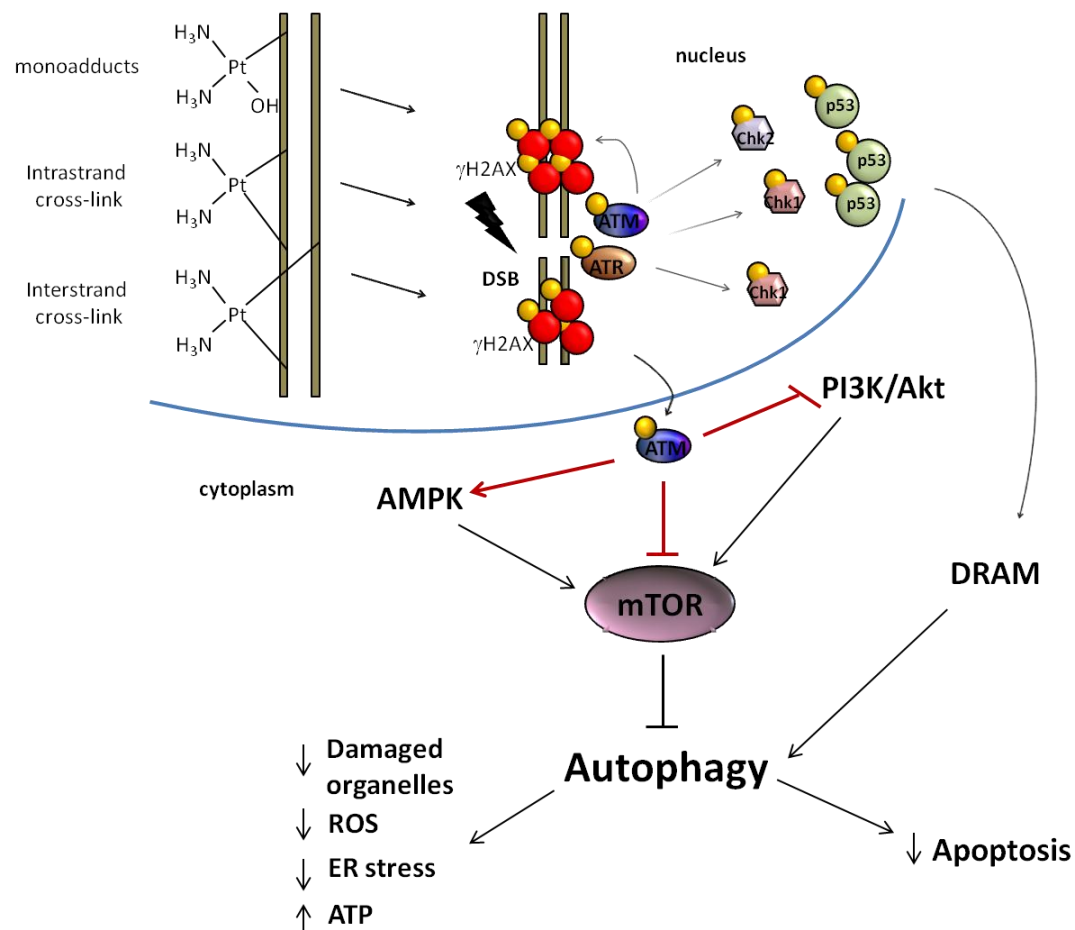


Fig. 4. DNA alkylating damage and autophagy induction. Different DNA damage caused by alkylating agents (here represented by cisplatin adducts) induce double-strand breaks (DSBs) in DNA. In response to DSB, ATM and ATR kinases are phosphorylated. Rapidly, H2AX is phosphorylated by PI3K-like kinases, including ATM and ATR, to form γ H2AX. The activated ATM and ATR downstream targets include the checkpoint kinases Chk1 and Chk2 which in turn phosphorylate and stabilize p53. ATM, in addition to its central role in the nucleus, is able to activate AMPK and repress PI3K/Akt and mTOR to stimulate autophagy in cytoplasm. p53 can also activate/repress key regulatory components of the

autophagic pathway by inducing the expression of DRAM thereby activating AMPK and/or inhibiting mTOR.

Chemotherapeutic drugs that target the DNA molecule frequently initiate autophagy in cancer cells. Although autophagy has a beneficial effect as a tumor suppressor in healthy cells, induction of autophagy may promote survival of tumor cells leading to resistance to cell death. On the other hand, depending on the extent of damage and the cellular context, autophagy may also be the mediator of a non-apoptotic form of cell death called autophagic cell death. Several studies attempting to elucidate the role of autophagy in cancer cells treated with DNA damaging agents are shown in Table 1. Most of the results obtained with alkylating agents in different cancer cell lines indicate that autophagy plays a cytoprotective role by delaying and/or reducing cell death.

Table 1. Alkylating agents and autophagy in different *in vivo* and *in vitro* models.

Class of Alkylating agent	Alkylating agent	Mechanism of DNA damage	Tumor type/Cell line	Autophagy inhibitor	Role of autophagy	Reference
Nitrogen mustard	Cyclophosphamide	interstrand crosslink	mouse Myc-induced xenograft model of lymphoma	CQ ^a	cytoprotective	(Amaravadi et al., 2007)
			multiple myeloma cells	3MA ^b /HCQ °siRNA Atg5/siRNA Beclin-1	cytoprotective	(Pan et al., 2011)
	N-mustard BO-1051	interstrand crosslink	hepatocellular carcinoma cells	E64d/pepstatin A/BafA1 ^d /shRNA	cytoprotective	(Chen et al., 2011a)

				Beclin-1/siRNA p62/SQSTM1		
	N-mustard BO-1051	interstrand crosslink	malignat glioma cells	3MA/BafA1/shRN A Beclin 1	cytoprotective	(Chu et al., 2012)
Nitrosourea	MNNG	monoadducts and interstrand crosslink	mouse Myc- induced model of lymphoma cells	CQ	cytoprotective	(Amaravadi et al., 2007)
Platinum compound	Cisplatin	intrastrand and interstrand crosslink	hepatocellular carcinoma cells	3MA/siRNA Atg5	cytoprotective	(Chen et al., 2011b)
			hepatocellular carcinoma cells	3MA/CQ/siRNA Beclin-1	cytoprotective	(Guo et al., 2012)
			cervical cancer cells	3MA/CQ	cytoprotective	(Xu et al., 2012)
			colorectal cancer, breast adenocarcinoma and cervical carcinoma cells	CQ/andrographoli de	cytoprotective	(Zhou et al., 2012)
			esophageal cancer cells	3MA	cytoprotective	(Liu et al., 2011)
			skin carcinoma	3MA/siRNA Atg5	cytoprotective	(Claerhout et al.,

			cells			2010)
			lung adenocarcinoma cells	3MA	cytoprotective	(Ren et al., 2010)
			malignant glioma cells	BafA1/CQ/wortma nnin	cytoprotective	(Harhaji- Trajkovic et al., 2009)
Platinum compound	E-platinum	intrastrand and interstrand crosslink	gastric carcinoma cells	3MA/CQ	cytotoxic	(Hu et al., 2012)
Platinum compound	Oxaliplatin	intrastrand and interstrand crosslink	hepatocellular carcinoma cells	CQ/siRNA Atg7	cytoprotective	(Du et al., 2012)
			hepatocellular carcinoma cells	CQ/siRNA Atg5	cytoprotective	(Ding et al., 2011)
			gastric cancer cells	CQ	cytoprotective	(Xu et al., 2011)
Triazine	Temozolomide	monoadducts	malignant glioma cells and xenograft model	3MA/BafA1/CQ/re sveratrol	cytoprotective	(Lin et al., 2012)
			apoptosis- resistant malignant	siRNA Beclin- 1/siRNA Atg5	cytotoxic	(Voss et al., 2010)

glioma cells			
malignant glioma cells	3MA/siRNA Beclin-1	cytoprotective	(Katayama et al., 2007)
malignant glioma cells	Baf A1/3MA	cytoprotective	(Kanzawa et al., 2004)
resistant malignant glioma cells	3MA	cytotoxic	(Kanzawa et al., 2003)

^a Chloroquine (CQ); ^b 3-Methyladenine (3MA); ^c Hydrochloroquine (HCQ); ^d Bafilomycin A1 (BafA1).

To determine the physiological relevance of autophagy, a variety of autophagy inhibitors have been employed in combination with alkylating treatments, since inhibition of autophagy at different steps of the pathway may produce different cellular responses (Kanzawa et al., 2004). Besides the knockdown/knockout of autophagic genes (Atg 5, Atg 7 and Beclin 1, for example), several pharmacological inhibitors have been employed to investigate autophagy. The most commonly used are 3-methyladenine (3MA), wortmannin and LY294002 which block autophagy at an early stage by inhibiting the class I PI3K and interfering with the formation of autophagosomes. Chloroquine (CQ), an antimalarial drug, is capable of inhibiting the lysosomal function resulting in accumulation of autophagosomes. Similar to CQ, pepstatin A and E64d are also inhibitors of lysosomal proteases whereas Bafilomycin A1 (BafA1) is a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase. It should be emphasized that blockage of autophagy at the lysosomal stage leads to accumulation of autophagosomes, whereas blockage at the early steps reduces autophagosomes in the cell.

To address the role of autophagy in a *Myc*-induced model of lymphoma, the nitrosourea MNNG was combined with CQ. The co-treatment significantly enhanced cell death, when compared with MNNG treatment alone, showing that autophagy served as a survival mechanism in response to DNA damage (Amaravadi et al., 2007). Results for multiple myeloma treated with low doses of melphalan and hepatocarcinoma treated with BO-1051, a newly synthesized nitrogen mustard with high DNA affinity, also indicated that autophagy inhibition potentiates the effects of DNA alkylating therapy by increasing the fraction of apoptotic cells (Chen et al., 2011a; Pan et al., 2011).

Chen et al. (Chen et al., 2011a) demonstrated that autophagy induced by BO-1051 is a downstream target of the ATM signaling pathway. Alkylating agents, such as nitrogen mustards, generate DSBs during DNA repair recruiting DNA damage activated kinases. Faced with these lesions, ATM, together with ATR and their signal-transducer molecules Chk1/2 are engaged to arrest the cell cycle. Moreover, a cytoplasmic role of ATM has been described, showing that ATM activation suppresses mTORC1 via LKB1/AMPK metabolic pathway, which in turn induces autophagy (Alexander et al., 2010). This cytoplasmic pathway linking DNA damage response and autophagy, and more precisely ATM and autophagy, may have important therapeutic implications in cancer. However, the connection seems to be much more complex considering the variety of proteins and steps involved in each signaling pathway. In this case, the kinase ATM, as well as the transducers in the DNA damage signaling, Chk1 and Chk2, may be involved in autophagy induction in cancer cells treated with chemotherapeutic agents.

Platinum derived compounds primarily induce the formation of DNA intrastrand crosslinks, but can also induce the formation of ICLs. As listed in Table 1, cells treated by platinum compounds can induce autophagy as a way to prevent cell death. Due to their clinical importance, many studies using different cell types have been carried out to elucidate the role of autophagy in response to platinum agents. As an example, autophagy has been shown to play a role in the resistance of cancer cells to cisplatin, the first platinum drug ever used in cancer treatment. Different studies have shown increased expression of LC3II and Beclin 1 and an increase in the number of autophagosomes after cisplatin exposure (Liu et al.,

2011). Cisplatin triggers autophagy by activation of AMPK and downregulation of mTOR, thereby protecting glioma cells from oxidative stress, caspase activation and DNA fragmentation (Harhaji-Trajkovic et al., 2009). In HCT116 colon cancer cells, cisplatin combined with CQ inhibits the prosurvival function of autophagy by increasing PARP and caspase 3 cleavage (Zhou et al., 2012). Furthermore, it has been shown that cisplatin can induce the accumulation of misfolded proteins leading to ER stress that can cause cell death mainly by apoptosis. However, Xu et al. (Xu et al., 2012) demonstrated that while treatment with cisplatin induces ER stress, cisplatin also activates autophagy, which is implicated in reducing the ubiquitinated proteins thereby preventing apoptosis induced by ER stress in HeLa cells.

Oxaliplatin is reported to induce autophagy in certain tumor cell lines. Hepatocellular carcinoma and gastric cancer cells treated with oxaliplatin show conversion of the LC3 cytoplasmic form (LC3I) to the autophagosome-integrated form (LC3II) indicating the induction of autophagy (Du et al., 2012) (Ding et al., 2011). As well as cisplatin, oxaliplatin seems to induce autophagy as a protective mechanism. Although less is known about the role of autophagy in the cytotoxicity exerted by oxaliplatin, the mechanism of autophagy induction seems to be very similar to the one induced by cisplatin. Oxaliplatin prevents phosphorylation of Akt and mTOR and may induce autophagy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway (Xu et al., 2011). Autophagy inhibition induced by oxaliplatin with CQ or 3MA enhances the production of reactive oxygen species (ROS), which contributes to death of hepatocarcinoma cells (Ding et al., 2011).

In clinical treatment protocols, different regimens are usually combined in order to prevent drug resistance and to achieve better survival outcomes. Combining high-LET radiation with oxaliplatin to treat glioma cells, Benzina et al. (Benzina et al., 2008) found an increase in the number of DSBs in DNA (if compared to each single treatment), as detected by increased phosphorylation of the H2AX histone (γ H2AX), a marker of DSB formation. The increase in DNA damage correlated with the induction of autophagy, and only very low levels of apoptosis were observed. More recently, Altemeyer et al. (Altemeyer et al., 2010) used hepatocellular carcinoma cells treated with oxaliplatin and high-LET

radiation. The authors and showed a positive correlation between DSB formation and autophagy activation when DNA repair was blocked by concomitant administration of an inhibitor for PARP, a protein essential for efficient single-strand break repair. Combining oxaliplatin with high-LET radiation markedly increased autophagy and reduced cell growth.

A study with E-platinum, a newly synthesized platinum drug with a structure similar to oxaliplatin, showed that autophagy induction in gastric cancer *in vitro* and *in vivo* plays an important role in the inhibition of cell growth (Hu et al., 2012). The mechanism that leads to induction of autophagy by E-platinum is not well understood, but inhibition of mTOR seems to be the key event to trigger the autophagic pathway. In addition, E-platinum suppressed the phosphorylation of Akt, ERK1/2 and p38MAPK in a time-dependent manner.

More recently, the alkylating agent temozolomide was shown to induce autophagy in malignant glioma cells (Aoki et al., 2008; Kanzawa et al., 2004). Different studies have demonstrated a protective role of autophagy in cells treated with temozolomide (Katayama et al., 2007). The autophagy induced in response to treatment with temozolomide degrades cellular biomolecules and provides metabolic substrates to the mitochondria. This result in increasing of intracellular ATP levels, which protects cells from death characterized by multimicronucleation (Katayama et al., 2007). Temozolomide mediated-autophagy seems to happen through an increase of ROS levels and ERK activation. Inhibiting ROS production with resveratrol is synergistic with temozolomide most likely by reducing the autophagic flux and increasing apoptotic cell death (Lin et al., 2012).

Exceptions for this pattern of cytoprotection have been seen in treatments where autophagy served as a mechanism of cell death as represented in the Figure 5. Apoptosis-resistant glioma cells treated with temozolomide and (-)-gossypol, a pan-Bcl2 inhibitor, showed a significant increase in cell death compared to cells that received only temozolomide. Cell death was characterized as caspase-independent and showing increased autophagosome formation which led the authors to conclude that the cells underwent autophagic cell death (Voss et al., 2010). In order to control autophagy, the anti-apoptotic Bcl-2 and Bcl-x_L

proteins sequester Beclin 1 preventing the assembly of proteins involved in vesicle nucleation that initiate the autophagosome formation (Maiuri et al., 2007). Therefore, using a pan-Bcl2 inhibitor, Beclin 1 is released and can initiate the autophagosome formation which can explain the high number of autophagosomes and consequently cell death.

MGMT is the enzyme responsible to repair monoadducts induced by temozolomide in DNA, which is the major cause of resistance in the treatments of gliomas. The autophagic cell death was potentiated when MGMT negative cells received temozolomide and (-)-gossypol, indicating that DNA repair inhibition can be an important aspect that contributes to autophagic cell death (Voss et al., 2010). Inhibiting DNA repair with O^6 -Benzylguanine, a MGMT inhibitor, Kanzawa et al. (Kanzawa et al., 2003) demonstrated that resistant glioma cells treated with temozolomide underwent autophagic cell death. Although the studies with temozolomide seem conflicting, it is worthwhile to emphasize that autophagy seems to serve as a cell death mechanism only in cases where DNA repair and apoptosis are inhibited or defective.

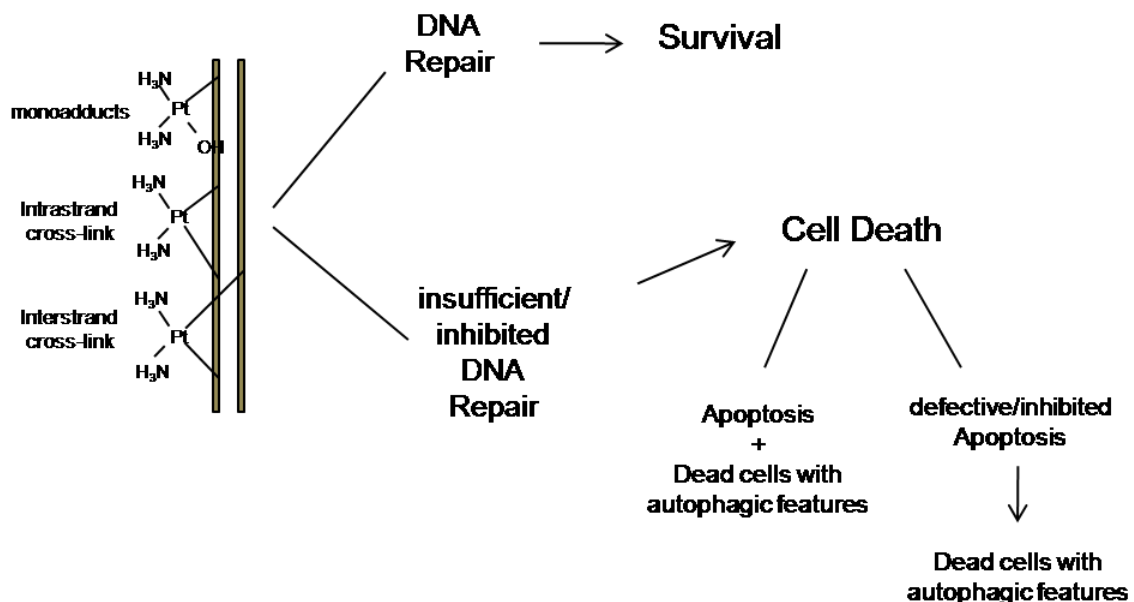


Fig. 5. DNA alkylating damage (here represented by cisplatin adducts) leads to cell death with autophagic features in cases of insufficient/inhibited DNA repair and defective/inhibited apoptosis.

4. Concluding Remarks

Alkylating agents is a major class of cancer chemotherapeutic drugs. Since their initial use in clinical oncology, many new compounds with higher specificity and lower toxicity have been discovered and are currently used to treat a wide variety of tumors. Due to their crucial importance in cancer chemotherapy, there is great interest in investigating the mechanisms of cellular response to alkylation employed by cancer cells.

Alkylating agents react with DNA and other macromolecules, producing a broad range of cellular damage. The cellular responses to alkylation are, therefore, complex and can result in the activation of cell cycle arrest, survival signaling and DNA repair, or of cell death pathways, depending on the context and amount of cellular damage. Recently, autophagy has been described as an important factor in the response to DNA damage. Whether this response contributes or not to the survival of cancer cells is still a matter of debate.

Induction of autophagy in cancer cells during chemotherapy has been reported to prolong survival by delaying apoptosis and leading to chemoresistance. Treatment with alkylating agents seems, in general, to induce autophagy to support cell survival during genotoxic stress by maintaining sufficiently high intracellular ATP levels to allow DNA repair, by reducing ubiquitinated proteins and subsequent ER stress, and by clearing damaged organelles. Selective autophagy of damaged organelles, like mitochondria, may prevent the production of ROS and the release of cytochrome c, a potent apoptotic trigger. However, in association with DNA repair inhibition and defective apoptosis, autophagy is associated with cell death. In these cases, the use of autophagy inducers combined with DNA repair inhibitors and chemotherapeutic agents might provide a new and attractive approach in cancer treatment. Some studies suggest a link between the DNA damage response DDR and autophagy, demonstrating that DNA lesions, such as intrastrand and interstrand DNA cross-links, induce autophagy. Although this connection is not fully elucidated, the investigation of new chemotherapeutic regimens that can simultaneously modulate DNA damage

signaling and recruitment of repair machinery, as well as the induction of autophagy, provides a new and exciting avenue for cancer research and treatment.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CAPES/COFECUB [French-Brazilian collaborative research grant n° 583/07] and PRONEX/FAPERGS/CNPq (n° 10/0044-3). P.M. is a Mona Nasrallah scholar. D.G.S. was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Villejuif, France. D.L.B was supported by CNPq, Brazil.

