

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE DE AUTOFAGIA PELA RAZÃO DE FLUORESCÊNCIAS DO
MARCADOR LARANJA DE ACRIDINA

MARCOS PAULO THOMÉ
ORIENTADOR: Dr. GUIDO LENZ

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2015

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

ANÁLISE DE AUTOFAGIA PELA RAZÃO DE FLUORESCÊNCIAS DO
MARCADOR LARANJA DE ACRIDINA

Dissertação de mestrado
apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como
requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre

MARCOS PAULO THOMÉ

ORIENTADOR: Dr. GUIDO LENZ

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Tânia (*in memoriam*),
pelo exemplo de força e persistência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade, por ter dado suporte a minha formação;

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo financiamento;

Aos funcionários e professores do PPGBCM, em especial Sílvia e Luciano pela prontidão;

Aos colegas e ex-colegas de laboratório pelo apoio, discussões e ensinamentos. Agradecimento especial aos que tornam o ambiente de trabalho prazeroso e divertido.

Celina, pelo apoio na realização de experimentos, Giovana pela colaboração com resultados, Emilly por facilitar o trabalho viabilizando questões burocráticas;

À Priscila Vianna, pela disponibilidade e prontidão para a realização dos experimentos de FACS;

Ao Eduardo, por ter participado desde o início na minha formação científica e continuar participando;

Ao professor e orientador Guido, pela oportunidade, confiança e pela presença fundamental durante estes cinco anos;

Pela amizade sincera e companheirismo, Magnus e Flávio. Alexandra, pelo bom humor contagiante. Karina, pela grande amizade e presença diária;

Ao meu pai, Ademir, e minha irmã, Franciele, pelo apoio, confiança e suporte;

À minha mãe, Tânia (*in memoriam*), a quem devo os sentimentos mais sinceros de gratidão e admiração.

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	<u>5</u>
<u>2</u>	<u>RESUMO</u>	<u>6</u>
<u>3</u>	<u>ABSTRACT</u>	<u>7</u>
<u>4</u>	<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	<u>8</u>
4.1	MICROAUTOFAGIA	10
4.2	AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS	10
4.3	MACROAUTOFAGIA	11
4.3.1	PROGRESSÃO MORFOLÓGICA	11
4.3.2	MAQUINARIA MOLECULAR CENTRAL	15
4.3.3	REGULAÇÃO	25
4.3.4	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE AUTOFAGIA	26
4.3.5	LARANJA DE ACRIDINA	32
<u>5</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>34</u>
<u>6</u>	<u>ARTIGO CIENTÍFICO</u>	<u>35</u>
<u>7</u>	<u>RESULTADOS ADICIONAIS</u>	<u>54</u>
<u>8</u>	<u>DISCUSSÃO</u>	<u>58</u>
<u>9</u>	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>60</u>
<u>10</u>	<u>CURRÍCULO</u>	<u>64</u>

1 Lista de abreviaturas

AMPK – Proteína cinase ativada por AMP (*AMP-activated Protein Kinase*)

AO – Laranja de acridina (*Acridine Orange*)

ATG – Proteína relacionada a autofagia (*Autophagy-related protein*)

AVOs – Organelas vesiculares acídicas (*Acidic Vesicular Organelles*)

Baf A1 – Bafilomicina A1 (*Bafilomycin A1*)

BECN1 – Beclina-1 (*Beclin-1*)

CMA – Autofagia mediada por chaperonas (*Chaperone-mediated autophagy*)

FACS – Separação de células ativada por fluorescência (*Fluorescence activated cell sorting*)

GFP – Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)

LC3 – Cadeia leve 3 da proteína associadas a microtúbulos 1A/1B (*MAP1LC3 – Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3*)

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

mTOR – Proteína alvo de rapamicina em mamíferos (*mammalian Target of Rapamycin*)

MTORC1/2 – mTOR complexo 1/2 (*mTOR Complex 1/2*)

PAS – Sítio de montagem do fagóforo ou estrutura pré-autofagossomal (*Phagophore Assembly Site or Pre-Autophagosomal Structure*)

PtdIns3K/PI3K – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*)

Rapa – Rapamicina (*Rapamycin*)

SQSTM1/p62 – Sequestossomo 1 (*Sequestosome 1*)

TMZ – Temozolomida (*Temozolomide*)

Ubl – Semelhante a ubiquitina (*Ubiquitin-like*)

ULK1 – Cinase 1 semelhante à unc-51 (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*)