References

- [1] Hurley, L. H., DNA and its associated processes as targets for cancer therapy, *Nature reviews. Cancer*, 2 (2002) 188-200.
- [2] Hartley, J. A., J. P. Bingham and R. L. Souhami, DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by nitrogen mustards is preserved in intact cells, *Nucleic acids research*, 20 (1992) 3175-3178.
- [3] Michaelson-Richie, E. D., X. Ming, S. G. Codreanu, R. L. Loeber, D. C. Liebler, C. Campbell and N. Y. Tretyakova, Mechlorethamine-induced DNA-protein cross-linking in human fibrosarcoma (HT1080) cells, *Journal of proteome research*, 10 (2011) 2785-2796.
- [4] Fu, D., J. A. Calvo and L. D. Samson, Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents, *Nature reviews. Cancer*, 12 (2012) 104-120.
- [5] Osawa, T., D. Davies and J. A. Hartley, Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells, *Cell death & disease*, 2 (2011) e187.

- [6] Rigos, D., H. W. Wechsel and K. H. Bichler, Treosulfan in the treatment of metastatic renal cell carcinoma, *Anticancer research*, 19 (1999) 1549-1552.
- [7] Atzpodien, J., K. Terfloth, M. Fluck and M. Reitz, Age has no significant impact on overall survival and on treatment tolerability in relapsed stage IV cutaneous malignant melanoma patients receiving Cisplatin, Gemcitabine, and Treosulfan, *American journal of clinical oncology*, 34 (2011) 2-5.
- [8] Wick, W., J. Stock, J. Seyfried, J. Baumgart, U. Wullner and M. Weller, CD95/CD95 ligand-independent potentiation of treosulfan cytotoxicity by BSO in malignant glioma cells in vitro and in vivo, *International journal of oncology*, 21 (2002) 213-220.
- [9] Carrillo, J. A. and C. A. Munoz, Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan, *Neurosurgery clinics of North America*, 23 (2012) 297-306, ix.
- [10] Sedgwick, B., Repairing DNA-methylation damage, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5 (2004) 148-157.
- [11] Bacolod, M. D., S. P. Johnson, A. E. Pegg, M. E. Dolan, R. C. Moschel, N. S. Bullock, Q. Fang, O. M. Colvin, P. Modrich, D. D. Bigner and H. S. Friedman, Brain tumor cell lines resistant to O6-benzylguanine/1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea chemotherapy have O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mutations, *Molecular cancer therapeutics*, 3 (2004) 1127-1135.
- [12] Marchesi, F., M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino and L. De Vecchis, Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 56 (2007) 275-287.
- [13] Algazi, A. P., J. S. Weber, S. C. Andrews, P. Urbas, P. N. Munster, R. C. DeConti, J. Hwang, V. K. Sondak, J. L. Messina, T. McCalmont and A. I. Daud, Phase I clinical trial of the Src inhibitor dasatinib with dacarbazine in metastatic melanoma, *British journal of cancer*, 106 (2012) 85-91.
- [14] Hersh, E. M., S. J. O'Day, J. Powderly, K. D. Khan, A. C. Pavlick, L. D. Cranmer, W. E. Samlowski, G. M. Nichol, M. J. Yellin and J. S. Weber, A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naive patients with advanced melanoma, *Investigational new drugs*, 29 (2011) 489-498.
- [15] Meyer, R. M., M. K. Gospodarowicz, J. M. Connors, R. G. Pearcey, W. A. Wells, J. N. Winter, S. J. Horning, A. R. Dar, C. Shustik, D. A. Stewart, M. Crump, M. S. Djurfeldt, B. E. Chen, L. E. Shepherd, N. C. T. Group and G. Eastern Cooperative Oncology, ABVD alone versus radiation-based therapy in limited-stage Hodgkin's lymphoma, *The New England journal of medicine*, 366 (2012) 399-408.
- [16] Straus, D. J., Chemotherapy only for localized Hodgkin lymphoma, *Journal of internal medicine*, 270 (2011) 197-205.

- [17] Burger, H., W. J. Loos, K. Eechoute, J. Verweij, R. H. Mathijssen and E. A. Wiemer, Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance, *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 14 (2011) 22-34.
- [18] Blommaert, F. A., H. C. van Dijk-Knijnenburg, F. J. Dijt, L. den Engelse, R. A. Baan, F. Berends and A. M. Fichtinger-Schepman, Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells, *Biochemistry*, 34 (1995) 8474-8480.
- [19] Jamieson, E. R. and S. J. Lippard, Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chemical reviews*, 99 (1999) 2467-2498.
- [20] Chaney, S. G., S. L. Campbell, E. Bassett and Y. Wu, Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts, *Critical reviews in oncology/hematology*, 53 (2005) 3-11.
- [21] Crul, M., R. C. van Waardenburg, J. H. Beijnen and J. H. Schellens, DNA-based drug interactions of cisplatin, *Cancer treatment reviews*, 28 (2002) 291-303.
- [22] Pommier, Y., G. Kohlhagen, C. Bailly, M. Waring, A. Mazumder and K. W. Kohn, DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*, *Biochemistry*, 35 (1996) 13303-13309.
- [23] Vidal, A., C. Munoz, M. J. Guillen, J. Moreto, S. Puertas, M. Martinez-Iniesta, A. Figueras, L. Padulles, F. J. Garcia-Rodriguez, M. Berdiel-Acer, M. A. Pujana, R. Salazar, M. Gil-Martin, L. Marti, J. Ponce, D. G. Mollevi, G. Capella, E. Condom, F. Vinals, D. Huertas, C. Cuevas, M. Esteller, P. Aviles and A. Villanueva, Lurbinectedin (PM01183), a New DNA Minor Groove Binder, Inhibits Growth of Orthotopic Primary Graft of Cisplatin-Resistant Epithelial Ovarian Cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18 (2012) 5399-5411.
- [24] D'Incalci, M., T. Colombo, P. Ubezio, I. Nicoletti, R. Giavazzi, E. Erba, L. Ferrarese, D. Meco, R. Riccardi, C. Sessa, E. Cavallini, J. Jimeno and G. T. Faircloth, The combination of yondelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts, *European journal of cancer*, 39 (2003) 1920-1926.
- [25] Ocio, E. M., P. Maiso, X. Chen, M. Garayoa, S. Alvarez-Fernandez, L. San-Segundo, D. Vilanova, L. Lopez-Corral, J. C. Montero, T. Hernandez-Iglesias, E. de Alava, C. Galmarini, P. Aviles, C. Cuevas, J. F. San-Miguel and A. Pandiella, Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double-strand breaks, *Blood*, 113 (2009) 3781-3791.
- [26] Guirouilh-Barbat, J., S. Antony and Y. Pommier, Zalypsis (PM00104) is a potent inducer of gamma-H2AX foci and reveals the importance of the C ring of trabectedin for transcription-coupled repair inhibition, *Molecular cancer therapeutics*, 8 (2009) 2007-2014.

- [27] Soares, D. G., M. S. Machado, C. J. Rocca, V. Poindessous, D. Ouaret, A. Sarasin, C. M. Galmarini, J. A. Henriques, A. E. Escargueil and A. K. Larsen, Trabectedin and its C subunit modified analogue PM01183 attenuate nucleotide excision repair and show activity toward platinum-resistant cells, *Molecular cancer therapeutics*, 10 (2011) 1481-1489.
- [28] Soares, D. G., A. E. Escargueil, V. Poindessous, A. Sarasin, A. de Gramont, D. Bonatto, J. A. Henriques and A. K. Larsen, Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (2007) 13062-13067.
- [29] Leonce, S., L. Kraus-Berthier, R. M. Golsteyn, M. H. David-Cordonnier, C. Tardy, A. Lansiaux, V. Poindessous, A. K. Larsen and A. Pierre, Generation of replication-dependent double-strand breaks by the novel N2-G-alkylator S23906-1, *Cancer research*, 66 (2006) 7203-7210.
- [30] David-Cordonnier, M. H., W. Laine, A. Lansiaux, M. Kouach, G. Briand, A. Pierre, J. A. Hickman and C. Bailly, Alkylation of guanine in DNA by S23906-1, a novel potent antitumor compound derived from the plant alkaloid acronycine, *Biochemistry*, 41 (2002) 9911-9920.
- [31] David-Cordonnier, M. H., W. Laine, A. Lansiaux, F. Rosu, P. Colson, E. de Pauw, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, J. A. Hickman, A. Pierre and C. Bailly, Covalent binding of antitumor benzoacronycines to double-stranded DNA induces helix opening and the formation of single-stranded DNA: unique consequences of a novel DNA-bonding mechanism, *Molecular cancer therapeutics*, 4 (2005) 71-80.
- [32] Drablos, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbo, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Pena-Diaz, M. Otterlei, G. Slupphaug and H. E. Krokan, Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance, *DNA repair*, 3 (2004) 1389-1407.
- [33] Nakada, M., T. Furuta, Y. Hayashi, T. Minamoto and J. Hamada, The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma, *Frontiers in oncology*, 2 (2012) 98.
- [34] Kondo, N., A. Takahashi, K. Ono and T. Ohnishi, DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways, *Journal of nucleic acids*, 2010 (2010) 543531.
- [35] Naumann, S. C., W. P. Roos, E. Jost, C. Belohlavek, V. Lennerz, C. W. Schmidt, M. Christmann and B. Kaina, Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53, *British journal of cancer*, 100 (2009) 322-333.
- [36] Kaina, B., M. Christmann, S. Naumann and W. P. Roos, MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents, *DNA repair*, 6 (2007) 1079-1099.
- [37] Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O.

Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer and R. Stupp, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *The New England journal of medicine*, 352 (2005) 997-1003.

[38] Sancar, A., DNA excision repair, *Annual review of biochemistry*, 65 (1996) 43-81.

[39] Tasaki, M., K. Shimada, H. Kimura, K. Tsujikawa and N. Konishi, ALKBH3, a human AlkB homologue, contributes to cell survival in human non-small-cell lung cancer, *British journal of cancer*, 104 (2011) 700-706.

[40] Hofseth, L. J., M. A. Khan, M. Ambrose, O. Nikolayeva, M. Xu-Welliver, M. Kartalou, S. P. Hussain, R. B. Roth, X. Zhou, L. E. Mechanic, I. Zurer, V. Rotter, L. D. Samson and C. C. Harris, The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation, *The Journal of clinical investigation*, 112 (2003) 1887-1894.

[41] Meira, L. B., C. A. Moroski-Erkul, S. L. Green, J. A. Calvo, R. T. Bronson, D. Shah and L. D. Samson, Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (2009) 888-893.

[42] Ho, T. V. and O. D. Scharer, Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair, *Environmental and molecular mutagenesis*, 51 (2010) 552-566.

[43] Koepfel, F., V. Poindessous, V. Lazar, E. Raymond, A. Sarasin and A. K. Larsen, Irofulven cytotoxicity depends on transcription-coupled nucleotide excision repair and is correlated with XPG expression in solid tumor cells, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10 (2004) 5604-5613.

[44] Soares, D. G., N. P. Poletto, D. Bonatto, M. Salvador, G. Schwartzmann and J. A. Henriques, Low cytotoxicity of ecteinascidin 743 in yeast lacking the major endonucleolytic enzymes of base and nucleotide excision repair pathways, *Biochemical pharmacology*, 70 (2005) 59-69.

[45] Escargueil, A. E., V. Poindessous, D. G. Soares, A. Sarasin, P. R. Cook and A. K. Larsen, Influence of irofulven, a transcription-coupled repair-specific antitumor agent, on RNA polymerase activity, stability and dynamics in living mammalian cells, *Journal of cell science*, 121 (2008) 1275-1283.

[46] Rocca, C. J., V. Poindessous, D. G. Soares, K. E. Ouadrani, A. Sarasin, E. Guerin, A. de Gramont, J. A. Henriques, A. E. Escargueil and A. K. Larsen, The NER proteins XPC and CSB, but not ERCC1, regulate the sensitivity to the novel DNA binder S23906: implications for recognition and repair of antitumor alkylators, *Biochemical pharmacology*, 80 (2010) 335-343.

[47] Tsodikov, O. V., D. Ivanov, B. Orelli, L. Staresincic, I. Shoshani, R. Oberman, O. D. Scharer, G. Wagner and T. Ellenberger, Structural basis for the recruitment

of ERCC1-XPF to nucleotide excision repair complexes by XPA, *The EMBO journal*, 26 (2007) 4768-4776.

[48] Deans, A. J. and S. C. West, DNA interstrand crosslink repair and cancer, *Nature reviews. Cancer*, 11 (2011) 467-480.

[49] Soares, D. G., A. Battistella, C. J. Rocca, R. Matuo, J. A. Henriques, A. K. Larsen and A. E. Escargueil, Ataxia telangiectasia mutated- and Rad3-related kinase drives both the early and the late DNA-damage response to the monofunctional antitumour alkylator S23906, *The Biochemical journal*, 437 (2011) 63-73.

[50] Hurley, P. J. and F. Bunz, ATM and ATR: components of an integrated circuit, *Cell cycle*, 6 (2007) 414-417.

[51] Escargueil, A. E., D. G. Soares, M. Salvador, A. K. Larsen and J. A. Henriques, What histone code for DNA repair?, *Mutation research*, 658 (2008) 259-270.

[52] Shen, S., O. Kepp and G. Kroemer, The end of autophagic cell death?, *Autophagy*, 8 (2012) 1-3.

[53] Buytaert, E., G. Callewaert, J. R. Vandenheede and P. Agostinis, Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum, *Autophagy*, 2 (2006) 238-240.

[54] Dalby, K. N., I. Tekedereli, G. Lopez-Berestein and B. Ozpolat, Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer, *Autophagy*, 6 (2010) 322-329.

[55] Guerriero, J. L., D. Ditsworth, Y. Fan, F. Zhao, H. C. Crawford and W. X. Zong, Chemotherapy induces tumor clearance independent of apoptosis, *Cancer research*, 68 (2008) 9595-9600.

[56] Leoni, L. M., Bendamustine: rescue of an effective antineoplastic agent from the mid-twentieth century, *Seminars in hematology*, 48 Suppl 1 (2011) S4-11.

[57] Schmitt, C. A., J. S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R. M. Hoffman and S. W. Lowe, A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy, *Cell*, 109 (2002) 335-346.

[58] Papait, R., L. Magrassi, D. Rigamonti and E. Cattaneo, Temozolomide and carmustine cause large-scale heterochromatin reorganization in glioma cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 379 (2009) 434-439.

[59] Alers, S., A. S. Loffler, S. Wesselborg and B. Stork, The incredible ULKs, *Cell communication and signaling : CCS*, 10 (2012) 7.

[60] Li, Y., J. Zhang, X. Chen, T. Liu, W. He, Y. Chen and X. Zeng, Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer, *The American journal of the medical sciences*, 343 (2012) 155-161.

- [61] Maiuri, M. C., L. Galluzzi, E. Morselli, O. Kepp, S. A. Malik and G. Kroemer, Autophagy regulation by p53, *Current opinion in cell biology*, 22 (2010) 181-185.
- [62] Amaravadi, R. K., D. Yu, J. J. Lum, T. Bui, M. A. Christophorou, G. I. Evan, A. Thomas-Tikhonenko and C. B. Thompson, Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma, *The Journal of clinical investigation*, 117 (2007) 326-336.
- [63] Pan, Y., Y. Gao, L. Chen, G. Gao, H. Dong, Y. Yang, B. Dong and X. Chen, Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17 (2011) 3248-3258.
- [64] Chen, L. H., C. C. Loong, T. L. Su, Y. J. Lee, P. M. Chu, M. L. Tsai, P. H. Tsai, P. H. Tu, C. W. Chi, H. C. Lee and S. H. Chiou, Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway, *Biochemical pharmacology*, 81 (2011) 594-605.
- [65] Chu, P. M., L. H. Chen, M. T. Chen, H. I. Ma, T. L. Su, P. C. Hsieh, C. S. Chien, B. H. Jiang, Y. C. Chen, Y. H. Lin, Y. H. Shih, P. H. Tu and S. H. Chiou, Targeting autophagy enhances BO-1051-induced apoptosis in human malignant glioma cells, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 69 (2012) 621-633.
- [66] Chen, R., R. Y. Dai, C. Y. Duan, Y. P. Liu, S. K. Chen, D. M. Yan, C. N. Chen, M. Wei and H. Li, Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells, *Folia biologica*, 57 (2011) 87-95.
- [67] Guo, X. L., D. Li, F. Hu, J. R. Song, S. S. Zhang, W. J. Deng, K. Sun, Q. D. Zhao, X. Q. Xie, Y. J. Song, M. C. Wu and L. X. Wei, Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells, *Cancer letters*, 320 (2012) 171-179.
- [68] Xu, Y., H. Yu, H. Qin, J. Kang, C. Yu, J. Zhong, J. Su, H. Li and L. Sun, Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells, *Cancer letters*, 314 (2012) 232-243.
- [69] Zhou, J., S. E. Hu, S. H. Tan, R. Cao, Y. Chen, D. Xia, X. Zhu, X. F. Yang, C. N. Ong and H. M. Shen, Andrographolide sensitizes cisplatin-induced apoptosis via suppression of autophagosome-lysosome fusion in human cancer cells, *Autophagy*, 8 (2012) 338-349.
- [70] Liu, D., Y. Yang, Q. Liu and J. Wang, Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells, *Medical oncology*, 28 (2011) 105-111.
- [71] Claerhout, S., L. Verschooten, S. Van Kelst, R. De Vos, C. Proby, P. Agostinis and M. Garmyn, Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127 (2010) 2790-2803.

- [72] Ren, J. H., W. S. He, L. Nong, Q. Y. Zhu, K. Hu, R. G. Zhang, L. L. Huang, F. Zhu and G. Wu, Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy, *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 25 (2010) 75-80.
- [73] Harhaji-Trajkovic, L., U. Vilimanovich, T. Kravic-Stevovic, V. Bumbasirevic and V. Trajkovic, AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells, *Journal of cellular and molecular medicine*, 13 (2009) 3644-3654.
- [74] Hu, C., M. J. Zou, L. Zhao, N. Lu, Y. J. Sun, S. H. Gou, T. Xi and Q. L. Guo, E Platinum, a newly synthesized platinum compound, induces autophagy via inhibiting phosphorylation of mTOR in gastric carcinoma BGC-823 cells, *Toxicology letters*, 210 (2012) 78-86.
- [75] Du, H., W. Yang, L. Chen, M. Shi, V. Seewoo, J. Wang, A. Lin, Z. Liu and W. Qiu, Role of autophagy in resistance to oxaliplatin in hepatocellular carcinoma cells, *Oncology reports*, 27 (2012) 143-150.
- [76] Ding, Z. B., B. Hui, Y. H. Shi, J. Zhou, Y. F. Peng, C. Y. Gu, H. Yang, G. M. Shi, A. W. Ke, X. Y. Wang, K. Song, Z. Dai, Y. H. Shen and J. Fan, Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17 (2011) 6229-6238.
- [77] Xu, L., X. J. Qu, Y. P. Liu, Y. Y. Xu, J. Liu, K. Z. Hou and Y. Zhang, Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells, *Chinese journal of cancer*, 30 (2011) 490-496.
- [78] Lin, C. J., C. C. Lee, Y. L. Shih, T. Y. Lin, S. H. Wang, Y. F. Lin and C. M. Shih, Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy, *Free radical biology & medicine*, 52 (2012) 377-391.
- [79] Voss, V., C. Senft, V. Lang, M. W. Ronellenfitch, J. P. Steinbach, V. Seifert and D. Kogel, The pan-Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma, *Molecular cancer research : MCR*, 8 (2010) 1002-1016.
- [80] Katayama, M., T. Kawaguchi, M. S. Berger and R. O. Pieper, DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells, *Cell death and differentiation*, 14 (2007) 548-558.
- [81] Kanzawa, T., I. M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo and S. Kondo, Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells, *Cell death and differentiation*, 11 (2004) 448-457.
- [82] Kanzawa, T., J. Bedwell, Y. Kondo, S. Kondo and I. M. Germano, Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide, *Journal of neurosurgery*, 99 (2003) 1047-1052.
- [83] Alexander, A., S. L. Cai, J. Kim, A. Nanez, M. Sahin, K. H. MacLean, K. Inoki, K. L. Guan, J. Shen, M. D. Person, D. Kusewitt, G. B. Mills, M. B. Kastan and C. L.

Walker, ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010) 4153-4158.

[84] Benzina, S., A. Altmeyer, F. Malek, P. Dufour, J. M. Denis, J. Gueulette and P. Bischoff, High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells, *Cancer letters*, 264 (2008) 63-70.

[85] Altmeyer, A., A. C. Jung, M. Ignat, S. Benzina, J. M. Denis, J. Gueulette, G. Noel, D. Mutter and P. Bischoff, Pharmacological enhancement of autophagy induced in a hepatocellular carcinoma cell line by high-LET radiation, *Anticancer research*, 30 (2010) 303-310.

[86] Aoki, H., Y. Kondo, K. Aldape, A. Yamamoto, E. Iwado, T. Yokoyama, E. F. Hollingsworth, R. Kobayashi, K. Hess, N. Shinojima, T. Shingu, Y. Tamada, L. Zhang, C. Conrad, O. Bogler, G. Mills, R. Sawaya and S. Kondo, Monitoring autophagy in glioblastoma with antibody against isoform B of human microtubule-associated protein 1 light chain 3, *Autophagy*, 4 (2008) 467-475.

[87] Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, A. Criollo, J. C. Rain, F. Gautier, P. Juin, E. Tasdemir, G. Pierron, K. Troulinaki, N. Tavernarakis, J. A. Hickman, O. Geneste and G. Kroemer, Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1, *The EMBO journal*, 26 (2007) 2527-2539.

CAPÍTULO II

***AUTOPHAGY INDUCTION IN COLORECTAL CANCER
CONTRIBUTES TO THE TOLERANCE OF OXALIPLATIN
UNDER LOW GLUCOSE CONDITION***

Artigo a ser submetido para publicação

APRESENTAÇÃO

Neste Capítulo será ilustrado um manuscrito o qual apresenta dados relacionados à citotoxicidade induzida pela oxaliplatina em células de câncer colorretal HCT116 cultivadas em baixa e alta disponibilidade de glicose. O manuscrito também relata que a oxaliplatina ativa significativamente a via autofágica em células tratadas em baixa concentração de glicose. Através do uso de inibidores ou de um ativador da autofagia combinados com a oxaliplatina, foi possível concluir que a ativação da autofagia nessas condições contribuiu para a sobrevivência de células de câncer colorretal em resposta aos danos induzidos pela oxaliplatina.

Por fim, o manuscrito apresenta dados que demonstram que a ativação da autofagia em células de câncer colorretal tratadas com a oxaliplatina em baixa concentração de glicose ocorre via inibição da atividade de mTOR e ativação da proteína quinase AMPK.

Autophagy induction in colorectal cancer contributes to the tolerance of oxaliplatin under low glucose condition

Diana L. Bordin¹, Michelle Lima¹, Guido Lenz¹, Paul Mésange^{2,3,4}, Daniele G. Soares^{2,3,4}, Annette K. Larsen^{2,3,4}, Alexandre Escargueil^{2,3,4}, João A.P. Henriques^{1,5 *}

¹ Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratory of Cancer Biology and Therapeutics, Centre de Recherche Saint-Antoine, Paris 75571, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U938, Paris, France.

⁴ Université Pierre et Marie Curie (Univ. Paris 6), Paris, France.

⁵ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

*** To whom correspondence should be addressed:**

Laboratório de Reparo de DNA em Eucariotos, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422/sala 210, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: + 55 51 33087602

Fax: + 55 51 33087003

Email: pegas.henriques@gmail.com

Abstract

The low availability of glucose is one of the hallmarks of the microenvironment of solid tumors. In response to this condition, the autophagic pathway is activated, which contributes to metabolic adaptation and prolonged survival of tumor cells. In addition to glucose depletion, various anti-cancer agents can also activate autophagy, which may serve as a defense to damage caused by chemotherapy, or contribute to cell death, depending on the extent of damage and cellular context. Given the dual role played by autophagy in cancer treatment, we grew colorectal cancer HCT116 cells in low and high glucose concentration continuously, and then evaluated the cellular response to treatment with oxaliplatin, an alkylating agent used to treat all stages of this type of tumor. The results showed that cells grown at low glucose concentration were more resistant to treatment with oxaliplatin. To assess whether induction of autophagy could be involved in resistance of cells cultured in low glucose, HCT116 cells were treated with oxaliplatin in the presence of the pharmacological inhibitors of autophagic pathway 3-methyladenine or chloroquine. Both inhibitors were able to sensitize cells treated in low concentrations of glucose. Combined treatment with oxaliplatin and 3-methyladenine increased induction of apoptosis and cause decreased levels of intracellular ATP. Although the cytoprotective effect played by autophagy in response to treatment with oxaliplatin, over-stimulation of autophagy, through the use of rapamycin, sensitized cells treated with oxaliplatin in low glucose concentration. Furthermore, activation of autophagy by oxaliplatin in low glucose concentration was mediated by activation of AMPK and by reducing the activity of mTOR. Together, these data demonstrate that activation of autophagy during treatment with oxaliplatin in an environment with low availability of glucose exerted a cytoprotective role and contributed to resistance to treatment. Furthermore, modulation of autophagy through the use of inhibitors or stimulators of this pathway can provide an effective strategy in combination with chemotherapy.

1. Introduction

The microenvironment of solid tumors represents a hostile condition to cancer cells. Rapid cell proliferation and poor vascularization result in low availability of oxygen and nutrients to cancer cells (Dang et al., 2012). In a manner not fully elucidated, these cells are able to survive and maintain the metastatic spread leading to resistance to the treatment with anti-cancer agents, which becomes a limiting factor for the success of chemotherapy (Denko, 2008; Semenza, 2012).

Cells exposed to this combination of stress factors in the tumor microenvironment often activate autophagy as a strategy to survive (Mazure et al., 2010; Lozy and Karantza, 2012). Autophagy is a highly conserved process with an important role in cellular homeostasis. In response to various types of stress, autophagy acts removing and recycling damaged/superfluous organelles and biomolecules in the cell (Mizushima and Levine, 2010). Furthermore, this pathway is also considered an alternative energy source for cells in periods of starvation, which is an essential process to prolong cell survival (Rosenfeldt and Ryan). Then, the high energy demands of cancer cells combined with low nutrient supply features a state of metabolic stress that can be alleviated by autophagy.

Autophagy starts with the formation of autophagosome, a double membrane structure that engulfs cytoplasmic cellular materials to be degraded. The next step is the fusion of autophagosome with lysosomes, giving rise to autolysosomes. The hydrolases present in lysosomes digest the autophagosome contents releasing free amino acids which return to the cytosol and are reused. The regulation of autophagy is complicated and involves different signaling pathways. The mammalian target of rapamycin complex I (mTORC1) is the central control of autophagy, which is a downstream effector of PI3K/Akt pathway (Li et al., 2012). Activated mTORC1 inhibits autophagy through direct phosphorylation of the complex initiator of autophagy Ulk1/2-Atg13-FIP200 (Akers et al., 2012). The mTORC1/PI3K/Akt pathway acts integrated with AMPK, an energy sensor kinase responsible for activating autophagy (Yang et al., 2011). AMPK is activated by upstream kinases, such as LKB1, and inhibits mTORC1 mainly by phosphorylation of TSC2 (Alexander and Walker, 2011). Autophagy is also controlled by p53, which

can inhibit mTORC1 and/or activate AMPK (Maiuri et al., 2010). p53 also activates the autophagic pathway through DRAM (damage regulated autophagy modulator), a p53 target gene encoding a lysosomal protein that plays a role in lysosomal fusion and autophagosomes (Sui et al., 2011).

Even though the tumor microenvironment may be a factor that leads to the induction of autophagy, and therefore resistance to chemotherapy, DNA damage induced by anti-cancer drugs are also responsible for activating the autophagic pathway (Rodriguez-Rocha et al., 2011). Genotoxic stress frequently initiates autophagy integrating the signaling of DNA damage response and the p53 regulatory machinery of autophagy. Little is known about the relationship between DNA damage response and autophagy, but it has been shown that the major mediator of this connection involves the ATM kinase (Alexander et al., 2011).

Studies with several chemotherapeutic agents with different molecular targets in cancer cells show activation of autophagy after treatment in *in vivo* and *in vitro* models (Hippert et al., 2006; Pan et al., 2011; Rodriguez-Rocha et al., 2011). Considering drugs that target the DNA molecule, controversial results have been found. In the first instance, autophagy activation has been considered as a mechanism of cell survival (Yang et al., 2011). However, autophagy activation in cells subjected to a severe and prolonged stress can be directed to cell death (Shen et al., 2012). The functional role of autophagy in the induction of cell death is still debated. Autophagy may precede another form of cell death, or may result from exhaustive attempt of the cell to survive stress, characterizing cell death with autophagic aspects. Due to the fact that autophagy can act as a cytoprotective mechanism or cause cell death, it becomes complicated to define its role in anti-cancer therapy. A greater understanding of how the tumor microenvironment influences the response of cancer cells to chemotherapy, and the role of autophagy in this context, can provide valuable information for the development of treatment strategies against solid tumors.

Therefore, in an attempt to explore the role of autophagy induced by chemotherapy in low glucose concentration, a common situation observed in the tumor microenvironment, HCT116 colorectal cancer cells were continuously grown

in low glucose condition and were treated with oxaliplatin (Ox). Ox is a third generation alkylating agent derived from platinum and has been effective in treating tumors unresponsive to cisplatin, especially colorectal cancer (Alcindor and Beauger, 2011). In order to compare the cellular response of oxaliplatin in low glucose concentration, HCT116 cells were also cultured and treated in high glucose concentration. The results showed that Ox induced autophagy in cells treated with low concentration of glucose via inhibition of mTOR and activation of AMPK, and served as a cytoprotective mechanism. Inhibiting autophagy with 3MA or CQ, cells were sensitive to treatment with Ox, increasing the number of apoptotic cells and decreasing intracellular levels of ATP. Additionally, rapamycin, an inhibitor of mTORC1, showed increase induction of autophagy which contributed to the tolerance of HCT116 cells to treatment with Ox.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Oxaliplatin (Eloxatin) was obtained from Sanofi-Aventis. Chloroquine (CQ), 3-methyladenine (3MA), Rapamycin (Rap), MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and acridine orange (AO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.2. Cell Culture

HCT116 cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen, Carlsbad, CA) containing high glucose (25 mM), a standard culture medium, and low glucose (2.5 mM), a glucose concentration 10 fold lower than that used for standard cell culture. To obtain low glucose concentration, DMEM containing high-glucose was diluted with DMEM without glucose (Invitrogen, Carlsbad, CA). Both medium were supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 units/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a humidified incubator with an atmosphere of 5% CO₂.

2.3. *Clonogenic assay*

We assessed the ability of cells cultivated in low and high glucose concentration to form colonies on a monolayer surface into a well of a six-well plate. Cells were plated at a density of 200 cells/well and allowed to adhere. The next day, the culture medium was changed and cells were grown for 10 to 12 days. To visualize colonies, media was removed, cells were fixed in 96% ethanol for 10 min and stained with a mixture of 0.5% crystal violet/20% methanol solution. Colonies were counted and are presented as the mean of colonies \pm SD from three independent experiments.

2.4. *MTT viability assay*

Cells were seeded at 7×10^3 cells into a well of 24 well-plate and treated continuously with Ox for 120 hours in low and high glucose concentration. Following treatment, cells were incubated with 0,4 mg/ml MTT salt for 4 h. Absorbance was measured at a wavelength of 540 nm.

2.5. *Flow cytometric quantification of acidic vesicular organelles (AVOs)*

HCT116 cells were treated during 24h and 48h with Ox in low and high glucose concentration. Cells were harvested by trypsinization, washed in PBS, and then stained with 1 μ g/ml acridine orange for 15 min and immediately AO fluorescence was measured by flow cytometry.

2.6. *GFP-LC3 overexpression and autophagosome detection*

Autophagosome formation was evaluated transfecting HCT116 cells with pEGFP-LC3 plasmid DNA, kindly provided by Dr. Tamotsu Yoshimori, using Lipofectamine™ LTX according the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA). Transfected cells were treated with Ox at indicated time, fixed with 4% paraformaldehyde and then analyzed by fluorescence microscopy. The percentage of cells with at least 5 clear green dots in the cytosol was quantified by counting 100 green cells.

2.7. *Apoptosis analysis*

Apoptosis was detected using Annexin V-FITC (1 µg/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) and propidium iodide (PI 1 µg/ml) staining. Cells were treated with Ox alone or in combination with 3MA or Rap at indicated doses for the indicated time. After exposure to the different experimental conditions, cells were trypsinized and incubated with PI and Annexin V-FITC for 15 min at 37°C. The samples were then analyzed by flow cytometry.

2.8. *Western blot analysis*

Cells were washed with PBS and collected from plates with lysis buffer containing 10% SDS, 100 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1:10 wv cocktail protease inhibitor (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Proteins were quantified using the BCA assay (Pierce, Rockford, IL). The same amount (30 µg) of proteins was resolved in a SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). After transfer, membranes were blocked in 5% skimmed milk powder with 0.1% Tween 20. The blots were then probed at 4°C overnight with the primary antibody for: LC3 (1:500); mTOR (1:1000); phospho-mTOR (Ser2448) (1:500); AMPK (1:500); phospho-AMPK (Thr172) (1:500). Secondary antibodies were goat anti-rabbit IgG-HRP or goat anti-mouse IgG-HRP (1:5000, Santa Cruz, CA). Signal was detected using ECL western blotting substrate system or Supersignal chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL).

2.9. *Intracellular ATP levels*

ATP levels were measured by the luciferin-luciferase method using an ATP Determination Kit (Molecular Probes, Eugene, OR). A standard curve was generated from known concentrations of ATP for each experiment to reassure the reproducibility.

2.10. *Statistical analysis*

Each experiment was carried out at least in triplicate. Statistical analysis was conducted by ANOVA followed by Tukey post-hoc test to multiple comparisons. 'p'

value under 0.05 was considered significant. The GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., Philadelphia, U.S.A.) was employed.

3. Results

3.1. Cells exposed to low glucose concentration are resistant to Ox

In order to determine whether HCT116 cells cultured continuously in low glucose concentration are able to form colonies with the same efficiency than cells grown in high glucose, clonogenic assay was performed (**Fig. 1A, 1B**). Colorectal cancer cells were allowed to grow for 10 to 12 days in low and high concentrations of glucose and at the end of this period there were no differences in the number of colonies formed between the two concentrations of glucose. However, a difference was found in cell viability when the cells were treated with Ox in low and high glucose concentration (**Fig. 1C**). The cell viability performed by MTT showed that cells treated with low glucose concentration were more resistant to Ox (IC_{50} 2.9 μ M) compared to cells that received treatment in high glucose concentration (IC_{50} 0.8 μ M).

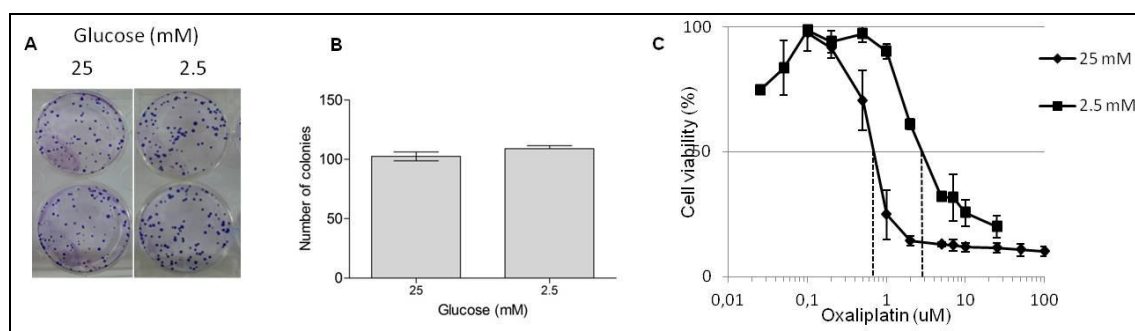


Figure 1. Cell viability of HCT116 cells cultured in high (25 mM) and low (2.5 mM) glucose concentrations. (A) Clonogenic assay in HCT116 colorectal cells cultured continuously at 25 mM and 2.5 mM of glucose. (B) Quantification of the data presented in (A). (C) Cell viability was determined by MTT method in HCT116 cells treated with Ox for 120h at 25 mM and 2.5 mM glucose.

3.2. Ox induces autophagy in HCT116 treated in low and high glucose concentration

Since cells treated with Ox in low glucose concentration were more resistant to Ox, we decided to evaluate whether the increased survival observed could be related to the induction of autophagy in these conditions. Autophagy is characterized by the formation of acidic vesicular organelles (AVOs) (Chen et al., 2010). Acridine orange stains the cytoplasm and the nucleus of green and dim red fluorescence, respectively, whereas acidic organelles are stained of bright red.

Cells cultured in low and high glucose were treated with different doses of Ox corresponding to the values of IC_{10} , IC_{25} and IC_{50} , obtained from MTT assay, for each glucose concentration at indicated time. AVOs were detected in cells treated with Ox only after 48h of treatment as measured by AO staining in flow cytometry. A rise in AVOs formation in cells treated with high glucose concentration was detected only with the highest dose tested (**Fig. 2A, 2C**), whereas Ox significantly enhanced the development of AVOs in a dose dependent manner in cells exposed to low glucose concentration (**Fig. 2B, 2D**).

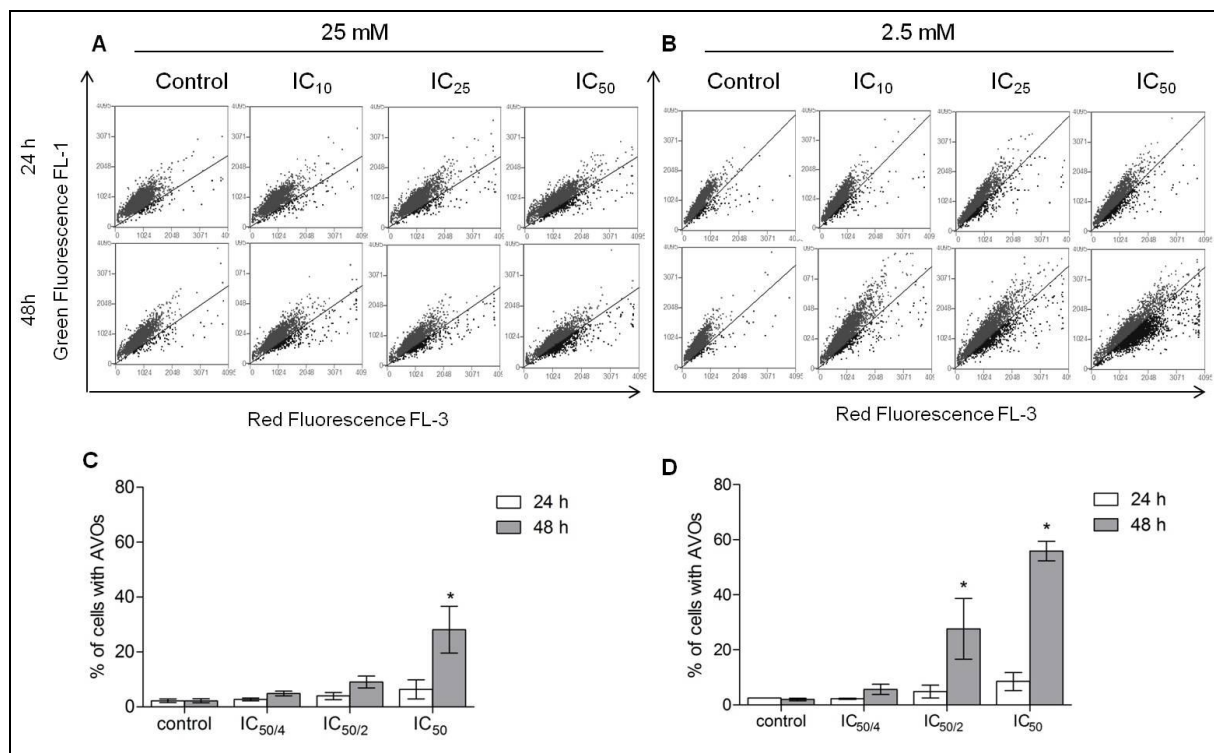


Figure 2. Ox induces autophagy in HCT116 colorectal cancer cells after 48h of treatment. (A) and (B) Representative flow cytometry dot plots of acridine orange staining in cells treated with different concentrations of Ox during 24h and 48h. Quantification of AVOs in high **(C)** and low glucose **(D)** concentration.

It is worth to note that the number of cells showing AVOs was approximately two times higher in cells treated in low glucose than high glucose. Autophagy was also evaluated by the formation of autophagosomes after treatment with Ox. LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), a mammalian ortholog of yeast Atg8, is processed post-translationally into LC3-I, a cytoplasmic form of the protein. In presence of pre-autophagic signal, LC3-I is converted to LC3-II form, which associates with the autophagosome membranes (Mizushima et al., 2011). The conversion of LC3-I to LC3-II is considered a reliable marker of autophagy (Mizushima, 2007). Transfecting cells with the plasmid GFP-LC3, make it possible to visualize, by fluorescence microscopy, the punctuate aggregation and accumulation of GFP-LC3-II which indicates the formation of autophagosomes. After 48h of treatment, Ox was able to increase the percentage of cells showing punctuate aggregation of GFP-LC3 in low glucose concentration, but not in high-glucose **(Fig. 3A-D)**.