2 Resumo

A autofagia é um processo dinâmico de degradação de componentes celulares e está reconhecidamente envolvida em processos fisiológicos e patológicos. Por isso, uma melhor compreensão do processo autofágico é necessária para permitir sua manipulação em intervenções terapêuticas. Vários métodos têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados para a determinação de diversos aspectos do processo autofágico, porém a falta de ensaios quantitativos rápidos pode prejudicar o desenvolvimento de terapias tendo a autofagia como alvo. O marcador laranja de acridina (AO) é um fluoróforo metacromático que fluoresce vermelho em organelas vesiculares ácidas (AVOs) e verde no restante da célula, sendo assim, a marcação com AO um método rápido e barato para detecção deste tipo de organelas, que aumentam durante a indução de autofagia. Entretanto, a especificidade da marcação com AO para quantificação de autofagia tem sido questionada. Desse modo, desenvolvemos uma nova abordagem para sua análise, considerando a razão de fluorescências verde e vermelha obtida a partir de citometria de fluxo. Com essa abordagem para análise de dados de marcação com AO foi possível detectar o aumento de autofagia induzido por rapamicina, e também o bloqueio pelo inibidor de acidificação lisossomal bafilomicina A1 bem como pelo silenciamento de genes da maquinaria molecular central que controlam a autofagia em diferentes etapas. Em comparação com a forma mais comum de analisar dados de AO, que considera somente a fluorescência vermelha, os resultados obtidos com a forma de análise proposta nesse trabalho tiveram uma melhor correlação com outros métodos bem estabelecidos para quantificação de autofagia, como conversão de LC3-I/II, degradação de SQSTM1/p62 e ensaio de formação de pontos de GFP-LC3. Essa nova maneira de analisar dados da marcação com AO pode permitir que este método fácil seja utilizado como uma abordagem inicial e objetiva para a avaliação de um passo tardio do processo autofágico em células individuais, complementando a utilização de outros métodos.

3 Abstract

Autophagy is a dynamic process of degradation of cellular components that is involved in developmental processes and various diseases. Therefore, a better understanding of autophagy is needed to allow its manipulation for therapeutic purposes. Several methods have been developed and extensively employed in determining various aspects of the autophagic process, but the lack of rapid and quantitative autophagy assays has impaired the development of autophagy-targeting therapies. Acridine orange (AO) is a cell permeable metachromatic fluorophore that fluoresces red in Acidic Vesicular Organelles (AVOs) and green in the remaining of the cell. Therefore, AO staining is a fast and cheap method to assess AVO mass in a cell, which increases upon autophagy induction. Since the specificity of AO staining for measuring autophagy has been questioned, we developed a ratiometric analysis of autophagy, considering the red-to-green fluorescence ratio to quantify data obtained from AO flow cytometry. This method measured with accuracy the increase in autophagy induced by rapamycin, which was blocked by the lysosome acidification inhibitor bafilomycin A1 as well as stable knockdown of genes that regulate different steps in the autophagy pathway. In comparison to the most-commonly used threshold, that considers only the absolute red fluorescence, the results obtained with our proposed threshold setting had higher correlation with well-established specific methods for autophagy quantification, such as LC3-I to LC3-II conversion, SQSTM1 degradation and GFP-LC3 puncta formation assay. This new way of AO data analysis will allow this simple assay to be used as an initial and objective method for evaluating the late step of the autophagic process in individual cells, complementing other methods.

4 Introdução geral

Autofagia, cujo significado literal é autodigestão, é um processo de catabolismo e reciclagem celular altamente conservado entre os eucariotos. À primeira vista, parece surpreendente como um processo celular de autodigestão poderia ser benéfico, porém é um mecanismo de adaptação a situações de estresse em que a célula é forçada a degradar seu próprio conteúdo para permanecer viva até que a situação retorne a normalidade. Em eucariotos unicelulares, como leveduras, essa resposta a privação de nutrientes é uma das funções primordiais da autofagia, e essa regra se estende também para humanos. Em situações diárias a autofagia é ativada em períodos de jejum, por exemplo em órgãos como o fígado, para manter as funções metabólicas, fornecendo aminoácidos e energia através do catabolismo (Mizushima e Klionsky, 2007). Além disso, desempenha papel fundamental durante o período neonatal inicial, onde o suprimento de nutrientes através da placenta é rompido até o momento em que é reestabelecido através do aleitamento (Kuma *et al.*, 2004).

Dada a importância da autofagia em mamíferos durante o desenvolvimento embrionário, neonatal e na diferenciação, a deleção sistêmica de genes ATG em camundongos pode apresentar vários fenótipos, que vão desde maior suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores até letalidade (Tabela 1) (Mizushima e Levine, 2010).

Tabela 1 – Fenótipos da deleção sistêmica de genes relacionados à autofagia em camundongos. gt: gene-trapped allele (Mizushima e Levine, 2010).

Genes	Fenótipo
Atg3 ^{-/-} , Atg5 ^{-/-} , Atg7 ^{-/-} , Atg9 ^{-/-} , Atg16L1 ^{-/-}	Letal no período neonatal com redução dos níveis de aminoácidos
beclina 1 ^{-/-}	Letal no período embrionário inicial com defeito no fechamento do canal proamniótico. Heterozigotos apresentam maior suscetibilidade a tumores espontâneos
FIP200 ^{-/-}	Letal no período embrionário por malformação cardíaca e hepática
Ambra1 ^{gt/gt}	Letal no período embrionário por defeitos no desenvolvimento do tubo neural
ULK1 ^{-/-}	Aumento do número de reticulócitos com remoção mitocondrial atrasada
Atg4C ^{-/-}	Viáveis, férteis, suscetibilidade aumentada a fibrosarcoma induzida por carcinógeno
LC3B ^{-/-}	Fenótipo normal
GABARAP ^{-/-}	Fenótipo normal

O nível basal de autofagia é importante para a manutenção da homeostase celular. Porém a capacidade da autofagia de degradação em grande escala apresenta certo risco porque, se desregulada, pode ser letal. Por isso, é importante sua forte regulação para que seja estimulada somente quando necessária, visto que sua ausência ou excesso pode ser prejudicial, configurando seu duplo papel na citoproteção ou toxicidade.