To confirm these results we measured the expression of LC3 by western blot. The western blot analysis of cells cultured in high glucose concentration shows a slight increase in LC3-II levels after 24h of exposure to Ox, whereas the increase was more pronounced at 48 h of treatment **(Fig. 3E)**. For cells cultured with low glucose concentration, the western blot shows an increase in a time-dependent manner in the LC3-II levels in untreated and treated cells **(Fig. 3F)**. However, in the presence of Ox, LC3-II levels increased compared to untreated cells, which was more evident after 48h of treatment. Cells grown in low glucose condition induced autophagy even in absence of Ox indicating that reduced availability of this nutrient in the medium may be inducing autophagy as a way to sustain cell survival.

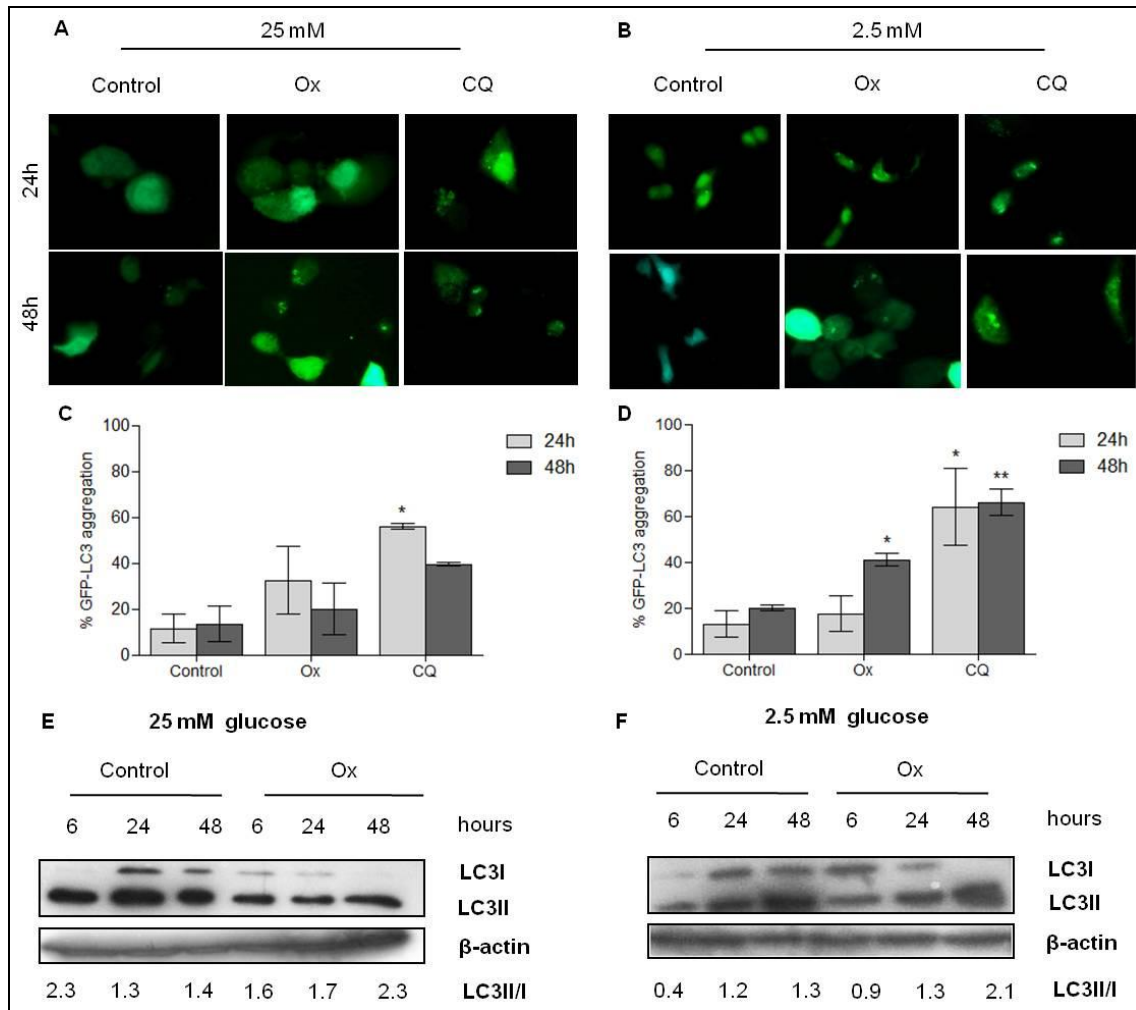


Figure 3. Fluorescence microscopy of GFP-LC3–transfected HCT116 cells. (A) and (B) Representative images of GFP-LC3–transfected HCT116 cells treated during 24h and 48h with Ox (IC_{50}) or CQ in high and low-glucose conditions, respectively. Quantification of cells treated with Ox or CQ which presented more than five defined cytosolic green dots in high (C) and low-glucose (D) concentration. Western blot analysis of LC3 expression in high (E) and low glucose (F) concentration.

3.3. Autophagy inhibition sensitize HCT116 cells treated with Ox in low glucose concentration

To determine whether autophagy is the mechanism used by HCT116 cells cultured in low glucose concentration to survive DNA damage caused by Ox, we

used the pharmacological inhibitors of autophagy 3MA and CQ in combination with Ox. 3MA blocks the early stages of autophagy by inhibiting class III PI3K preventing the production of phosphatidylinositol 3-phosphate, which is essential to form the autophagosome membrane (Wu et al., 2010). CQ, however, prevents the fusion of lysosomes with autophagosomes, which causes an accumulation of autophagosome in the cell and avoids therefore the degradation of its contents (Tasdemir et al., 2008).

HCT116 cells cultured in low glucose concentration were treated with Ox for 23h and then exposed for 1h to 3 MA (2 mM). After this period, the culture medium containing Ox was replaced, and cells were cultured for additional 24h, completing 48h of treatment. To test the effect of CQ, the cells were treated during 24h with Ox and then CQ (10 μ M) was added to the medium and left in co-treatment with Ox until complete 48h. The results of cell viability containing autophagy inhibitors, determined by MTT assay, were compared with a curve in which cells were treated only with Ox for 48h (**Fig. 4A**). Both autophagy inhibitors were able to sensitize cells grown in low glucose to the treatment with Ox (IC_{50} Ox=3,2 μ M; IC_{50} Ox + 3MA=0,6 μ M; IC_{50} Ox + CQ=1,3 μ M), but blocking autophagy in the early steps, seems to be more efficient to sensitize cells to Ox. The same experimental procedure performed to treat cells at low glucose concentrations with 3MA was applied in cells grown in high glucose concentration. However, there was no difference in cell viability in presence of 3MA (**Fig. 4B**). The western blot analysis of cells treated with Ox and exposed for 1h to 3MA shows a reduction in levels of LC3-II in low glucose condition, confirming the inhibition of autophagy (**Fig. 4C**). These results demonstrate that activation of autophagy is an important mechanism of tolerance for colorectal cancer cells under low glucose conditions, but not in high glucose.

One of the contributions of autophagy is the proper supply of ATP to allow cell survival under energetic stress. Autophagy degrades cellular components and provides substrates which are directed to the mitochondria to produce ATP through oxidative phosphorylation (Lozy and Karantza, 2012). Then, inhibition of autophagy could deplete the intracellular ATP levels and contribute to cell death.

For this, we evaluated ATP levels in cells cultured in low glucose concentration and treated with Ox and/or 3MA. As shown in **Fig. 4D**, after 48h of treatment with Ox, in which autophagy is activated, there was no detectable decrease in ATP levels. However, in conditions of autophagy inhibition, ATP levels decreased significantly compared to controls and cells treated with Ox.

Next, we evaluated the effect of autophagy inhibition on apoptosis induction in cells treated with Ox in low glucose concentration. Our results show that the number of Annexin-V positive cells was significantly increased in Ox + 3MA-treated cells after 48h when compared with Ox treatment (**Fig. 4E, F**). The presence of 3MA alone was not sufficient to increase the number of apoptotic cells. These findings indicate a protective effect of autophagy against damage caused by Ox in low glucose concentration.

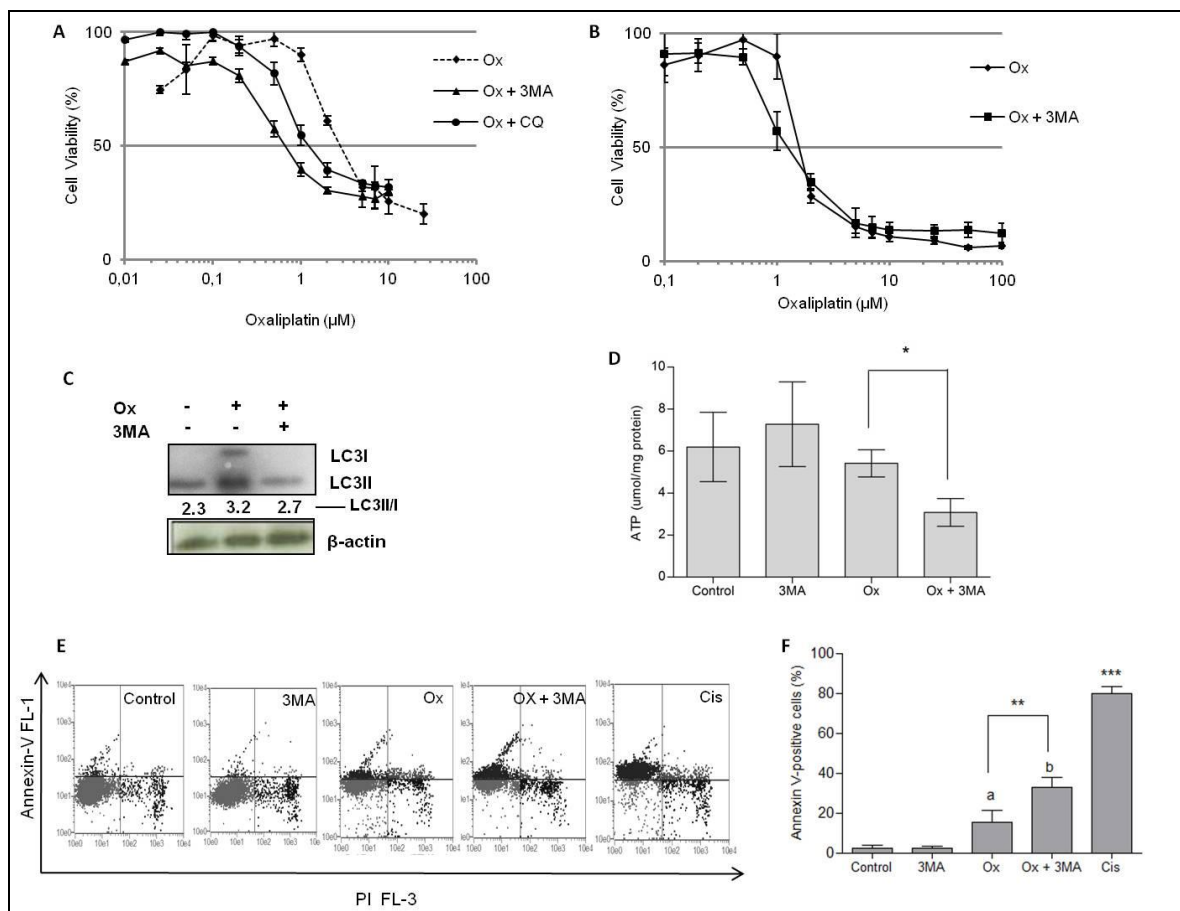


Figure 4. 3MA sensitizes HCT116 cells treated with Ox in low glucose condition. (A) Viability of cells cultured in low glucose and treated during 48h with

Ox in presence of 3MA (2 mM) or CQ (10 μ M). **(B)** Viability of cells cultured in high glucose and treated during 48h with Ox in presence or absence of 3MA (2 mM). **(C)** Western blot analysis of LC3 expression. **(D)** Intracellular levels of ATP in cells treated in low glucose concentration in presence or absence of 3MA (2 mM), * $p < 0.05$. **(E)** Flow cytometric analysis of apoptotic cells after treatment with Ox in presence or absence of 3MA (2 mM). Cisplatin was used as a positive control to induce apoptosis. **(F)** Quantification of the data presented in **(E)**, ^a significantly different from control ($p < 0.01$), ^b significantly different from 3MA treatment ($p < 0.001$), ** $p < 0.01$, ***, significantly different from all treatments and controls ($p < 0.001$).

3.4. *Over-stimulation of autophagy induces cell death in cells treated with Ox in low glucose concentration*

Modulation of autophagy has become a strategy of great interest in the cancer treatment in order to enhance the effects of chemotherapy (Yang et al., 2011). Thus, in addition to inhibiting autophagy, we examined the effect of over-stimulation of autophagy in cells cultured in low-glucose concentration, through the combined use of Rap with Ox. Rap is a conventional inducer of autophagy which activates the autophagic pathway by inhibiting the activity of mTORC1 (Heitman et al., 1991; Jung et al., 2010). Inactivated mTORC1 prevents the phosphorylation of downstream molecules such as p70S6 kinase (p70S6K) and eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1) (Fleming et al., 2011).

We evaluated the effect of autophagy stimulation in combination with Ox on cell viability, apoptosis and LC3-II levels. HCT116 cells were treated during 24h with Ox and then Rap (1 μ M) was added to the medium and left in co-treatment with Ox until complete 48h. It is expected that autophagy promotes survival and resistance against chemotherapy. Considering the cell viability assay, a slightly enhance in cell survival was observed when the higher doses of Ox were combined with Rap (**Fig. 5A**). According to the western blot analysis, LC3-II levels markedly increased in the presence of Rap (**Fig. 5B**). However, the number of Annexin-V positive cells increased when cells grown in low concentration of glucose were treated with the combination Ox + Rap (**Fig. 5C,D**).

3.5. Ox inhibits mTOR phosphorylation and leads to AMPK activation in low glucose concentration

HCT116 continuously cultured in low glucose concentration were treated with Ox during 24h and 48h and both basal and phosphorylated mTOR and AMPK levels were assessed by western blot (**Fig. 6**). Compared to the control, there was a notable decrease in mTOR phosphorylation at 24h and 48h. Western blot analysis of AMPK phosphorylation level revealed a striking increase after 48h in relation to the control and 24h of treatment. These data indicate that Ox induces autophagy in low glucose-treated cells via mTOR inhibition and AMPK activation.

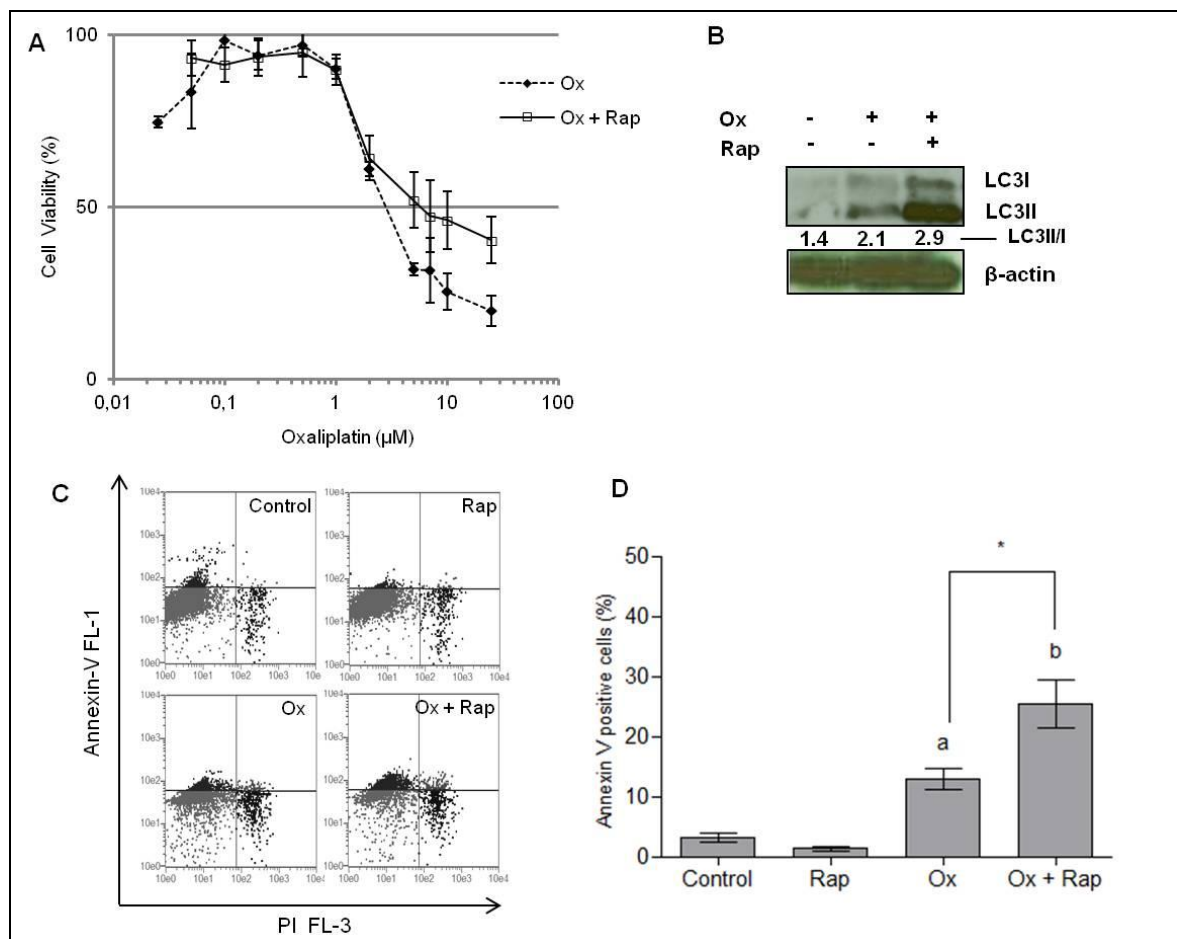


Figure 5. Rapamycin combined with Ox induces apoptosis in HCT116 cells cultured in low glucose concentration. HCT116 cells were treated during 24h with Ox and then Rap (1 μM) was added to the medium and left in co-treatment with Ox until complete 48h (**A**) Cell viability was determined by MTT method in HCT116 cells treated for 48h. (**B**) Western blot analysis of LC3 showing increased

expression of LC3II in cells treated with Ox and Rap. **(C)** Flow cytometric analysis of apoptotic cells after treatment with Ox and Rap. **(D)** Quantification of the data presented in **(C)**, ^a significantly different from control ($p < 0.01$), ^b significantly different from Rap treatment ($p < 0.01$), * $p < 0.05$.

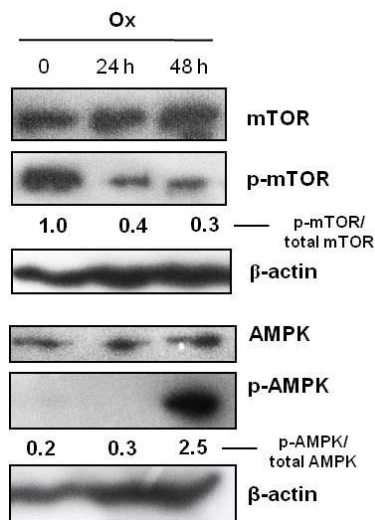


Figure 6. Ox inhibits phosphorylation of mTOR and activates AMPK in colorectal cancer cells cultured in low glucose concentration. HCT116 cultured in low glucose concentration were exposed to Ox for 24h and 48h. Downregulation of p-mTOR and upregulation of p-AMPK proteins were detected by western blot.

4. Discussion

Altered metabolism is a common feature observed in solid tumors (Kroemer and Pouyssegur, 2008). Changes in cellular metabolism are extremely important for survival and continuous proliferation of malignant cancer cells. Due to intense proliferation rate, neovascularization is insufficient resulting in tumor regions with different levels of glucose and oxygen (Berardi and Fantin, 2011). However, glucose depletion and hypoxia can influence tumor cell sensitivity to chemotherapy making cells more resistant (Tredan et al., 2007, Huber et al., 2011; Semenza et al., 2012). Thus, increased knowledge of how cancer cells exposed to tumor

microenvironment respond to chemotherapy is of great value to obtain better results in cancer treatment.

Based on this, we cultivated colorectal cancer HCT116 cells in standard cell culture conditions, and also continuously at low glucose concentration. The concentration of glucose present in commercially available culture media is 25 mM glucose, a hyperglycemic condition in comparison with normal concentrations of glucose (5 mM) found at the arterial end of a tumor microvessel (Vaupel, 2004). We considered the value of 2.5 mM as low glucose concentration as it is ten times lesser than the concentration of glucose found in standard culture medium and half the glucose concentration considered normal. Cells grown in high and low glucose concentrations showed the same clonogenic capacity, but differed in response to Ox. Ox was more effective against cells grown in high glucose concentration, whereas cells exposed to low glucose conditions were more resistant.

One of the mechanisms adopted by tumor cells which acts as an adaptive response to stress in the microenvironment is the activation of autophagy (Amaravadi et al., 2011). Moreover, anti-cancer agents have also been implicated in the induction of autophagy in tumor cells (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009). In general, autophagy has been associated with resistance to chemotherapy, but divergent results are found depending on the cell type, drug used and extent of cellular damage. Then, we evaluated whether the induction of autophagy was involved in tolerance of cell cultured in low glucose concentration to Ox. Autophagy induction was assessed by three different methods: by the AVOs formation, a condensation product between lysosomes and autophagosomes; by punctuate aggregation of GFP-LC3 and measurement of LC3-II levels by western blot. Although the activation of autophagy was detected in cells grown in high and low glucose concentration, autophagy was remarkably higher in cells treated with low concentrations of glucose. In an attempt to show that autophagy is an essential process for cells grown in our experimental conditions, we tried to cultivate U251 malignant glioma cells infected with lentivirus producing a shRNA specific for Beclin-1 in low glucose concentration. Beclin 1, an

orthologue of yeast Atg6, is part of a complex with class III PI3K which is essential for autophagosome formation (Kang et al., 2011). Therefore, confirming the fact that cells exposed continuously to low concentrations of glucose require intact autophagic pathway for survival, U251 cells functionally deficient in Beclin-1 were not successfully grown under these conditions (data not shown).

Some studies have shown that alkylating agents, such as cisplatin, temozolomide and melphalan, induce autophagy in different tumor cell lines (Pan et al., 2011; Guo et al., 2012; Lin et al., 2012). The exact mechanisms by which DNA damage triggers autophagy are unclear, but in general, autophagy induced in response to DNA damage seems to have a cytoprotective role (Rodriguez-Rocha et al., 2011). However, some exceptions to this pattern are observed specially in cases where there is inhibition of DNA repair and/or defective apoptosis (Kanzawa et al., 2003; Voss et al., 2010).

Ox is a relatively new alkylating agent and was introduced into clinical oncology against colorectal cancer. Currently, Ox is also used in the treatment of gastric cancer and metastatic liver cancer (Jeong et al., 2011; Williet et al., 2011). Ox has been implicated in the induction of autophagy via generation of reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma (Ding et al., 2011). Furthermore, autophagy activation acts preventing apoptosis in gastric cancer and hepatocellular carcinoma and may function importantly in resistance to Ox (Ding et al., 2011; Xu et al., 2012). In order to confirm the role of Ox induced-autophagy in colorectal cancer, we used the autophagy inhibitors 3MA and CQ. Remarkably, both 3MA and CQ treatment potentiated Ox-induced cell death in cells treated in low glucose condition, but not in high glucose. These findings indicate that cells exposed constantly to low glucose concentrations are dependent on the activation of autophagy to maintain viability under genotoxic stress.

Nutrient deprived cells use autophagy for maintenance of intracellular ATP levels. In addition, autophagy induction after DNA damage therapy may be associated with maintenance of the ATP levels which allow DNA repair, and therefore cell survival in the face of extensive DNA damage (Katayama et al., 2007). Interestingly, administration of 3MA alone in cells cultivated with low

glucose did not significantly decrease ATP levels. However, autophagy inhibition with 3MA during Ox treatment showed a notable reduction in ATP levels. Our data suggest that the increase in autophagy induction after treatment with Ox contributes to the maintenance of ATP levels, which is important for protection of DNA alkylating damage caused by Ox in cells cultured in low glucose concentration.

Autophagy inhibition during chemotherapy has been shown to be effective in increasing the sensitivity of different tumor models *in vivo* and *in vitro* (Choi et al., 2012). However, under conditions of prolonged stress, overstimulation of autophagy can also lead to cell death (Coates et al., 2010). It has been shown that Rap, a well-known autophagy activator, has the potential to augment the efficacy of selected anticancer therapies (Takeuchi et al., 2005; Coates et al., 2010). Although the mechanism of action of Rap is inhibiting mTOR, and thus stimulating autophagy, the combination of rapamycin with chemotherapeutic agents can lead tumor cells to undergo programmed cell death by apoptosis (Shi et al., 1995; Bae-Jump et al., 2009; Shafer et al., 2010). Because dysregulation of mTOR signaling occurs in a variety of cancers, mTOR is considered a promising target for cancer therapy. In order to evaluate whether an overstimulation of autophagy may contribute to the death of colorectal cancer cells, we used Rap in combination with Ox to treat cells grown in low glucose concentration. The combined use of Rap and Ox markedly enhanced LC3-II levels, and at the same time significantly increased cell death by apoptosis compared to treatment with Ox alone.

Finally, we found that autophagy induction by Ox treatment in cells grown in low glucose concentration decreases the phosphorylation of mTOR and activates AMPK. mTOR serves as the major negative regulator of autophagy and its inhibition is sufficient to induce autophagy. Such inhibition may occur, for example, by genotoxic stress, even when the quantity of nutrients is adequate (Budanov et al., 2008; Maiuri et al., 2010). The genotoxic stress activates p53 which in turn inhibits mTOR activity and regulates its downstream targets, including autophagy (Alers et al., 2012). When the ratio AMP / ATP increases, AMPK is activated and induces autophagy. AMPK blocks anabolic processes and stimulates catabolism

to maintain the energy levels in the cell (Hardie et al., 2012). Besides the activation of AMPK by low energy levels, probably via LKB1 and high AMP concentrations, it has been suggested that a variety of other stimuli unrelated to low nutrient availability can activate AMPK, such as a rise in intracellular Ca^{2+} concentration (Høyer-Hansen & Jäättelä 2007, Alers et al., 2012). Furthermore, the mechanism whereby p53 regulates mTOR involves activation of AMPK, showing that AMPK is centrally involved in pathways that regulate DNA damage and cell proliferation (Sanli et al., 2010).

Thus, this data set shows that colorectal cancer cells exposed continuously to low concentrations of glucose activate autophagy to allow cell survival and combat the DNA damage caused by chemotherapy. This study also shows that modulation of autophagy, not only by inhibiting specific steps, but also by overstimulation of autophagic pathway can provide a very useful way of limiting tumor progression and increase the efficacy of cancer cells exposed to hostile conditions in the tumor microenvironment.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CAPES/COFECUB [French-Brazilian collaborative research grant n° 583/07] and PRONEX/FAPERGS/CNPq (n° 10/0044-3). P.M. is a Mona Nasrallah scholar. D.G.S. was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Villejuif, France. D.L.B was supported by CNPq, Brazil.

References

Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*, 18(1):18-25, 2011.

Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32(1):2-11, 2012.

Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH, Inoki K, Guan KL, Shen J, Person MD, Kusewitt D, Mills GB, Kastan MB, Walker CL. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9):4153-4158, 2010.

Alexander A, Walker CL. The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. *FEBS Lett*, 585(7):952-957, 2011.

Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF, Gehrig PA. Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells. *Cancer*, 115(17):3887-96, 2009.

Berardi MJ, Fantin VR. Survival of the fittest: metabolic adaptations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 21(1):59-66, 2011.

Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3):451-460, 2008.

Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1793:1516-23, 2009.

Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. *Can J Physiol Pharmacol*, 88(3):285-295, 2010.

Choi KS. Autophagy and cancer. *Exp Mol Med*, 44(2):109-120, 2012.

Coates JM, Galante JM, Bold RJ. Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death. *J Surg Res*, 164(2):301-308, 2010.

Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*, 26: 877-890, 2012.
Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, 8(9):705-713, 2008.

Ding, ZB, Hui, B, Shi, YH, Zhou, J, Peng, YF, Gu, CY, Yang, H, Shi, GM, Ke, AW, Wang, XY, Song, K, Dai, Z, Shen, YH, Fan, J. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res*, 17:6229-6238, 2011.

Fleming A, Noda T, Yoshimori T, Rubinsztein DC. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nat Chem Biol*, 7(1):9-17, 2011.

Guo XL, Li D, Hu F, Song JR, Zhang SS, Deng WJ, Sun K, Zhao QD, Xie XQ, Song YJ, Wu MC, Wei LX. Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett*, 320(2):171-179, 2012.

Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4):251-262, 2012.

Heitman, J., Movva, N.R. and Hall, M.N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253(5022):905-909, 1991.

Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*, 14(9):1576-1582, 2007.

Huber HJ, Dussmann H, Kilbride SM, Rehm M, Prehn JH. Glucose metabolism determines resistance of cancer cells to bioenergetic crisis after cytochrome-c release. *Mol Syst Biol*, 7:470, 2011.

Jeong SH, Han JH, Kim JH, Ahn MS, Hwang YH, Lee HW, Kang SY, Park JS, Choi JH, Lee KJ, Sheen SS, Lim HY. Bax predicts outcome in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin palliative chemotherapy. *Dig Dis Sci*, 56(1):131-138, 2011.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584(7):1287-1295, 2010.

Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18(4):571-580, 2011.

Kanzawa, T., Bedwell, J., Kondo, Y., Kondo, S. and Germano, I.M. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J Neurosurg*, 99:1047-52, 2003.

Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Diff*, 14:548-58, 2007.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13: 472-482, 2008.

Li Y, Zhang J, Chen X, Liu T, He W, Chen Y, Zeng X. Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer. *Am J Med Sci*, 343(2):155-61, 2012.

Lin, C.J., Lee, C.C., Shih, Y.L., Lin, T.Y., Wang, S.H., Lin, Y.F. and Shih, C.M. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Rad Biol Med*, 52:377-391, 2012.

Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 23(4):395-401, 2012.

Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2):181-5, 2010.

Mizushima N, Levine B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*, 12(9):823-830, 2010.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27:107-132, 2011.

Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21(22):2861-2873, 2007.

Pan Y, Gao Y, Chen L, Gao G, Dong H, Yang Y, Dong B, Chen X. Targeting autophagy augments in vitro and in vivo antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 17(10):3248-3258, 2011.

Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res*, 711(1-2):158-166, 2011.

Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*, 32(7):955-963, 2012.

Rouschop KM, Wouters BG. Regulation of autophagy through multiple independent hypoxic signaling pathways. *CurrMol Med*, 9:417-424, 2009.

Sanli T, Rashid A, Liu C, Harding S, Bristow RG, Cutz JC, Singh G, Wright J, Tsakiridis T. Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 78(1):221-229, 2010.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 33(4):207-214, 2012.

Shafer A, Zhou C, Gehrig PA, Boggess JF, Bae-Jump VL. Rapamycin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis. *Int J Cancer*, 126(5):1144-1154, 2010.

Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy*, 8(1):1-3, 2012.

Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res*, 55(9):1982-1988, 1995.

Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy*, 7(6):565-571, 2011.

Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, Kondo S. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res*, 65(8):3336-3346, 2005.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*, 10(6):676-87, 2008.

Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 99(19):1441-1454, 2007.

Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 14(3):198-206, 2004.

Voss, V, Senft, C, Lang, V, Ronellenfitsch, MW, Steinbach, JP, Seifert V, Kögel, D. The pan-Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. *Mol Cancer Res*, 8:1002-1016, 2010.

Williet N, Dubreuil O, Boussaha T, Trouilloud I, Landi B, Housset M, Botti M, Rougier P, Belghiti J, Taieb J. Neoadjuvant sorafenib combined with gemcitabine plus oxaliplatin in advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 17(17):2255-2258, 2011.

Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 285(14):10850-10861, 2010.

Xu L, Qu XJ, Liu YP, Xu YY, Liu J, Hou KZ, Zhang Y. Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Cancer*, 30(7):490-496, 2011.

Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther*, 10(9):1533-1541, 2011.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

O microambiente de tumores sólidos é um meio complexo para o crescimento e sobrevivência das células tumorais. Este ambiente inclui características como pH ácido, baixos níveis de nutrientes e fatores de crescimento, além de flutuações nos níveis de oxigênio, o que gera estresse hipóxico. Todas essas características estão relacionadas com a vascularização insuficiente e irregular do tumor (Lunt et al., 2009). Nessa situação, ocorre a ativação de uma série de funções celulares as quais permitem que as células tumorais não somente sobrevivam, mas continuem a proliferação metastática. Entre os muitos genes ativados estão os responsáveis pelo transporte e metabolismo da glicose (Berardi & Fantin, 2011). O produto destes genes permite que as células se adaptem aos ciclos de estresse proporcionados pelo microambiente tumoral, mantendo níveis suficientes de ATP intracelulares e permitindo que macromoléculas indispensáveis para o crescimento celular sejam sintetizadas.

Tumores que apresentam as características mencionadas acima, como o colorretal, tendem a apresentar resistência ao tratamento quimioterápico. O câncer colorretal é a segunda causa de mortes no mundo ocidental relacionada ao câncer. No Brasil, o câncer colorretal é o quinto tipo de câncer mais comum e segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para novos casos de câncer colorretal para o ano de 2012 foi de 14.180 para homens e 15.960 para mulheres (Consulte a publicação [Estimativa 2012 Incidência de Câncer no Brasil](#)). Uma vez diagnosticado o câncer colorretal, a cirurgia é o seu tratamento primário, na qual retira-se a parte do intestino afetada e os linfonodos próximos a esta região. Após o tratamento cirúrgico, a radioterapia associada ou não à quimioterapia é utilizada para diminuir a possibilidade de reincidência do tumor (Rodel et al., 2012).

Na quimioterapia, os agentes anti-câncer podem ser utilizados em combinação ou como agentes únicos. Utilizados preferencialmente em combinação, os agentes anti-câncer são combinados com a finalidade de atingir

diferentes alvos na célula tornando a quimioterapia mais eficiente. Os agentes antineoplásicos incluem diferentes classes de medicamentos: os agentes alquilantes, os antimetabólitos, os inibidores mitóticos, os antibióticos, os inibidores de topoisomerase, os hormônios e antagonistas hormonais e os terapêuticos molecular-alvo.

Entre os agentes genotóxicos, ou seja, aqueles que possuem como alvo a molécula de DNA, os agentes alquilantes descam-se por seu amplo espectro de ação na clínica oncológica (para revisão ver Capítulo I). No entanto, a resistência adquirida ou intrínseca a esta classe de drogas é uma das principais causas da falha no tratamento do câncer (Liu, 2009). A resistência celular a estes agentes é multifatorial, havendo mecanismos que limitam a formação de adutos no DNA e mecanismos que permitem a reparação ou a tolerância dos danos formados. Mais especificamente, a resistência pode se desenvolver 1) como resultado da redução do acúmulo intracelular da droga, através da diminuição do influxo ou pelo aumento do efluxo desta, 2) pela ativação de mecanismos de detoxificação da droga, como a conjugação da droga com glutathione ou metalotioneínas, por exemplo, 3) pelo aumento da atividade de vias de reparação de lesões no DNA ou pela tolerância desses danos através da ação do sistema de reparo pós-replicativo (Baguley, 2009).

Em vista da variedade de danos causados pelo agentes alquilantes, são ativadas uma série de respostas que podem direcionar as células à sobrevivência ou morte celular. As bases moleculares considerando esta decisão é uma questão de intensa investigação (Bitomsky & Hofmann, 2009). A resposta inicial da célula é tentar sobreviver reparando os danos, o que ativa automaticamente a resposta de danos no DNA e, conseqüentemente, as vias de reparação de DNA adequadas a cada tipo de lesão. Dependendo do tipo de lesão formada, estas podem ser eficientemente removidas pelo reparo direto de bases danificadas, pela via de excisão de nucleotídeos (NER), pela via de excisão de bases (BER), pelo sistema de reparo por erros de emparelhamento (MMR), por recombinação homóloga (HR) ou pela recombinação não homóloga (NHEJ) (para revisão ver Capítulo I).

Na presença de excesso de danos ou no caso de falha de reparação dos danos, vias de morte celular são ativadas. A principal forma de morte celular induzida pelos agentes alquilantes é a apoptose (Roos & Kaina, 2012). A morte celular apoptótica é altamente dependente de ATP e resulta em uma organizada degradação proteolítica do conteúdo intracelular, sem indução de resposta inflamatória (Wyllie, 2010). No entanto, agentes alquilantes também podem ativar a morte celular por necrose, uma forma passiva de morte celular na qual a célula morre como resultado de catástrofe bioenergética imposta por condições externas (Portugal et al., 2009). Esta forma de morte celular não requer os mediadores centrais da via apoptótica, como p53, Bax, Bak e caspases, e induz ativamente uma resposta inflamatória (Ouyang et al., 2012).

Outros mecanismos de perda de viabilidade celular e perda da capacidade proliferativa são a catástrofe mitótica e a senescência (Al-Ejeh et al., 2010; Gordon & Nelson, 2012). No entanto, ainda não foi demonstrada a real contribuição da catástrofe mitótica e da senescência no tratamento anti-câncer, uma vez que ainda não se sabe se estas são formas independentes de morte celular ou se simplesmente precedem outros tipos de morte celular.

Embora a apoptose seja considerada a principal via de morte celular ativada em resposta aos danos no DNA, tem sido demonstrado que a autofagia desempenha um importante papel na determinação do destino celular. Ao contrário da apoptose e da necrose, a autofagia não é sinônimo de morte celular. A autofagia é um processo adaptativo que responde a diferentes condições de estresse e que resulta na degradação de organelas e proteínas intracelulares. A ativação da via autofágica pode promover a adaptação e sobrevivência das células durante estresse energético e genotóxico, por exemplo (Chen et al., 2010). No entanto, a autofagia tem sido considerada “uma faca de dois gumes”, pois em certos contextos celulares a ativação da via autofágica prolongada ou excessiva resulta em morte celular, particularmente em células com apoptose defeituosa ou inibida (Maiuri et al., 2007, Shen et al., 2012). Alternativamente, a ativação da autofagia, em resposta à ativação de p53, também pode acelerar o processo de morte celular quando a reparação do DNA é inibida ou insuficiente

(Kanzawa et al., 2003; Crighton et al., 2006; Rodriguez-Rocha et al., 2011). Dessa forma, a compreensão do papel da autofagia no tratamento do câncer é crítica, pois muitas terapias anti-câncer tem demonstrado ativar a autofagia, embora as consequências dessa ativação não estejam suficientemente claras.

No trabalho apresentado no Capítulo II, células de câncer colorretal da linhagem HCT116 foram cultivadas continuamente em meio de cultura contendo baixa concentração de glicose, uma tentativa de simular uma condição comum presente no microambiente tumoral. O objetivo do trabalho apresentado no referido capítulo, foi investigar o papel da indução da autofagia em resposta ao tratamento com o agente alquilante oxaliplatina durante a exposição contínua das células à baixa concentração de glicose.

A oxaliplatina é um agente alquilante pertencente à família das platinas. A introdução da oxaliplatina no regime terapêutico do cancer colorretal possibilitou grandes avanços no tratamento deste tipo de câncer, prolongando significativamente a sobrevivência dos pacientes (Alcindor & Beauger, 2011). No entanto, a resistência à quimioterapia continua sendo o principal obstáculo que limita o sucesso do tratamento, independente do tipo de tumor. Portanto, a identificação e validação de novas estratégias terapêuticas representa um significativo desafio na pesquisa do câncer.

Os resultados obtidos no Capítulo II demonstraram que células cultivadas continuamente em baixa concentração de glicose foram mais resistentes ao tratamento com oxaliplatina do que células expostas à alta concentração de glicose (Figura 1). A baixa disponibilidade de nutrientes é um dos principais ativadores da autofagia (Mathew & White, 2011). Portanto, a fim de avaliar se a resistência observada à oxaliplatina em células tratadas em baixa concentração de glicose poderia ativar a autofagia como um mecanismo citoprotetor, diferentes métodos de avaliação da ativação da autofagia foram utilizados. Após o tratamento com oxaliplatina, foi observada indução de autofagia tanto em células tratadas com baixa como em alta concentração de glicose (Figuras 2 e 3, Capítulo II). No entanto, a indução de autofagia foi significativamente maior em células expostas continuamente a baixa concentração de glicose.

Na limitação da disponibilidade de nutrientes, a atividade de mTORC1 é inibida, o que consequentemente ativa a autofagia (Jung et al., 2010). Embora a autofagia induzida por depleção de nutrientes seja principalmente regulada pela sinalização de mTOR, outros mecanismos independentes da atividade de mTOR também podem estar envolvidos (Mathew & White, 2011). Além disso, diversos estudos, muitos deles realizados com agentes alquilantes como temozolomida, cisplatina e mostarda nitrogenada, demonstram que a autofagia exerce um efeito citoprotetor em células de câncer. Este efeito retarda a morte celular por apoptose, o que resulta em resistência ao tratamento e dormência do tumor, com eventual recrescimento e progressão tumoral (Mathew et al., 2007; Lu et al., 2008; Cheong et al., 2012). Estes estudos foram baseados em resultados obtidos *in vitro* utilizando diferentes linhagens celulares e diferentes modelos de tumores *in vivo*.