Em células de mamíferos existem três tipos básicos de autofagia: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA), morfologicamente distintas mas todas resultando na degradação e reciclagem do conteúdo pela via lisossomal (Fig. 1).

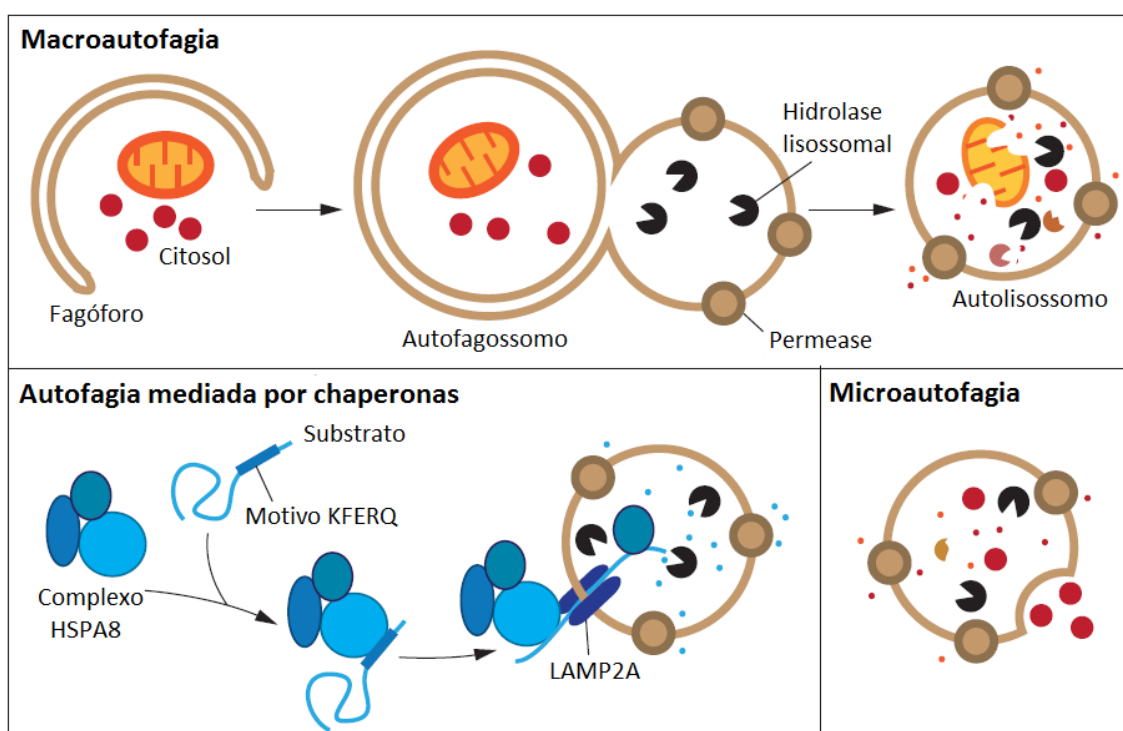


Figura 1 – Três tipos de autofagia em células de mamíferos. Macroautofagia depende da formação de uma vesícula de dupla membrana, o autofagossomo, que isola o conteúdo a ser degradado pela via lisossomal. Autofagia mediada por chaperonas ocorre o transporte de proteínas individuais diretamente através da membrana do lisossomo. Microautofagia envolve a captação direta do conteúdo através da invaginação da membrana lisossomal. Em todos os casos ocorre a degradação do conteúdo e liberação dos produtos para reutilização no citosol. Adaptada de (Parzych e Klionsky, 2014).

4.1 Microautofagia

A microautofagia se refere ao processo pelo qual o conteúdo citoplasmático entra no lisossomo através de uma invaginação ou protrusão da membrana dessa organela (Santambrogio e Cuervo, 2011). O catabolismo mediado por microautofagia pode ser seletivo ou não. Na forma não seletiva, está envolvida a degradação de porções aleatórias do citoplasma e de organelas, enquanto que na forma seletiva ocorre a degradação de organelas específicas, sendo já descritas micromitofagia (para mitocôndrias), micronucleofagia (núcleo) ou micropexofagia (peroxissomos) (Mijaljica *et al.*, 2011).

Quase todas as análises de microautofagia são baseadas em análises morfológicas por microscopia eletrônica e, devido ao número limitado de ferramentas para análise, ainda se compreende pouco sobre este processo e seu possível envolvimento em doenças.

4.2 Autofagia mediada por chaperonas

Diferente da microautofagia e macroautofagia, que podem degradar porções citoplasmáticas inespecificamente, a autofagia mediada por chaperonas (CMA) é altamente específica. A CMA é responsável pela degradação de 30% das proteínas citosólicas durante situação prolongada de privação de nutrientes (Dice, 2007).

O motivo contendo o pentapeptídeo KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) é comum a todos os substratos da CMA (Dice, 1990). Proteínas alvo contendo esse motivo são desdobradas pela ação de chaperonas citosólicas e translocadas diretamente através da membrana do lisossomo onde, no lúmen, ocorre a degradação (Dice, 2007). Por esta via são degradados vários substratos, incluindo enzimas glicolíticas, fatores de transcrição e seus inibidores, proteínas ligadoras de cálcio e lipídeos, subunidades do proteassoma e proteínas envolvidas no tráfego de vesículas (Arias e Cuervo, 2011).