A capacidade da inibição da autofagia aumentar a quimiosensibilidade e a regressão de tumores têm sido confirmadas em diferentes modelos de câncer (Amaravadi et al., 2011; Bristol et al., 2013). Os inibidores farmacológicos da autofagia podem ser classificados como inibidores de estágio inicial ou final da via autofágica. Os inibidores de estágio inicial incluem a 3-metiladenina, wortmanina e LY294002, os quais agem na enzima PI3KIII e interferem no seu recrutamento às membranas de isolamento que iniciam a formação do autofagossomo. Os inibidores de fase final incluem os agentes antimalária cloroquina e hidrocloroquina, bafilomicina 1 e monensina. Bafilomicina 1 é um inibidor específico de ATPase vacuolar, enquanto que a cloroquina, hidrocloroquina e monensina são agentes lisomotrópicos que previnem a acidificação dos lisossomos, os quais dependem de um pH baixo para a ação das hidrolases digestivas. De todos os inibidores de autofagia conhecidos, somente a cloroquina e a hidrocloroquina foram avaliados em humanos, pois elas são comumente utilizadas como agentes antimalária e em doenças autoimunes. Outra grande vantagem desses agentes é que eles atravessam a barreira hemato-encefálica, podendo ser utilizados em tumores cerebrais. No entanto, a utilização da hidrocloroquina tem sido preferida pelo fato de ter demonstrado um perfil favorável em relação aos efeitos colaterais. Em adição, diversos estudos têm

demonstrado que o *knockdown* genético de genes relacionados à autofagia (ATGs) ou a inibição farmacológica da autofagia pode efetivamente aumentar a morte celular induzida por agentes alquilantes em modelos pré-clínicos (Amaravadi et al., 2007; White et al., 2009). Além disso, o uso de inibidores combinados com agentes quimioterápicos tem mostrado supressão do crescimento de tumores e melhores resultados em comparação com o uso de agentes quimioterápicos sozinhos *in vitro* e *in vivo* (Yang et al., 2011).

Os resultados apresentados no Capítulo II demonstraram que a inibição da autofagia, através da combinação da oxaliplatina com os inibidores farmacológicos da via autofágica 3-metiladenina ou cloroquina, foi capaz de sensibilizar células HCT116 tratadas em baixa concentração de glicose, mas não em alta (Figura 4A e 4B). Como consequência, um aumento na morte celular por apoptose em baixa concentração de glicose foi observado (Figura 4E). Este resultado confirma que a autofagia induzida pela oxaliplatina exerceu um efeito citoprotetor em células HCT116 como resposta ao estresse genotóxico em baixa concentração de glicose. Além disso, os dados deste trabalho também demonstraram que a combinação da oxaliplatina com 3-metiladenina diminuiu significativamente os níveis de ATP intracelulares (Figura 4D, Capítulo II), sugerindo que a ativação da autofagia nessas condições contribuiu para a manutenção dos níveis energéticos na célula tumoral.

Dadas as funções críticas da autofagia na progressão tumoral, diversos estudos clínicos e pré-clínicos tem sido realizados a fim de desenvolver agentes terapêuticos destinados a interferir na via autofágica (Cheong et al., 2012). Embora o estímulo da via autofágica esteja relacionado, na maioria dos casos, à resistência das células tumorais, uma excessiva ativação desta via pode resultar em morte celular. Por esse motivo, a superestimulação da via autofágica também tem sido investigada em combinação com agentes anti-câncer.

No trabalho desenvolvido do Capítulo II, células cultivadas com baixa concentração de glicose foram tratadas com a combinação de oxaliplatina e rapamicina, um conhecido indutor de autofagia que age inativando a atividade quinase da mTOR. Foi observado um aumento significativo na indução de

autofagia na presença de rapamicina através do aumento da expressão da proteína LC3II por western blot (Figura 5B). Além disso, foi constatado um aumento na morte celular por apoptose nos tratamentos conduzidos com oxaliplatina e rapamicina em relação à oxaliplatina sozinha (Figura 5C). Este resultado demonstra que a superestimulação da autofagia foi capaz de sensibilizar células de câncer colorretal expostas à baixa concentração de glicose.

Por fim, este trabalho investigou as vias de sinalização envolvidas na indução de autofagia pela oxaliplatina em células de câncer colorretal HCT116 expostas continuamente a baixa concentração de glicose. O tratamento com oxaliplatina induziu uma diminuição na atividade da cinase mTOR e um aumento na atividade da cinase AMPK (Figura 6, Capítulo II).

A ativação de AMPK na célula funciona como um *checkpoint* de baixos níveis energéticos, um processo que pode ser comparado ao *checkpoint* de danos no DNA (Kim et al., 2011). Quando ativada, AMPK ativa e fosforila diversos substratos a jusante, incluindo o supressor tumoral TSC2, o qual forma um heterodímero com TSC1. Quando mutados, TSC1/TSC2 causam a síndrome da esclerose tuberosa, caracterizada por lesões neoplásticas que afetam principalmente o cérebro, rins, pele, coração e pulmão (Crino et al., 2006). TSC2 exerce um papel crítico como regulador negativo da quinase mTOR, a qual inibe a síntese de proteínas e o crescimento celular quando inativada por TSC1/TSC2.

Além do estresse energético, o estresse genotóxico também controla a atividade de mTOR. Um dos mecanismos envolvidos na inibição de mTOR por estresse genotóxico inclui a ativação de genes alvos da proteína p53, Sestrina 1 e Sestrina 2 (Budanov & Karin, 2008). Sestrina 1 e Sestrina 2 ativam AMPK, a qual desencadeia a inativação de mTOR (Alexander et al., 2011). Estudos recentes sugerem que a cascata de sinalização de danos no DNA é importante na indução da autofagia. Agentes alquilantes frequentemente formam quebras duplas na molécula de DNA. Em resposta a essas lesões, a via de sinalização de danos no DNA mediada por ATM é ativada (Smith et al., 2010). Essa sinalização inclui uma ação citoplasmática da quinase ATM, a qual é responsável pela inativação de mTOR via ativação de AMPK (Ditch & Paull, 2012; Figura 4, Capítulo I). Apesar

do pouco conhecimento sobre a integração das vias de sinalização de danos no DNA com a indução de autofagia, de modo geral, a inativação de mTOR intermediada por ATM parece ser o evento chave na indução de autofagia por agentes alquilantes. O resultado da ativação da autofagia na célula de câncer resulta na redução de proteínas ubiquitinadas e estresse do retículo endoplasmático, na remoção de organelas danificadas, como a mitocôndria e na manutenção de altos níveis de ATP, os quais permitem a reparação do DNA (Rodriguez-Rocha et al., 2011; Valentin-Vega & Kastan, 2012). Em especial, a remoção de mitocôndrias danificadas confere uma grande vantagem para a célula, uma vez que previne a produção de espécies reativas de oxigênio e a liberação do citocromo c, o qual desencadeia a apoptose (Valentin-Vega & Kastan, 2012).

Em contraste com células expostas continuamente a baixa concentração de glicose (Capítulo II), células que sofreram uma drástica redução na disponibilidade de glicose para 0,5 mM foram mais sensíveis ao tratamento com oxaliplatina (Figura 2, Anexo I) Um grande número de estudos sugere que a interferência no metabolismo da glicose, seja pelo uso de inibidores da via glicolítica ou pela privação da glicose, é capaz de induzir morte celular, fornecendo uma excelente estratégia contra o câncer (revisado por Mjiyad et al., 2011). No entanto, a falta de glicose no meio faz com que as células tumorais ativem vias alternativas de energia, como a autofágica. Embora tenha sido detectado aumento nos níveis de autofagia, através do aumento da expressão da proteína LC3II (Figura 4, Anexo I), a real contribuição da ativação da autofagia nesse contexto não foi avaliada. Tem sido sugerido que o aumento da autofagia durante o tratamento do câncer poderia ser uma tentativa de sobrevivência das células que estão morrendo e não uma causa de morte celular (Shen et al., 2012). No entanto, uma investigação mais detalhada deve ser feita para avaliar se a autofagia foi um dos mecanismos que contribui com a morte celular. Além disso, o tratamento com oxaliplatina nessas condições induziu prontamente uma parada no ciclo celular na fase G1 (Figura 3, Anexo I). Danos no DNA resultante de exposição a agentes platinados induzem parada do ciclo celular, o qual ocorre principalmene na transição das fases G1-S ou G2-M, dependendo da dose utilizada e do contexto celular (Volland et al., 2006). Células expostas à privação

de glicose são induzidas a parar na fase G1 do ciclo celular, a qual é dependente da sinalização de AMPK (Jones et al., 2005).

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho demonstram que a ativação da autofagia é um mecanismo essencial para que células de câncer colorretal que dispõem de baixa concentração de glicose sobrevivam e combatam os danos causados pelo agente alquilante oxaliplatina. Além disso, estes resultados sugerem que tanto a inibição, quanto a superestimulação da autofagia em combinação com o regime quimioterápico pode ser uma maneira eficiente de sensibilizar as células de câncer em condições que favorecem a resistência ao tratamento. Por fim, este trabalho ressalta a importância da disponibilidade glicose para as células de câncer na resposta celular ao tratamento com agentes anti-câncer.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

4.1. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, foi possível concluir que células de câncer colorretal da linhagem HCT116 expostas continuamente a baixas concentrações de glicose são mais resistentes ao tratamento com oxaliplatina. Um dos mecanismos adotados por essas células é a indução de autofagia, o que demonstra que a ativação desta via de sobrevivência celular nessas condições é um grande obstáculo para um resultado eficiente da quimioterapia. Além disso, foi possível demonstrar que a inibição ou a superestimulação da via autofágica em combinação com a oxaliplatina foi capaz de sensibilizar as células de câncer colorretal HCT116 ao tratamento.

4.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- Células de câncer colorretal HCT116 expostas à baixa disponibilidade de glicose são mais resistentes ao tratamento com oxaliplatina do que células que dispõem de alta concentração de glicose.
- A oxaliplatina é capaz de induzir autofagia em células HCT116 expostas a baixa ou alta concentração de glicose, no entanto, em baixa concentração de glicose, a autofagia mostrou exercer um papel citoprotetor.
- A inibição da autofagia com inibidores farmacológicos em combinação com a oxaliplatina sensibiliza células de câncer colorretal HCT116 tratadas em baixa concentração de glicose, aumentando a morte celular por apoptose.
- A indução de autofagia pela oxaliplatina em células de câncer colorretal HCT116 contribui para a manutenção dos níveis intracelulares de ATP.

- A superestimulação da autofagia através do uso da rapamicina combinada com o tratamento da oxaliplatina sensibiliza as células de câncer colorretal HCT116 aumentando a morte celular por apoptose.
- A inibição ou superestimulação da autofagia combinada com a oxaliplatina é mais eficiente no tratamento de células de câncer colorretal HCT116 em baixa concentração de glicose em comparação com a oxaliplatina sozinha.
- A oxaliplatina induz autofagia em células de câncer colorretal HCT116 expostas a baixa concentração de glicose via inibição de mTOR e ativação de AMPK.

PERSPECTIVAS

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho gerou resultados que demonstram que a autofagia é um processo importante na resistência de células de câncer colorretal HCT116 expostas a baixa concentração de glicose. No entanto, o exato mecanismo pelo qual os danos no DNA disparam a autofagia ainda necessita ser elucidado. Alguns estudos recentes sugerem que cascatas de sinalização de danos no DNA como p53 e ATM são importantes indutores da autofagia. No entanto, a conexão entre as vias autofágica e de resposta aos danos no DNA parece ser muito mais complexa, considerando-se a diversidade de proteínas e etapas envolvidas em cada via de sinalização. Neste caso, além de p53 e ATM, a proteína cinase ATR, bem como os efetores na sinalização de danos Chk1 e Chk2, podem estar envolvidos na indução de autofagia em células de câncer tratadas com agentes quimioterápicos. Dessa forma, algumas questões importantes surgiram durante o desenvolvimento desta tese. Portanto, na tentativa de elucidar a conexão das vias de resposta aos danos no DNA com a indução de autofagia pela oxaliplatina, pretendendo-se:

- Silenciar os genes específicos para Beclina-1 e Atg5 em células de câncer colorretal HCT116.
- Avaliar os níveis de fosforilação das proteínas quinases ATM, ATR, Chk1 e Chk2 frente ao tratamento com oxaliplatina em células silenciadas e não silenciadas para Beclina-1 e Atg5.
- Investigar os efeitos da inibição farmacológica das proteínas Chk1 e Chk2 na ativação de autofagia induzida por oxaliplatina em células de câncer colorretal HCT116;
- Investigar os efeitos da fosforilação das quinases Chk1 e Chk2 em resposta à da inibição farmacológica da via autofágica

- Avaliar a viabilidade celular e indução de apoptose em células tratadas com oxaliplatina utilizando inibidores farmacológicos de Chk1 e Chk2 em células silenciadas e não silenciadas para Beclina-1 e Atg5.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Adams JM, Difazio LT, Rolandelli RH, Luján JJ, Haskó G, Csóka B, Selmeczy Z, Németh ZH. HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol Hung*, 96(1):19-28, 2009.

Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res*, 61(17):6548-6554, 2011.

Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*, 18(1):18-25, 2011.

Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32(1):2-11, 2012.

Altmeyer A, Jung AC, Ignat M, Benzina S, Denis JM, Gueulette J, Noël G, Mutter D, Bischoff P. Pharmacological enhancement of autophagy induced in a hepatocellular carcinoma cell line by high-LET radiation. *Anticancer Res*, 30(2):303-310, 2010.

Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, Lotze MT, White E. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 17(4):654-666, 2011.

Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A, Thompson CB. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest*, 117(2):326-36, 2007.

Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem*, 276:35243-35246, 2001.

Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol*, 46:308–316, 2010.

Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr*, 39:223–229, 2007.

Berardi MJ, Fantin VR. Survival of the fittest: metabolic adaptations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 21(1):59-66, 2011.

Bialik S, Kimchi A. Lethal weapons: DAP-kinase, autophagy and cell death: DAP-kinase regulates autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 22:199-205, 2010.

Bristol ML, Emery SM, Maycotte P, Thorburn A, Chakradeo S, Gewirtz DA. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy? *J Pharmacol Exp Ther*, 344(3):544-552, 2013.

Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*, 134(3):451-460, 2008.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11: 85–95, 2011.

Chen N, Karantza V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther*, 11(2):157-168, 2011.

Cheung EC, Vousden KH. The role of p53 in glucose metabolism. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2):186–191, 2010.

Choi KS. Autophagy and cancer. *Exp Mol Med*, 44(2):109-120, 2012.

Comella P, Casaretti R, Sandomenico C, Avallone A, Franco L. Role of oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer. *Ther Clin Risk Manag*, 5(1):229-238, 2009.

Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*, 355(13):1345–56, 2006.

Cunningham D, Okines AF, Ashley S. Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med*, 362(9):858-859, 2010.

Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes Dev*, 26: 877-890, 2012.

de Gramont A, Figuer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 18(16):2938-47, 2000.

De Milito A, Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol*, 1(6):779-786, 2005.

Decuypere J, Parys JB, Bultynck G. Regulation of the autophagic Bcl-2/Beclin 1 interaction. *Cells*, 1(3): 284-312, 2012.

Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*, 8(9):705-713, 2008.

Ding ZB, Hui B, Shi YH, Zhou J, Peng YF, Gu CY, Yang H, Shi GM, Ke AW, Wang XY, Song K, Dai Z, Shen YH, Fan J. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res*, 17(19):6229-6238, 2011.

Ditch S, Paull TT. The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response. *Trends Biochem Sci*, 37(1):15-22, 2012.

Du H, Yang W, Chen L, Shi M, Seewoo V, Wang J, Lin A, Liu Z, Qiu W. Role of autophagy in resistance to oxaliplatin in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*, 27(1):143-150, 2012.

Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, 16(7):966-975, 2009.

El Mjiyad N, Caro-Maldonado A, Ramírez-Peinado S, Muñoz-Pinedo C. Sugar-free approaches to cancer cell killing. *Oncogene*, 30(3):253-264, 2011.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res*, 64:3892–3899, 2004.

Erlich S, Mizrachy L, Segev O, Lindenboim L, Zmira O, Adi-Harel S, Hirsch JA, Stein R, Pinkas-Kramarski R. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy*, 3(6):561-568, 2007.

Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 66(2):225-237, 2003.

Fan Y, Dickman KG, Zong WX. Akt and c- Myc differentially activate cellular metabolic programs and prime cells to bioenergetic inhibition. *J Biol Chem* 285, 7324–7333, 2010.

Ganapathy-Kanniappan S, Kunjithapatham R, Geschwind JF. Anticancer efficacy of the metabolic blocker 3-bromopyruvate: specific molecular targeting. *Anticancer Res*, 33(1):13-20, 2013.

Ganapathy-Kanniappan S, Vali M, Kunjithapatham R, Buijs M, Syed LH, Rao PP, Ota S, Kwak BK, Loffroy R, Geschwind JF. 3-bromopyruvate: a new targeted antiglycolytic agent and a promise for cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 11(5):510-517, 2010.

Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4:891–899, 2004.

Gerweck LE, Vijayappa S, Kozin S. Tumor pH controls the in vivo efficacy of weak acid and base chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther*, 5(5):1275-1279, 2006.

Haggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, 22(4):191-197, 2009.

Hamanaka RB, Chandel NS. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *J Exp Med*, 209(2):211-215, 2012.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 110:177–189, 2002.

He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, 43:67–93, 2009.

Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*, 278(51):51841-51850, 2003.

Herling A, König M, Bulik S, Holzhütter HG. Enzymatic features of the glucose metabolism in tumor cells. *FEBS J*, 278(14):2436-2459, 2011.

Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, 71(22):6921-6925, 2011.

Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst*, 93(4):266-276, 2001.

Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans*, 37:217–222, 2009.

Hughson LR, Poon VI, Spowart JE, Lum JJ. Implications of therapy-induced selective autophagy on tumor metabolism and survival. *Int J Cell Biol*, 2012:872091, 2012.

Ihrlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC. 3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs. *Mol Oncol*, 2(1):94-101, 2008.

Instituto Nacional de Câncer, disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>, acesso em 11/02/13.

Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev*, 29(6):541-549, 2003.

Jones NP, Schulze A. Targeting cancer metabolism aiming at a tumour's sweet-spot. *Drug Discov Today*, 17:232–241, 2012.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584(7):1287-1295, 2010.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 19(21):5720-5728, 2000.

Karanta-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*, 21:1621-1635, 2007.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7:573–584, 2007.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk. *Nat Cell Biol*, 13(2):132-41, 2011.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2):132-4, 2011.

Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*, 33:109–122, 2008.

Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11:325–337, 2011.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, Sivridis E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res*, 66:632-7, 2006.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 13: 472-482, 2008.

Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 21(1):71-100, 2011.

Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science* 330(6009):1340-1344, 2010.

Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1):27-42, 2008.

Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5):600-606, 2008.

Li Y, Zhang J, Chen X, Liu T, He W, Chen Y, Zeng X. Molecular machinery of autophagy and its implication in cancer. *Am J Med Sci*, 343(2):155-61, 2012.

Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, Jung JU. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*, 8:688-699, 2006.

Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27 (kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol*, 9:218-224, 2007.

Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 48(3):239-244, 2009.

Loar P, Wahl H, Kshirsagar M, Gossner G, Griffith K, Liu JR. Inhibition of glycolysis enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Am J Obstet Gynecol*, 202(4):371.e1-8, 2010.

Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 23(4):395-401, 2012.

Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS, Bast RC Jr. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest*, 118:3917-3929, 2008.

Lunt SJ, Cawthorne C, Ali M, Telfer BA, Babur M, Smigova A, Julyan PJ, Price PM, Stratford IJ, Bloomer WD, Papadopoulou MV, Williams KJ. The hypoxia-selective cytotoxin NLCQ-1 (NSC 709257) controls metastatic disease when used as an adjuvant to radiotherapy. *Br J Cancer*, 103(2):201-208, 2010.

Lunt SJ, Chaudary N, Hill RP. The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 26(1):19-34, 2009.

Luo Z, Zang M, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol*, 6:457-470, 2010.

Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy*, 3(4):374-376, 2007.

Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2):181-5, 2010.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α modulates energy metabolism in cancer cells by inducing over-expression of specific glycolytic isoforms, *Mini Rev Med Chem*, 9:1084–1101, 2012.

Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev*, 21:1367-1381, 2007.

Mathew R, White E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr Opin Genet Dev*, 21(1):113-119, 2011.

Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):1225-1230, 2010.

Mbeunkui F, Johann DJ. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63:571-82, 2009.

Menzies FM, Moreau K, Narayanan U, Renna M, Siddiqi FH, Underwood BR, Winslow AR, Rubinsztein DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90:1383–1435, 2010.

Milane L, Duan Z, Amiji M. Role of hypoxia and glycolysis in the development of multi-drug resistance in human tumor cells and the establishment of an orthotopic multi-drug resistant tumor model in nude mice using hypoxic pre-conditioning. *Cancer Cell Int*, 11:3, 2011.

Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer*, 38(10):1405-1412, 2002.

Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21(22):2861-2873, 2007.

Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27:107-132, 2011.

Moruno, F., Pérez-Jiménez, E., Knecht, E. Regulation of autophagy by glucose in mammalian cells. *Cells*, 1:372-395, 2012.

Notte A, Leclere L, Michiels C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol*, 82(5):427-434, 2011.

Oh JE, Lee HK. Modulation of pathogen recognition by autophagy. *Front Immunol*, 3:44, 2012.

Onozuka H, Tsuchihara K, Esumi H. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer Sci*, 102(5):975-82, 2011.

Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, Avruch J, Yonezawa K. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells*, 9(4):359-366, 2004.

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437–443, 2006.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rose J, Eskelinen EL, Mizushima N, Oshumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, 112:1809-1820, 2003.

Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*, 128(5):931-946, 2007.

Raghunand N, He X, van Sluis R, Mahoney B, Baggett B, Taylor CW, Paine-Murrieta G, Roe D, Bhujwala ZM, Gillies RJ. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer*, 80(7):1005-1011, 1999.

Rathmell JC, Fox CJ, Plas DR, Hammerman PS, Cinalli RM, Thompson CB. Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival. *Mol Cell Biol*, 23(20):7315–7328, 2003.

Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo SQ, Massey DCO, Rödel C, Hofheinz R, Liersch T. Rectal cancer: state of the art in 2012. *Curr Opin Oncol*. 24(4):441-447, 2012.

Rodriguez S, Jafer O, Goker H, Summersgill BM, Zafarana G, Gillis AJ, van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Lu YJ, Huddart R, Cooper CS, Clark J, Looijenga LH, Shipley JM. Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of

adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene*, 22 (12):1880 – 1891, 2003.

Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res*, 711(1-2):158-166, 2011.

Rohwer N, Cramer T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat*, 14(3):191-201, 2011.

Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 28(5):364-371, 2004.

Semenza GL. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol*, 19(1):12–16, 2009.

Semenza, GL. HIF1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet. Dev* 20:51–56, 2010.

Shen S, Kepp O, Kroemer G. The end of autophagic cell death? *Autophagy*, 8(1):1-3, 2012.

Shoshan MC. 3-Bromopyruvate: targets and outcomes. *J Bioenerg Biomembr*, 44(1):7-15, 2012.

Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*, 108:73-112, 2010.

Solier S, Zhang YW, Ballestrero A, Pommier Y, Zoppoli G. DNA damage response pathways and cell cycle checkpoints in colorectal cancer: current concepts and future perspectives for targeted treatment. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(4):356-371, 2012.

Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*, 118(12):3930–3942, 2008.

Swartz MA, Iida N, Roberts EW, Sangaletti S, Wong MH, Yull FE, Coussens LM, DeClerck YA. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy. *Cancer Res*, 72(10):2473-2480, 2012.

Szablewski L. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1835(2):164-169, 2013.

Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*, 10(6):676-87, 2008.

Tennant DA, Durán RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 10(4):267-277, 2010.

Todd RC, Lippard SJ. (2009). Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics*, 1(4):280-291, 2009.

Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol*, 12:831-835, 2010.

Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 99(19):1441-1454, 2007.

Trigg ME, Flanigan-Minnick A. Mechanisms of action of commonly used drugs to treat cancer. *Community Oncology*, 8(8):357-369, 2011.

Valentin-Vega YA, Kastan MB. A new role for ATM: regulating mitochondrial function and mitophagy. *Autophagy*, 8(5):840-841, 2012.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 9: 316–323, 2007.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930):1029-1033, 2009.

Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*, 10: 671–684, 2011.

Vaupel P. Metabolic microenvironment of tumor cells: a key factor in malignant progression. *Exp Oncol*, 32(3):125-127, 2010.

Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol*, 14(3):198-206, 2004.

Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124:269–270, 1956.

World Health Organization – WHO, disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> acesso em 11/02/2013.

Wojnarowski JM, Faivre S, Herzig MC, Arnett B, Chapman WG, Trevino AV, Raymond E, Chaney SG, Vaisman A, Varchenko M, Juniewicz PE. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol*, 58(5):920-927, 2000.

Xu L, Qu XJ, Liu YP, Xu YY, Liu J, Hou KZ, Zhang Y. Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chin J Cancer*, 30(7):490-496, 2011.

Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Exp Mol Pathol*, 86(3):174-179, 2009.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22:124–131, 2010.

Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, Graziano F, Lenz HJ, Kim HJ, Robert J, Im SA, Wang WS, Etienne-Grimaldi MC, Wei Q. ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res*, 17(6):1632-1640, 2011.

Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15077-15082, 2003.

Zaanani A, Praz F, Narjoz C, Dubreuil O, Lepère C, Laurent-Puig P, Taïeb J. Therapeutic implications of DNA mismatch repair in adjuvant colorectal cancer chemotherapy. *Colorectal Cancer*, 2(1):51-59, 2013.

Zhang W, Huang P. Cancer-stromal interactions: Role in cell survival, metabolism and drug sensitivity. *Cancer Biol Ther*, 11(2):150-156, 2011.

Zhang XD, Deslandes E, Villedieu M, Poulain L, Duval M, Gauduchon P, Schwartz L, Icard P. Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res*, 26:3561-3566, 2006.

Zhao F, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics*, 8:113-128, 2007.

Zhou X, Ikenoue T, Chen X, Li L, Inoki K, Guan KL. Rheb controls misfolded protein metabolism by inhibiting aggresome formation and autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:8923-8928, 2009.

ANEXO I

RESULTADOS ADICIONAIS

RESULTADOS ADICIONAIS

Além dos artigos de revisão e do artigo de dados experimentais apresentados nos Capítulos I e II, respectivamente, alguns experimentos adicionais foram conduzidos paralelamente. Neste Capítulo, serão apresentados resultados adicionais referentes a experimentos realizados com as linhagens de câncer colorretal HCT116 e HCT116 p53^{-/-}, as quais foram tratadas com os agentes platinados oxaliplatina e cisplatina em diferentes concentrações de glicose. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo alta concentração de glicose (25 mM) e em concentração de glicose considerada normal (5 mM), os quais condizem com os valores encontrados no sangue periférico humano. Para os experimentos realizados em baixa concentração de glicose, células cultivadas com 5 mM de glicose foram expostas a 0,5 mM de glicose 24 h antes de receber o tratamento com os agentes platinados.

Inicialmente foi avaliado o tempo de duplicação da população de células expostas as diferentes concentrações de glicose (**Figura 1**).

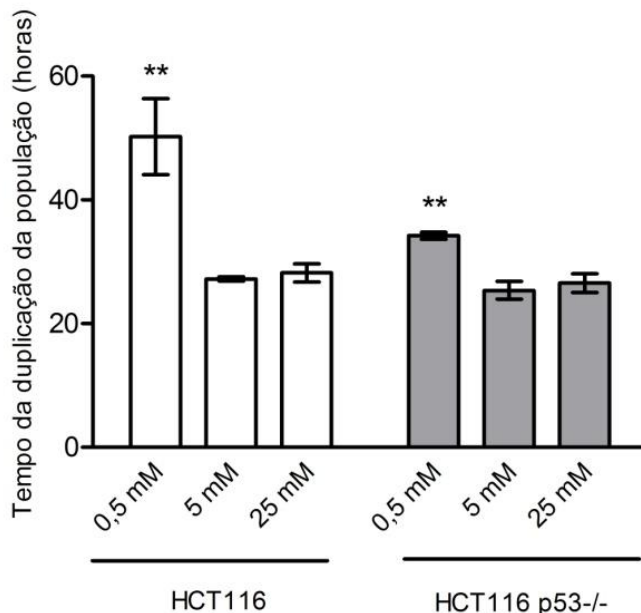


Figura 1. Tempo de duplicação da população de células HCT116 e HCT116 p53^{-/-}. As células foram plaqueadas numa densidade de 5×10^4 células por poço em placas de seis poços nas diferentes concentrações de glicose. Após 96h de cultivo foi realizada a contagem do número de células presente em cada poço e calculado o tempo de

duplicação da população em horas. ** Significativamente diferente de 5 mM e 25 mM da respectiva linhagem, $p \leq 0,01$.

Como ilustrado na Figura 1, células HCT116 levaram aproximadamente o dobro de tempo para duplicar a população em relação às células cultivadas com as maiores concentrações de glicose (0,5 mM = 50 ± 12 h; 5 mM = 27 ± 1 h; 25 mM = 28 ± 3 h). Um maior tempo para que a população de células fosse duplicada também foi observado para a linhagem HCT116 p53 $-/-$ quando expostas a baixa concentração de glicose (0,5 mM = 34 ± 1 h; 5 mM = 25 ± 3 h; 25 mM = 27 ± 3 h).

Ao contrário das células que foram cultivadas continuamente em baixa concentração de glicose, como apresentado no Capítulo II, células HCT116 que receberam o tratamento dos antineoplásicos ao mesmo tempo em que a glicose foi drasticamente reduzida no meio, foram mais sensíveis aos danos gerados pela cisplatina e oxaliplatina, como demonstrado pelo ensaio MTT (**Figura 2A e 2B**). No entanto, células HCT116 p53 $-/-$ não apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com oxaliplatina e cisplatina quando tratadas em baixa concentração de glicose em comparação com células expostas a concentração normal e alta de glicose (**Figura 2C e 2D**).

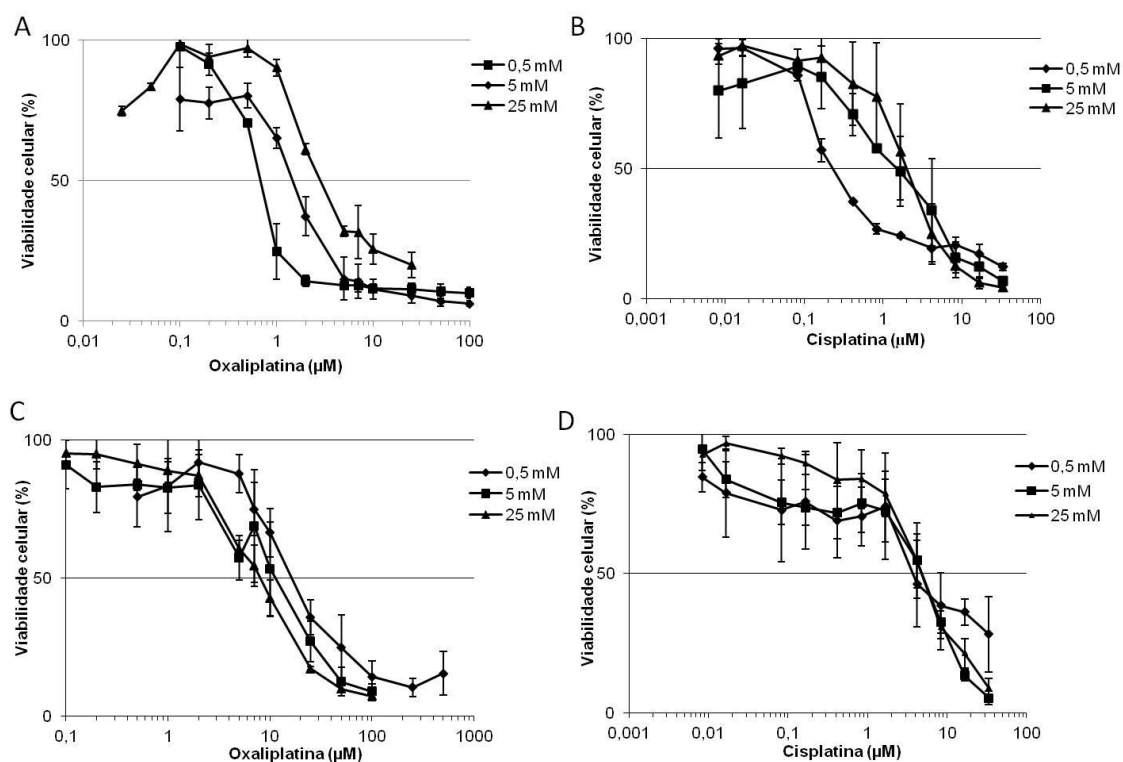


Figura 2. Viabilidade celular avaliada pelo método MTT em células de câncer colorretal tratadas com oxaliplatina ou cisplatina. (A) e (B) Células HCT116 tratadas com oxaliplatina e cisplatina, respectivamente. (C) e (D) Células HCT116 p53-/- oxaliplatina e cisplatina, respectivamente. As células foram tratadas durante 120h em baixa (0,5 mM), normal (5 mM) ou alta (25 mM) concentração de glicose.

Em seguida, o ciclo celular de células HCT116 e HCT116 p53-/- tratadas com oxaliplatina e cisplatina em diferentes concentrações de glicose foi avaliado por citometria de fluxo através da incorporação de iodeto de propídio. O ciclo celular foi avaliado em dois momentos: 1) após 24 h de tratamento com os agentes platinados e 2) após 24 h de tratamento + 24h em meio livre de droga. Para a linhagem HCT116, os resultados mostraram que células expostas a baixa concentração de glicose apresentam uma população maior de células na fase sub-G1 em relação às maiores concentrações de glicose após 24h de tratamento (**Figura 3A**), o que sugere morte celular. No segundo período de avaliação do ciclo celular, um aumento da população de células em fase sub-G1 também foi observado para células tratadas nas maiores concentrações de glicose (**Figura**

3B). Além disso, células tratadas em baixa concentração de glicose mostraram um parada do ciclo celular na fase G1 após 24h de tratamento (Figura 3A). Após o período livre de droga, as células tratadas em baixa concentração de glicose progrediram o ciclo celular e observou-se que o tratamento com cisplatina aumentou marcadamente a população de células na fase G2/M em comparação com o grupo controle e com células tratadas com oxaliplatina (**Figura 3B**).

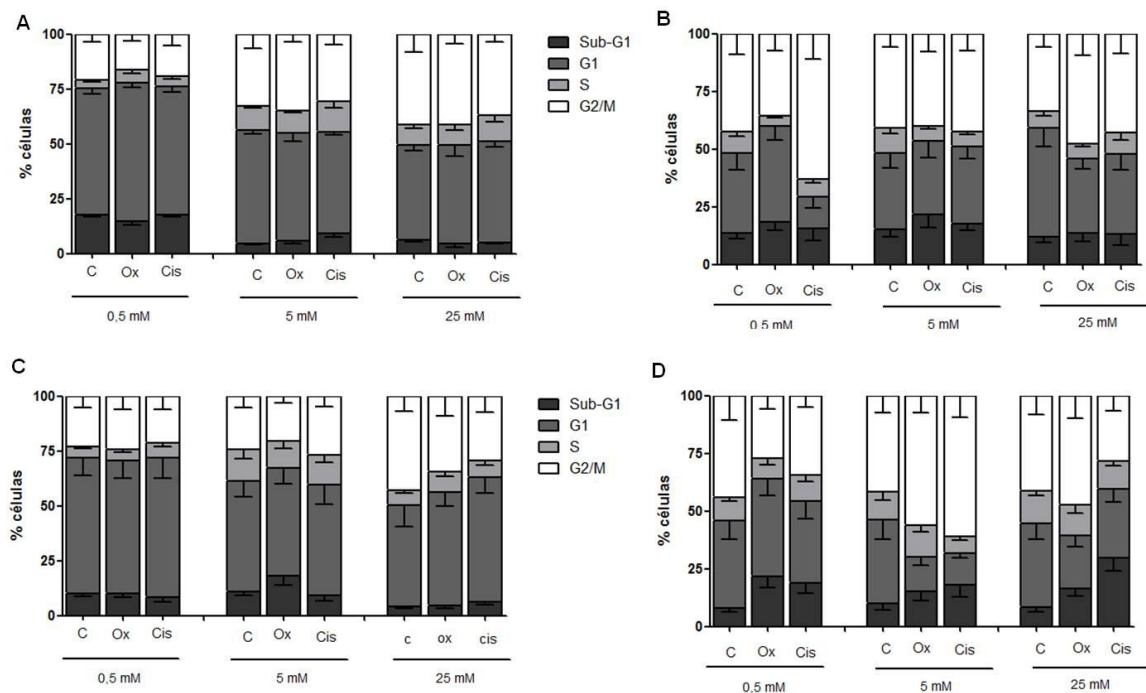


Figura 3. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo através da coloração com iodeto de propídio em células HCT116 e HCT116 p53^{-/-} tratadas com oxaliplatina ou cisplatina em diferentes concentrações de glicose. As células foram tratadas com os agentes platinados (com os respectivos valores de IC₅₀ para cada concentração de glicose) durante 24h em concentração baixa (0,5 mM), normal (5 mM) e alta (25 mM) de glicose. A análise do ciclo celular foi avaliada imediatamente após o tratamento em células HCT116 (**A**) e HCT116 p53^{-/-} (**C**). Após 24h de tratamento, o meio de cultura contendo oxaliplatina ou cisplatina foi removido e as células HCT116 (**B**) e HCT116 p53^{-/-} (**D**) foram incubadas por 24h adicionais em meio livre de droga.

Assim como a linhagem HCT116, também observou-se uma maior concentração de células da linhagem p53^{-/-} na fase G1 após 24 h de tratamento em condições com baixa disponibilidade de glicose (**Figura 3C**). No segundo

período de avaliação do ciclo celular das células HCT116 p53^{-/-}, observou-se um aumento na morte celular, como constatado pelo aumento do número de células em fase sub-G1 para todas as concentrações de glicose (**Figura 3D**). No entanto, nesta fase de avaliação do ciclo celular, células tratadas com baixa concentração de glicose mostraram uma distribuição do ciclo celular similar às maiores concentrações de glicose.

A fim de avaliar a indução de autofagia pela oxaliplatina, a expressão da proteína LC3, nas suas duas isoformas LC3I e LC3II, foi avaliada por western blot em células de câncer colorretal HCT116 (**Figura 4**). As células foram tratadas com oxaliplatina em meio de cultura contendo baixa, normal ou alta concentração de glicose durante 0, 6, 24, 48 e 72 h. Como controle, as células não receberam tratamento e foram expostas às mesmas concentrações de glicose pelos mesmos períodos de tempo. Em células não tratadas expostas à 0,5 mM de glicose, constatou-se um leve aumento na expressão relativa entre LC3II/LC3I em 48 h de exposição, o que indica indução de autofagia. Em 72h de exposição, embora não tenha sido observado um aumento na relação entre LC3II/LC3I quando comparado aos demais períodos de exposição, constatou-se uma superregulação da isoforma LC3I, o que indica que a baixa concentração de glicose no meio induziu o aumento da expressão de LC3I. Em células tratadas com oxaliplatina em baixa concentração de glicose, observou-se indução de autofagia tempo-dependente através do aumento da relação entre LC3II/LC3I. No entanto, não foi observada indução de autofagia em células do grupo controle e tratadas com oxaliplatina em concentração normal e alta de glicose.

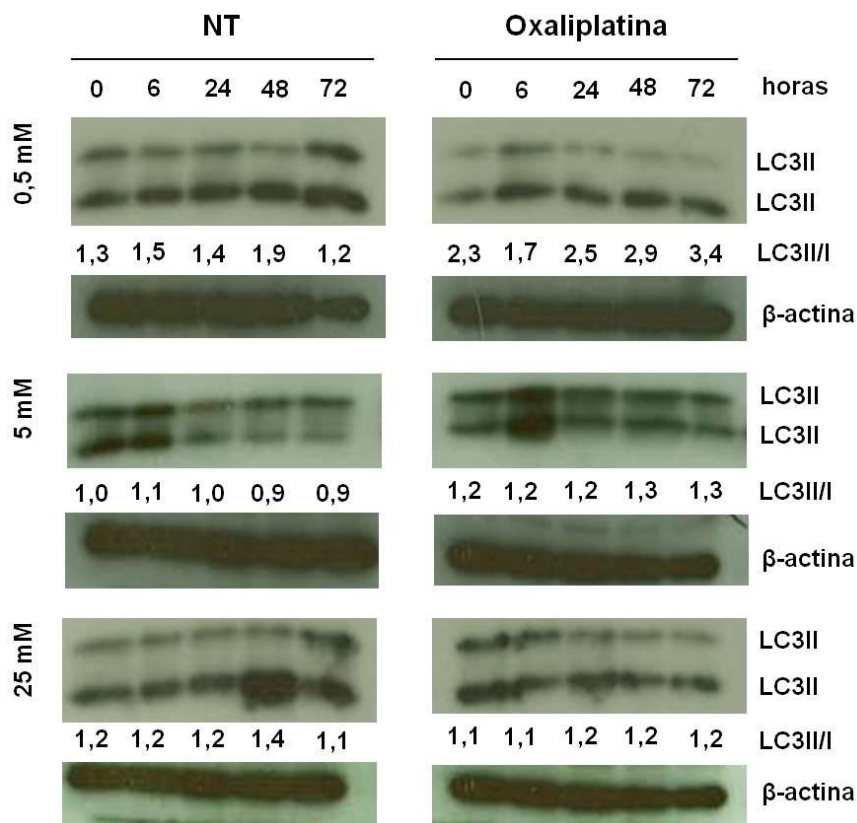


Figura 4. Análise da expressão da proteína LC3 por western blot em células HCT116 não tratadas (NT) e tratadas com oxaliplatina. As células foram expostas a baixa (0,5 mM), normal (5 mM) e alta (25 mM) concentração de glicose durante 0, 6, 24, 48 e 72h em ausência ou presença dos respectivos valores de IC₅₀ de oxaliplatina para cada concentração de glicose.