Durante a CMA, o motivo KFERQ é reconhecido por um complexo formado com a proteína de choque térmico 8 (HSPA8/HSC70) e outras chaperonas (Fig. 1). A HSPA8

transporta o substrato até a membrana do lisossomo onde ocorre o seu desdobramento e ligação a monômeros do receptor LAMP2A (proteína associada a membrana do lisossomo 2A). Essa ligação substrato-receptor leva à multimerização de LAMP2A e, assim que esse complexo translocador é formado, a subunidade do complexo voltada para o lúmen do lisossomo é estabilizada pela HSP90 e ocorre o processo de translocação do substrato para degradação por enzimas lisossomais. Assim que a translocação é completada, LAMP2A volta ao seu estado monomérico podendo se ligar a um novo substrato e reiniciar outro ciclo.

A regulação do processo de translocação está na ligação do substrato a LAMP2A, que é a etapa limitante da CMA.

4.3 Macroautofagia

Em contraste com a microautofagia e CMA, na macroautofagia (a partir daqui referida como autofagia) o isolamento inicial do substrato ocorre fora do lisossomo e, neste caso, ocorre a síntese *de novo* de vesículas de membrana dupla – autofagossomos – para isolar o substrato e subsequentemente transportar até o lisossomo (Yang e Klionsky, 2010). Ocorre em um nível basal constitutivo e pode ser induzida em situações de estresse, como em privação de nutrientes ou energia, a fim de degradar parte do material citoplasmático em metabólitos utilizáveis em processos biossintéticos, permitindo a sobrevivência da célula. Assim, a autofagia é principalmente um mecanismo citoprotetor, no entanto sua indução excessiva pode ser prejudicial.

4.3.1 Progressão morfológica

A característica morfológica que torna a autofagia única e a distingue de outros processos de tráfego de vesículas é que aqui estas vesículas, denominadas autofagossomos, são sintetizadas *de novo* ao invés de brotamento de membranas (Yang e Klionsky, 2009). A origem desta membrana ainda é questão de debate e várias

fontes já foram mostradas, como mitocôndrias, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, endossomos e membrana plasmática (Tooze e Yoshimori, 2010; Yamamoto *et al.*, 2012; Hamasaki *et al.*, 2013; Puri *et al.*, 2013). A Figura 2 ilustra um modelo da formação do autofagossomo a partir do sítio de montagem do fagóforo (PAS). O PAS, melhor compreendido em leveduras, é um sítio perivacuolar definido, em parte, onde residem as proteínas Atg, as proteínas principais que controlam o processo autofágico. Em mamíferos, ao contrário, a formação do autofagossomo não ocorre em um único PAS, mas sim em múltiplos sítios onde localizam as proteínas Atg, possivelmente correspondendo a múltiplos PAS. É sugerido que o PAS serve para facilitar a etapa de nucleação e expansão do fagóforo, o precursor do autofagossomo, através do recrutamento das proteínas Atg (Itakura e Mizushima, 2010).

A partir da etapa de iniciação, a membrana começa a expandir formando um compartimento de membrana dupla que isola o substrato a ser degradado. A origem da membrana que forma o fagóforo é questão de debate, mas vários estudos sugerem como possível fonte a membrana plasmática (Ravikumar *et al.*, 2010), retículo endoplasmático (Ylä-Anttila *et al.*, 2009), complexo de Golgi (Takahashi *et al.*, 2011) ou mitocôndrias (Hailey *et al.*, 2010).

A medida que o fagóforo expande ocorre o recrutamento de proteínas Atg, a citar Atg9, complexo Atg12-Atg5-Atg16 e o complexo PtdIns3K que promovem a inserção da proteína LC3 na membrana do fagóforo (homólogo de Atg8 em leveduras), que vai gerar a curvatura na membrana da vesícula para, em última análise, formar o autofagossomo esférico (Mijaljica *et al.*, 2012), conforme ilustrado na Figura 2.

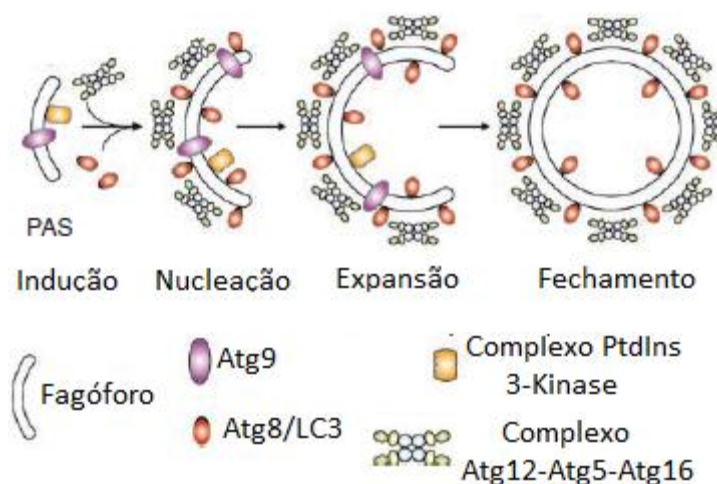


Figura 2 – Ilustração esquemática da formação do autofagossomo. O PAS serve para facilitar a nucleação e expansão do fagóforo, o precursor do autofagossomo, através do recrutamento de proteínas Atg. Atg9 e o complexo PtdIns3K são recrutados relativamente cedo ao PAS e atuam na fase de nucleação. Subsequentemente são recrutados o complexo Atg12-Atg5-Atg16 e LC3/Atg8 que participam na expansão do fagóforo e formação do autofagossomo. Após o fechamento do autofagossomo ocorre a dissociação desses componentes da membrana da vesícula. Adaptada de (Yang e Klionsky, 2009).

Em células de mamíferos, assim que o autofagossomo esteja formado pode acontecer a entrega do substrato ao lisossomo (Fig. 3). Quando o autofagossomo encontra o seu destino, a membrana externa funde com a membrana lisossomal formando o autolisossomo. O conteúdo é exposto ao lúmen ácido desta organela e a ação de hidrolases promove a degradação do substrato e da membrana interna do autolisossomo. Os produtos de degradação são exportados de volta ao citoplasma através de permeases lisossomais.

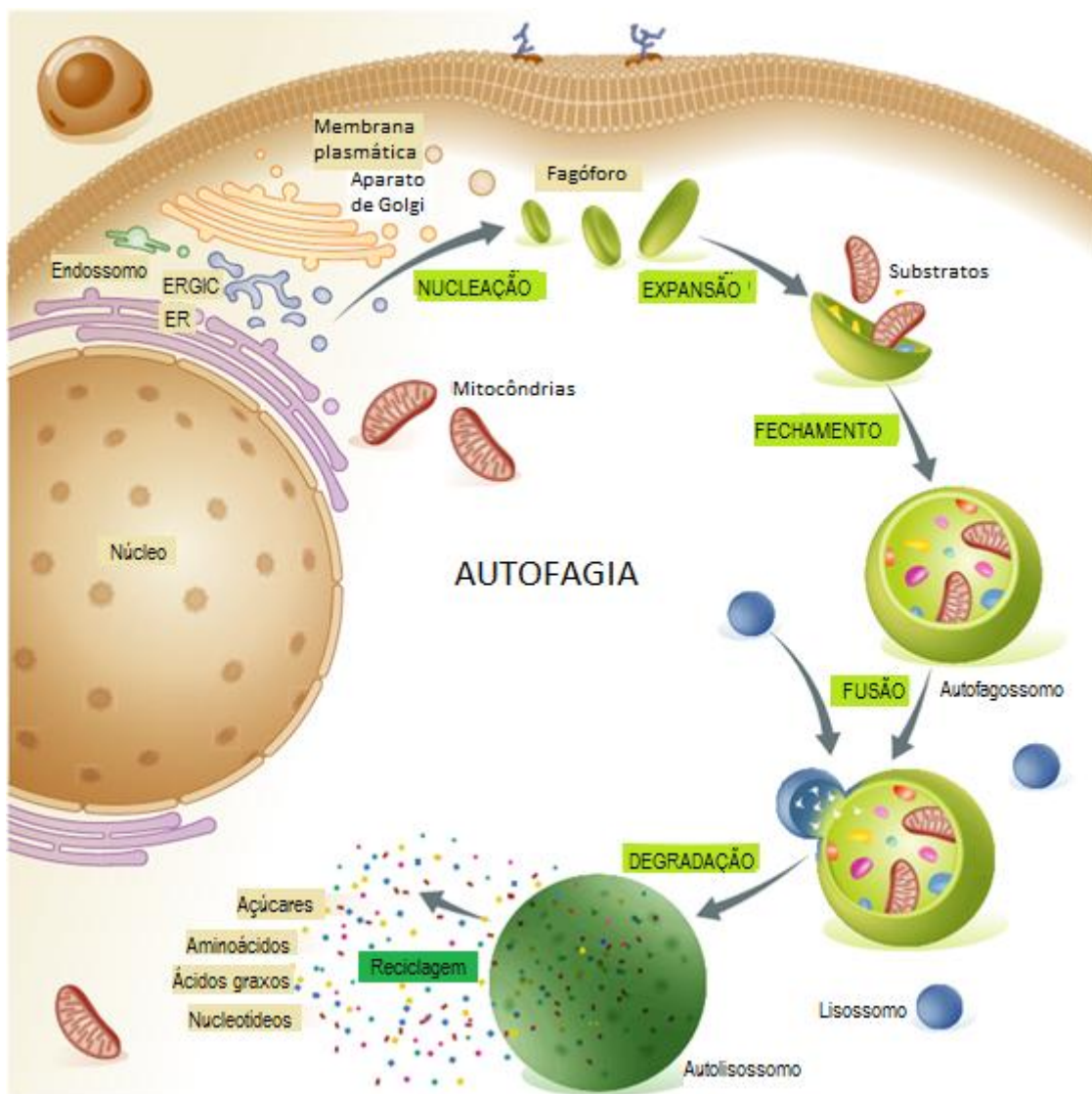


Figura 3 – Organização geral do processo autofágico. A autofagia inicia com a captura do material citoplasmático por uma vesícula de membrana dupla chamada de fagóforo ou membrana de isolamento. A membrana para a formação da vesícula pode ter origem do retículo endoplasmático (ER), aparelho de Golgi, compartimento intermediário Golgi-ER (ERGIC), membrana plasmática ou mitocondrias. Com o fechamento do fagóforo, é formado o autofagossomo que funde posteriormente com o lisossomo formando o autolisossomo. A ação de hidrolases lisossomais promove a degradação do substrato e os produtos dessa reação catabólica voltam para o citosol através de transportadores da membrana lisossomal para serem reutilizados em vias anabólicas ou bioenergéticas. Adaptada de (Galluzzi *et al.*, 2015).

4.3.2 Maquinaria molecular central

A transição de estudos morfológicos da autofagia para uma abordagem da maquinaria molecular foi possível a partir da identificação dos genes relacionados à autofagia (genes ATG) inicialmente em leveduras e posteriormente em eucariotos superiores (Yang e Klionsky, 2009). Dentre as proteínas Atg, um subgrupo de aproximadamente 18 é essencial para a formação do autofagossomo e é referido como '*core molecular machinery*' (Tabela 2), aqui referido como maquinaria molecular central. Nas próximas sessões será enfatizado a sinalização e regulação em células de mamíferos complementando, quando necessário, o processo em leveduras.

Dentre as proteínas Atg que participam da maquinaria molecular central da autofagia, pode-se dividir em quatro subgrupos: primeiro, o complexo Atg1/ULK; segundo, dois sistemas de conjugação 'ubiquitin-like' (Atg12 e Atg8/LC3); terceiro, o complexo fosfatidilinositol 3-cinase classe III (PtdIns3K)/Vps34; e quarto, a proteína transmembrana, Atg9/mAtg9 (e proteínas associadas envolvidas no seu movimento). O sítio onde ocorre a formação do autofagossomo e o recrutamento da maioria das proteínas Atg é o sítio de montagem do fagóforo (PAS), conforme já descrito.

Tabela 2 – Maquinaria molecular central da autofagia. Descrição das proteínas fundamentais no processo autofágico em leveduras e, quando existente, seus homólogos em células de mamíferos com suas respectivas características e funções.

	Levedura	Mamíferos	Características e funções
Complexo Atg1/ULK	Atg1	ULK1/2	Ser/Thr proteína cinase; fosforilada por M/TORC1; recrutamento de proteínas Atg ao PAS
	Atg13	ATG13	Subunidade regulatória através da fosforilação por M/TORC1 e/ou PKA. Ligação entre Atg1 e Atg17
	Atg17	RB1CC1/FIP200 (homólogo funcional)	Proteína de arcabouço para ULK1/2 e ATG13. Fosforilada por ULK1
	Atg29		Complexo ternário com Atg17 e Atg31
	Atg31		Complexo ternário com Atg17 e Atg29
	Atg11		Proteína de arcabouço na autofagia seletiva para organização do PAS
		C12orf44/ATG101	Componente do complexo com ATG13 e RB1CC1
Complexo Atg9	Atg2	ATG2	Interage com Atg18
	Atg9	ATG9A/B	Proteína transmembrana, direciona membrana ao fagóforo
	Atg18	WIPI1/2	Proteína ligadora de PtdIns3P
Complexo PtdIns3K	Vps34	PIK3C3/VPS34	PtdIns 3-cinase
	Vps15	PIK3R4/VPS15	Ser/Thr proteína cinase
	Vps30/Atg6	BECN1	Componente do complexo PtdIns3K classe I e II
	Atg14	ATG14	Componente do complexo PtdIns3K classe I
Sistema de conjugação Ubl de Atg8	Atg8	LC3A/B/C, GABARAP, GABARAPL1/2	Ubl, conjugada ao fosfolípido PE
	Atg7	ATG7	Enzima 'E1-like'
	Atg3	ATG3	Enzima 'E2-like'
	Atg4	ATG4A/B/C/D	Enzima desconjugadora, cisteína proteinase
Sistema de conjugação Ubl de Atg12	Atg12	ATG12	Ubl
	Atg7	ATG7	Enzima 'E1-like'
	Atg10	ATG10	Enzima 'E2-like'
	Atg16	ATG16L1	Interage com Atg5 e Atg12
	Atg5	ATG5	Conjugada a Atg12

Atg (Proteína relacionada a autofagia); PE (fosfatidiletanolamina); PtdIns3k (Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase); Ubl (semelhante a ubiquitina); ULK (Cinase 1 semelhante à unc-51); WIPI (domínio de repetição WD da proteína de interação com fosfoinosítido).

4.3.2.1 Complexo ULK1/2

O complexo ULK inclui ULK1/2, ATG13, RB1CC1/FIP200 e C12orf44/ATG101 (Hosokawa *et al.*, 2009), (Mizushima, 2010). ULK1/2 interage com ATG13, que se liga diretamente a FIP200. ULK1 e ULK2 são as únicas ser/thr cinases envolvidas na maquinaria da autofagia. A formação deste complexo é independente do estado nutricional da célula e vários eventos de fosforilação regulam sua atividade (Russell *et al.*, 2014); (Feng *et al.*, 2014).

A Figura 4 apresenta os possíveis estados de fosforilação do complexo ULK, de acordo com a disponibilidade de nutrientes, e a influência sobre a autofagia. A cinase ULK1 pode ser ativada pela proteína cinase ativada por AMP (AMPK), que atua como sensor do nível de energia intracelular, ou em processo independente de AMPK, como em privação de aminoácidos através de mTOR. Sob privação de glicose, AMPK inibe mTORC1, o que promove ausência de fosforilação da Ser 757 de Ulk, permitindo a interação Ulk1 – AMPK. AMPK então fosforila Ulk1 na Ser 317 e Ser 777, ativando a cinase Ulk, provocando indução de autofagia (Kim *et al.*, 2011).

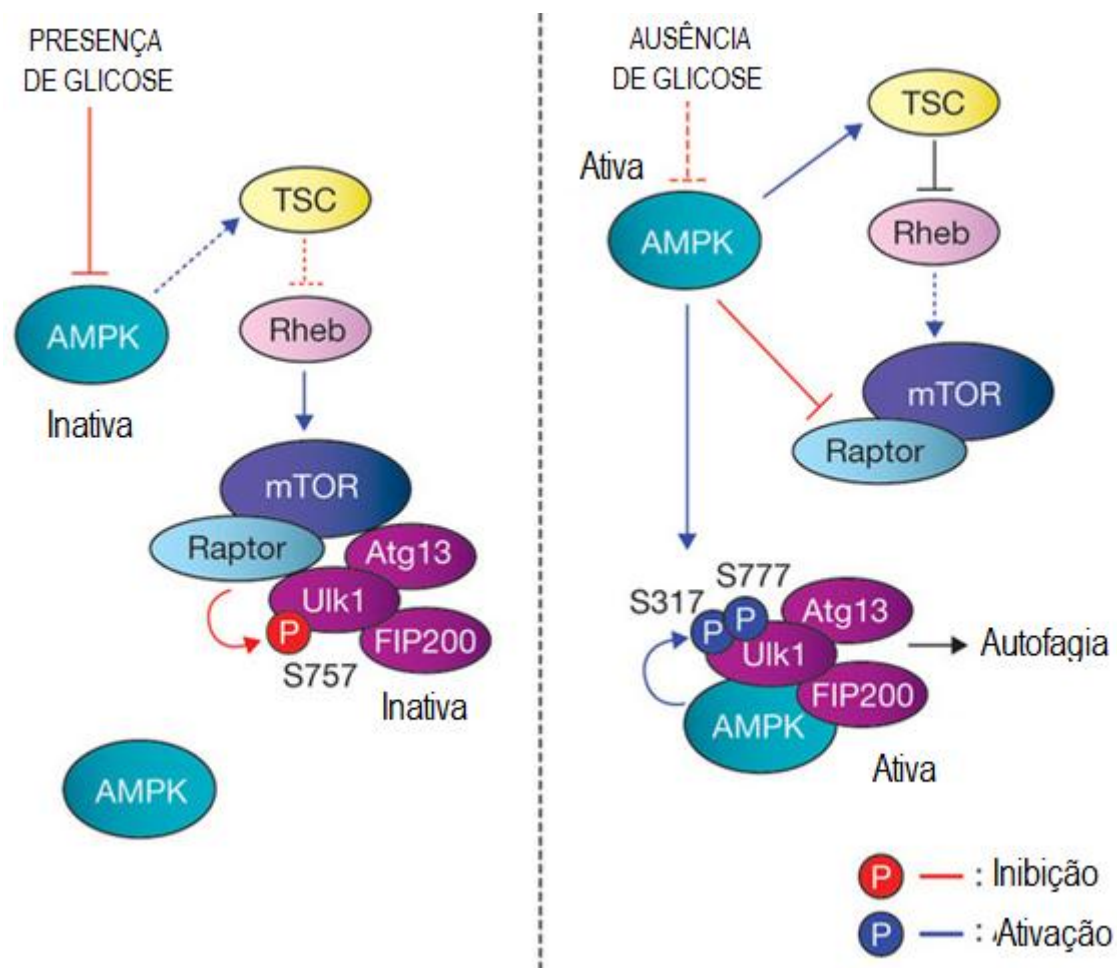


Figura 4 – Modelo da regulação de Ulk por AMPK e mTORC1 em resposta aos níveis de glicose. Esquerda: quando o nível de glicose é suficiente, AMPK está inativa e mTORC1 está ativa. mTORC1 fosforila Ulk1 na Ser 757 para prevenir sua interação e ativação por AMPK. Direita: quando o nível de energia celular está limitado, AMPK está ativada e promovendo a inibição de mTORC1 através da fosforilação de TSC2 e Raptor. A fosforilação da Ser 757 de Ulk está diminuída e esta pode interagir com AMPK e ser ativada por fosforilação na Ser 317 e Ser 777. Ulk1 fosforilada por AMPK se torna ativa e pode iniciar a autofagia. (Kim *et al.*, 2011)

4.3.2.2 ATG9

Em células de leveduras, Atg9 é uma proteína transmembrana que transita entre o PAS e sítios periféricos, que são chamados de reservatórios de Atg9 e é proposto que é de onde provém a membrana para a formação do fagóforo, embora não seja compreendida a função exata da Atg9 neste processo (Mari *et al.*, 2010). A proteína Atg9 consiste de seis domínios transmembrana com ambos os domínios,

amino e carboxi-terminal, expostos ao citosol. O transporte de Atg9 dos sítios periféricos ao PAS é chamado de transporte anterógrado e é dependente de Atg11, Atg23 e Atg27. O retorno aos sítios periféricos é chamado transporte retrógrado e depende de Atg1-Atg13, Atg2 e Atg18 (Reggiori *et al.*, 2004). A exceção de Atg27, que é uma proteína transmembrana, os outros componentes envolvidos no transporte de Atg9 são solúveis ou associados transitoriamente a membranas periféricas (Fig. 5).

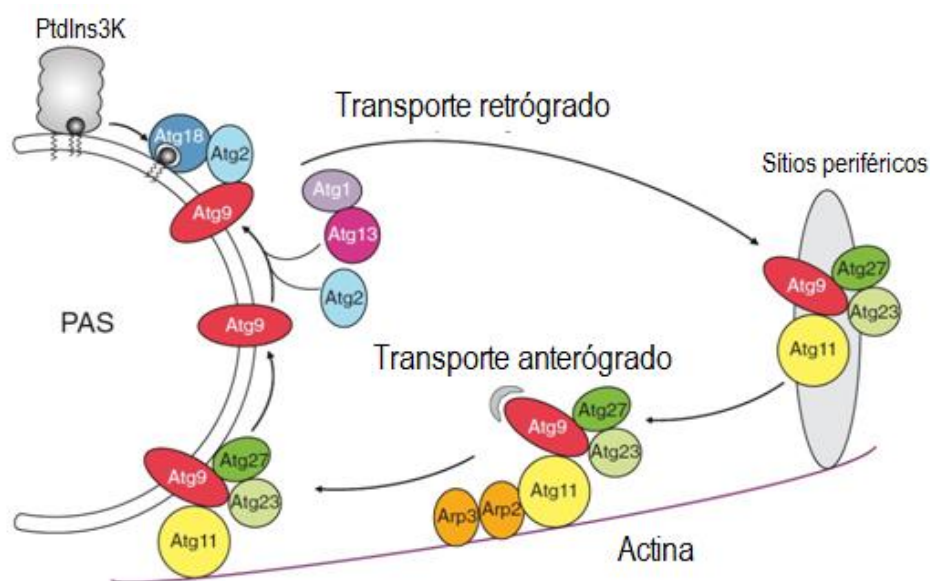


Figura 5 – Processo de ciclagem de Atg9 em leveduras. A proteína transmembrana Atg9 circula entre o PAS e sítios periféricos (alguns localizados adjacentes ou na superfície da membrana mitocondrial). O transporte anterógrado de Atg9 para o PAS requer Atg11, Atg23 e Atg27 e o citoesqueleto de actina. Atg9, Atg23 e Atg27 formam um complexo heterotrimérico e seu movimento ao PAS é interdependente. Atg11 atua como um adaptador entre Atg9 e os filamentos de actina e entre Atg9 e o complexo Arp2/3, de onde provém a força para movimentar o complexo das proteínas Atg e a membrana associada. O transporte retrógrado de Atg9 do PAS de volta aos sítios periféricos depende da atividade cinase do complexo Atg1-Atg13, Atg2, Atg18 e PtdIns3k complexo 1. Adaptada de (Yang e Klionsky, 2009).

Em células de mamíferos, baseado em dados de Atg9 de leveduras, é proposto que proteína homóloga ATG9A contribui para o fornecimento da membrana para a formação do autofagossomo. Em situação de disponibilidade de nutrientes, ATG9A está localizada na rede de Golgi trans e endossomos tardios. Quando as células são privadas de nutrientes, ATG9 passa a colocalizar com marcadores de autofagossomos. Essa motilidade é dependente da atividade cinase de ULK1 e PIK3C3, bem como WIPI2 (Young *et al.*, 2006).

4.3.2.3 *PtdIns3K classe III*

Em leveduras, o único fosfoinosítídeo 3-cinase (PtdIns3k ou PI3K) é Vps34, que existe em dois diferentes complexos, complexos I e II. O complexo necessário para indução de autofagia é o complexo I, que consiste de Vps34, Vps15, Vps30/Atg6 e Atg14. A atividade de Vps34 é essencial para a geração de fosfatidilinositol 3-fosfato (PtdIns3P) no PAS para permitir o recrutamento de outras proteínas Atg (Kihara *et al.*, 2001).

Em mamíferos existem três classes de PI3K baseados em estrutura da subunidade catalítica. Classe I, e provavelmente também a classe II, estão envolvidos em vias de transdução de sinal de vários estímulos externos, enquanto a classe III participa em processos de tráfego de vesículas intracelulares. O complexo PI3K de classe III inclui Vps34, Beclina-1 (BECN1) e a subunidade regulatória p150. Ortólogos de Atg14 e Vps38 foram recentemente identificados e são chamados proteína do tipo Atg14 (Atg14L) e gene associado a resistência a irradiação ultravioleta (UVRAG), respectivamente (Lindmo e Stenmark, 2006).

A regulação do complexo PI3K ocorre através de fatores que se ligam diretamente a BECN1, uma proteína Atg essencial para a autofagia (Fig