Os resultados apresentados neste capítulo permitem concluir que células de câncer colorretal HCT116 expostas a uma concentração dez vezes menor do que aquela considerada normal tornam-se mais sensíveis ao receberem tratamento com o agente alquilante oxaliplatina. Além disso, estes resultados sugerem que a ausência da proteína p53 em câncer colorretal pode contribuir com a resistência ao tratamento com oxaliplatina nessas condições. Estes dados também demonstram que células expostas a baixas concentrações de glicose e que receberam tratamento com oxaliplatina ativam a via autofágica. Experimentos adicionais são necessários para definir se a ativação da autofagia nesse contexto estaria levando a morte celular e portanto, contribuindo com a sensibilização das células ao tratamento com oxaliplatina.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1. Reagentes e Células

Oxaliplatina (Eloxatin[®]) foi obtida da empresa Sanofi-Aventis. Cisplatina (Fauldcispla[®]) foi obtida da empresa Mayne Pharma. O anticorpo primário LC3B foi adquirido da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). O anticorpo secundário correspondente foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). As células de câncer colorretal HCT116 e HCT116 p53^{-/-} foram gentilmente cedidas pela Profa. Annette K. Larsen do *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) – Paris, França. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo 5 mM ou 25 mM de glicose (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e antibióticos e as células foram mantidas em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura contendo 0,5 mM de glicose foi preparado a partir da diluição do meio de cultura contendo 5 mM de glicose em meio de cultura DMEM sem glicose (Invitrogen, Carlsbad, CA).

4.3.2. Ensaio de Tempo da Duplicação da População

As células foram plaqueadas numa densidade de 5×10^4 células por poço em placas de 6 poços em meio de cultura contendo 0,5, 5 e 25 mM de glicose. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado e as células permanecem em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 96h. Ao final deste período, as células foram recontadas e o cálculo para determinar o tempo de duplicação da população em horas foi feito utilizando a seguinte fórmula: $N_t = N_0 \times e^{kt}$, onde N_0 representa o número inicial de células em proliferação exponencial com uma constante k . O tempo de duplicação (T) foi calculado como $T = \ln 2/k$.

4.3.3. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade das linhagens celulares expostas à oxaliplatina e cisplatina foi avaliada pelo Ensaio de Redução de MTT (Poindessous *et al.*, 2003). Para o ensaio, 7×10^3 células foram semeadas em cada poço, em uma placa de 24 poços e incubadas a 37 % e 5 % de CO₂. Após 24h, as células foram expostas

aos agentes durante 120 horas. No final deste período, foi adicionado uma solução do corante MTT e as células permaneceram a 37 % e 5 % de CO₂ por adicionais 4h para permitir a entrada do corante nas células e redução do MTT a formazan pela mitocôndria das células viáveis. Após, o meio de cultura foi aspirado e o formazan resultante foi dissolvido em DMSO e analisado em um espectrofotômetro de microplacas a 540 nm. O controle negativo foi considerado como 100 % de viabilidade e as concentrações de cada agente foi comparado com o este. Os resultados apresentados na Figura 2 correspondem à média de três experimentos independentes feitos em duplicata.

4.3.4. Ciclo Celular

Após os tratamento com oxaliplatina e cisplatina em diferentes concentrações de glicose, as células foram lavadas com PBS e coletadas com tripsina. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS, fixadas com etanol 70% e mantidas a -80°C até a realização das análises. As células fixadas foram centrifugadas, lavas e marcadas uma solução contendo Triton X-100, RNase e iodeto de propídio (6 µM). O conteúdo de DNA foi analisado em citômetro de fluxo.

4.3.5. Western Blot

Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e lisadas em tampão de lise contendo 10% SDS, 100 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl pH 8.0 e coquetel inibidor de proteases (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). As proteínas totais foram quantificadas pelo método BCA (Pierce, Rockford, IL). As proteínas (30 µg) foram separadas em gel SDS-PAGE e em seguida tranferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Após a transferência, as membranea foram bloqueadas em 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário LC3B (1:1000). Em seguida, as membranas foram incubadas durante 1h com o anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-HRP. O sinal foi detectado por quimioluminescência utilizando-se o kit Supersignal Chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL) e revelado em filme de

raio-X Amersham Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

ANEXO II

***Carta do Editor da Revista Reviews in Mutation Research
confimando a submissão do artigo “DNA Alkylation
Damage and Autophagy Induction”***

De: "Mutation Research Reviews" <mutrev@elsevier.com>
Data: 21 de dezembro de 2012 19:08:48 BRST
Para: pegas.henriques@gmail.com
Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. João Henriques,

We have received your article "DNA Alkylation Damage and Autophagy Induction" for consideration for publication in Mutation Research- Reviews.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/mutrev/>

2. Enter these login details:

Your username is: pegas.henriques@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/MUTREV/automail_query.asp

3. Click [Author Login]

This takes you to the Author Main Menu.

4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Mutation Research – Reviews

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal.

To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO III

CURRICULUM VITAE

Diana Lilian Bordin

Curriculum Vitae

Março/2013

Dados pessoais

Nome Diana Lilian Bordin
Filiação Dovílio Jacinto Bordin e Gláucia Otília Bertotti
Nascimento 21/09/1980 - Caxias do Sul/RS - Brasil
Carteira de Identidade 7068489851 ssp - RS - 03/09/2007
CPF 980.515.710-53

Formação acadêmica/titulação

- 2008** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
com período sanduíche na Université Pierre et Marie Curie (Orientador:
Annette K. Larsen)
Título: Efeito dos agentes antineoplásicos oxaliplatina e 5-fluorouracil em
linhagens de câncer colo-retal expostas a diferentes concentrações de glicose
Orientador: João Antonio Pegas Henriques
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2007** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
Título: Avaliação da atividade genotóxica, enzimas antioxidantes e níveis de
estresse oxidativo em planárias aquáticas (*Dugesia schubartii*) tratadas com
formulações do herbicida glifosato, Ano de obtenção: 2007
Orientador: Bernardo Erdtmann
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1998 - 2004** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
-

Formação complementar

- 2012 - 2012** Alexander Hollaender Course.
Universidad de la Republica Uruguay, UDELAR, Montevideo, Uruguay
- 2012 - 2012** Curso de curta duração em Course on the Biology of Stress responses.
Cell Stress society International, CSSI, Estados Unidos
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Genética e Conservação.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil, Ano de obtenção:
2004
- 2002 - 2002** Extensão universitária em Cromatografia Básica e Avançada.
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Sistemas de Produção de Mudanças.

Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

2000 - 2000 Curso de curta duração em Marcadores Moleculares Sistemática e Diagnóstico.
Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil

Atuação profissional

1. Inst. de Educação p/ Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Royal - Instituto Royal

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Diretora de Estudos, Carga horária: 44

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2008 - Atual Vínculo: Outro (especifique), Enquadramento funcional: Doutoranda

Atividades

08/2008 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica
Linhas de pesquisa:
Reparação de DNA e mutagênese em células eucarióticas

3. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI

Vínculo institucional

2012 - 2012 Vínculo: Professor, Enquadramento funcional: Professor de Genética Humana , Carga horária: 5

4. Escola Estadual de Ensino Médio e Fundamental Santa Catarina - EEEMFSC

Vínculo institucional

2005 - 2005 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Professor de Biologia , Carga horária: 10

5. Universidade de Caxias do Sul - UCS

Vínculo institucional

2005 - 2007	Vínculo: Bolsista CAPES , Enquadramento funcional: Bolsista de mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
2000 - 2004	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

10/2005 - 10/2007	Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biotecnologia <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Estresse Oxidativo e Antioxidantes</i>
01/2005 - 09/2005	Estágio, Instituto de Biotecnologia <i>Estágio:</i> <i>Laboratório de Genética Toxicológica</i>
08/2001 - 07/2004	Estágio, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes <i>Estágio:</i> <i>Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq</i>
09/2000 - 02/2001	Estágio, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes <i>Estágio:</i> <i>Bolsista de Iniciação Científica FAPERGS</i>
02/2000 - 12/2004	Pesquisa e Desenvolvimento, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão, Instituto de Biotecnologia <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Toxicologia Genética e Ambiental e Reparação de DNA</i>

Projetos

Projetos de pesquisa

2009 - Atual	Estudo dos mecanismos de reparação de DNA em células tumorais humanas associadas à ação citotóxica e genotóxica de drogas quimioterápicas Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Integrantes: Diana Lilian Bordin João Antônio Pegas Henriques (Responsável)
2008 - Atual	Mecanismos de Reparação de DNA de lesões genotóxicas induzidas por agentes físicos e antineoplásicos Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa Alunos envolvidos: Doutorado (1); Integrantes: Diana Lilian Bordin João Antonio Pegas Henriques (Responsável)
2005 - 2007	Avaliação da genotoxicidade e estresse oxidativo induzidos por herbicidas em planárias e escargots

Descrição: Este trabalho tem como objetivo avaliar a genotoxicidade e os níveis de estresse oxidativo em planárias da espécie *Dugesia schubartti* e escargots da espécie *Helix aspersa* tratados com diferentes formulações do herbicida glifosato e paraquat.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (2); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Diana Lilian Bordin Mirian Salvador; Bernardo Erdtmann (Responsável); João Antônio Pegas Henriques; Deise Rech dos Santos; Sandra Santos

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPEs, Universidade de Caxias do Sul-UCS

2003 - 2005 Efeitos da isquemia hepática pré-condicionada nas lesões de preservação-reperfusão: estudo experimental em porcos

Descrição: O objetivo deste projeto foi avaliar o estresse oxidativo em porcos que sofreram isquemia e reperfusão hepática recebendo um pré-condicionamento ou a administração de L-arginina.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (1);

Integrantes: Diana Lilian Bordin Mirian Salvador; Rafael Giovenardi (Responsável)

Financiador(es): Universidade de Caxias do Sul-UCS

2000 - 2004 Avaliação do estresse oxidativo em produtores rurais

Descrição: Projeto realizado em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);

Integrantes: Diana Lilian Bordin Mirian Salvador (Responsável); Ana Cristina Andreazza; Juliana da Silva; Bernardo Erdtmann; João Antônio Pegas Henriques

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Bertholdo-Vargas, L., Martinsa, J.N., **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian, Schafer A.E., Barros, N.M., Estirpe, F., Carlini, C.R.

Type 1 ribosome-inactivating proteins - Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology*. , v.55, p.51 - 58, 2009.

2. SALVADOR, Mirian, **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SILVA, Juliana da, HENRIQUES, João Antônio Pegas, ERDTMANN, Bernardo

Determination of oxidative stress markers and serum cholinesterase among pesticide sprinklers in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. , v.90, p.809 - 814, 2008.

3. SILVA, Juliana da, MORAES, Camila Rocha, HEUSER, Vanina, ANDRADE, Vanessa, SILVA, Fernanda, **BORDIN, D. L.**, KVIKTO, Kátia, EMMEL, Vanessa, ROHR, Paula, SALVADOR, Mirian, ANDREAZZA, Ana Cristina, HENRIQUES, Antonio Pegas, ERDTMANN, Bernardo

Genetic Damage in Brazilian Population Occupationally Exposed to Pesticides and Correlation with Polymorphisms in Metabolizing Genes. *Mutagenesis.* , v.23, p.415 - 422, 2008.

4. ANDREAZZA, Ana Cristina, **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian
THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES, SERIC SUPEROXIDE DISMUTASE AND CATALASE ACTIVITIES IN HEALTHY SUBJECTS. *Clinica Chimica Acta (Print).* , v.362, p.192 - 194, 2005.

Capítulos de livros publicados

1. **BORDIN, D. L.**, GARCEZ, M., SALVADOR, Mirian, PERES, Wiliam
Radicais Livres e Espécies Reativas In: *Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo.* 1 ed. Canoas : ULBRA, 2004, p. 13-33.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, HENRIQUES, J. A. P.
AUTOPHAGY ACTIVATION IN COLORECTAL CANCER CONTRIBUTE TO THE TOLERANCE OF OXALIPLATIN UNDER ENERGY STRESS CONDITIONS In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.
10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biolog. , 2012.

2. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, SOARES, D. G., Escargueil A, Larsen A, HENRIQUES, J. A. P.
Autophagy induction by oxaliplatin in colorectal cancer cells treated in energy stress conditions In: IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, 2012, Porto Alegre.
IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses. , 2012.

3. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, Escargueil A, SOARES, D. G., Larsen A, HENRIQUES, João Antônio Pegas
Autophagy induction by oxaliplatin in colorectal cancer cells treated in energy stress conditions In: Alexander Hollaender Course - Environmental genetics, epigenetics and genomic instability Capacity building on new analytical tools, 2012, Montevideo.
Alexander Hollaender Course - 2012. , 2012.

4. Lima M, **BORDIN, D. L.**, Lenz G, HENRIQUES, João Antônio Pegas
CELLULAR RESPONSE ANALYSIS IN COLORECTAL CANCER AND LUNG CANCER CELLS EXPOSED TO TREATMENT WITH PLATINUM AGENTS IN LOW GLUCOSE CONDITIONS In: Alexander Hollaender Course - Environmental genetics, epigenetics and genomic instability Capacity building on new analytical tools, 2012, Montevideo.
Alexander Hollaender Course - 2012. , 2012.

5. Lima M, **BORDIN, D. L.**, Lenz G, HENRIQUES, J. A. P.
CELLULAR RESPONSE ANALYSIS IN COLORECTAL CANCER AND LUNG CANCER CELLS EXPOSED TO TREATMENT WITH PLATINUM AGENTS IN LOW GLUCOSE CONDITIONS In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.
10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. , 2012.

6. Lima M, **BORDIN, D. L.**, Lenz G, HENRIQUES, Antonio Pegas
Cellular response analysis in colorectal cancer and lung cancer cells exposed to treatment with

platinum agents in low glucose conditions In: IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses, 2012, Porto Alegre.

IX Cell Stress Society International Workshop on the Molecular Biology of Stress Responses. , 2012.

7. CORTE, A. L. A., MILANO, L., Lima M, JUNCHEM, A., TRINDADE, C., MACHADO, M., **BORDIN, D. L.**, FILIPPI-CHIELA, E., Lenz G, PRA, D., HENRIQUES, J. A. P.

EVALUATION OF IRON SUPPLEMENTED MEDIA CULTURE IN THE CELLULAR VIABILITY AND GENOMIC STABILITY OF CELL LINES – MRC5 AND HEPG2 In: 10th International Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro.

10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biolog. , 2012.

8. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, Escargueil A, SOARES, D. G., Larsen A, HENRIQUES, J. A. P.

Avaliação da indução de autofagia por agentes alquilantes em linhagens de câncer colorretal em condições de estresse energético In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2011, Porto Alegre.

Anais da XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. , 2011.

9. Lima M, **BORDIN, D. L.**, Escargueil A, SOARES, D. G., Lenz G, Larsen A, HENRIQUES, J. A. P.

Cellular response analysis in colorectal cancer cell lines induced by alkylating agents in energetic stress conditions In: XXVI Reunião Anual FESBE 2011, 2011, Rio de Janeiro.

Anais da XXVI Reunião Anual FESBE 2011. , 2011.

10. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, Escargueil A, SOARES, D. G., Larsen A, HENRIQUES, J. A. P.

Avaliação da resposta celular em linhagens de câncer colorretal induzida por agentes alquilantes In: X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2010, Porto Alegre.

Anais do X Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS. , 2010.

11. Bertholdo-Vargas, L., Martinsa, J.N., **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian, Schafer A.E., Barros, N.M., Barbieri, L., Estirpe, F., Carlini, C.R.

Anicarsia gemmatilis (HUBNER) y Spodoptera frugierda (JE SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) Susceptibles a las proteínas inactivadoras de ribosomas del tipo 1 In: 2° Simposio Chileno de Control Biológico, 2009, Chllán.

2° Simposio Chileno de Control Biológico. , 2009. p.68 - 68

12. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, Escargueil A, SOARES, D. G., Larsen A, HENRIQUES, Antonio Pegas

Efeito dos agentes antineoplásicos oxaliplatina e cisplatina em linhagens de câncer colo-retal expostas a diferentes concentrações de glicose In: XI Reunião Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

Livro de Resumos PPGBCM. , 2009. p.30 - 30

13. Lima M, **BORDIN, D. L.**, Lenz G, SOARES, D. G., Escargueil A, Larsen A, HENRIQUES, Antonio Pegas

Efeito dos agentes antineoplásicos oxaliplatina e cisplatina em linhagens de câncer colo-retal expostas a diferentes concentrações de glicose In: XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2009, Porto Alegre.

Anais do XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2009.

14. **BORDIN, D. L.**, Lima M, Lenz G, SOARES, D. G., Larsen A, Escargueil A, HENRIQUES, J. A.

P.

Effect of antineoplastic agents oxaliplatin and cisplatin in colorectal cancer cell lines exposed to different concentrations of glucose In: IX Congresso Brasileiro da SBMCTA, 2009, Ouro Preto.

Anais do IX Congresso Brasileiro da SBMCTA. , 2009.

15. Bertholdo-Vargas, L., Martinsa, J.N., **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian, Schafer A.E., Barros, N.M., Barbiere, L., Estirpe, F., Carlini, C.R.

Lesões de DNA e estresse oxidativo em lepidópteros ocasionados por RIPs do tipo 1 In: XI Simpósio de Controle Biológico, 2009, Bento Gonçalves.

SINCONBIOL. , 2009.

16. Bertholdo-Vargas, L., Martinsa, J.N., **BORDIN, D. L.**, Estirpe, F., SALVADOR, Mirian, Barros, N.M., Carlini, C.R.

Atividade entomotóxica, estresse oxidativo e genotoxicidade em *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* por RIPs do tipo 1 In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre.

IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. , 2007.

17. **BORDIN, D. L.**, SANTOS, Deise Rech dos, SALVADOR, Mirian, ERDTMANN, Bernardo
Genotoxicity and oxidative stress in planarians (*Dugesia schubarti*) exposed to different formulations of herbicide glyphosate In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007, Uruguai.

Free Radical in Montevideo 2007. , 2007.

18. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SALVADOR, Mirian

Atividade de Enzimas Antioxidantes e Inibição de Colinesterase Sérica em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: XII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2004, Caxias do Sul.

Anais do XII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. , 2004.

19. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SALVADOR, Mirian

Marcadores de Estresse Oxidativo em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: V Simpósio de Ciência e Tecnologia da UCS, 2004, Caxias do Sul.

Anais do V Simpósio de Ciência e Tecnologia da UCS. , 2004.

20. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SALVADOR, Mirian

Oxidative Stress Markers (TBARS, SOD and CAT) in healthy people from Rio Grande do Sul In: Workshop em Estresse Oxidativo, 2004, Rio de Janeiro.

Workshop em Estresse Oxidativo. , 2004.

21. **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian, ANDREAZZA, Ana Cristina

Determinação dos Níveis de Estresse Oxidativo e Enzimas Antioxidantes Endógenas em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: XI Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2003, Caxias do Sul.

Anais do XI Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. , 2003.

22. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SANTA, P. D., SALVADOR, Mirian, SOARES, D. G.

Avaliação de Compostos com Atividade Antioxidante em Células Eucarióticas In: 10º Congresso Científico Internacional de Estética, 2002, Rio de Janeiro.

. , 2002.

23. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SALVADOR, Mirian

Estresse Oxidativo e Determinação de Colinesterase Sérica em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: X Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2002, Caxias do Sul.

. , 2002.

24. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SALVADOR, Mirian

Estresse Oxidativo e Determinação de Enzimas Atioxidante Endógenas em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: XIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2002, Porto Alegre.

. , 2002.

25. **BORDIN, D. L.**, ANDREAZZA, Ana Cristina, SALVADOR, Mirian, SILVA, Juliana da, SAFFI, J., ERDTMAN, B., HENRIQUES, J. A. P.

Utilização de Pesticidas Organofosforados e Carbamatos por Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: IX Congresso Catarinense de Farmacêutico e Bioquímicos-FARMÁPOLIS, 2002, Florianópolis.

. , 2002.

26. **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian

Análises Químico-clínicas em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul: Correlação Entre o Uso de Agrotóxicos, Inibição de Acetilcolinesterase Sérica e Estresse Oxidativo In: IX ENCONTRO DE JOVENS PESQUISADORES DA UCS, 2001, Caxias do Sul.

Anais do IX Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. , 2001. p.100 -

27. **BORDIN, D. L.**, SALVADOR, Mirian

Estresse Oxidativo em Produtores Rurais da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul In: XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2001, Porto Alegre.

XIII Salão de Iniciação Científica X Feira Universidade Federal do Rio Grande do Sul. , 2001.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **BORDIN, D. L.**

Curso de Férias UFRGS - 4º edição, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Iniciação científica

1. Malu Bettio Soares. **Indução de autofagia por agentes alquilantes em câncer colorretal**. 2012. Iniciação científica (Biologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2. Michelle de Souza Lima. **Avaliação da resposta celular em linhagens de câncer colorretal induzida por agentes alquilantes em condições de estresse energético**. 2010. Iniciação científica (Biologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul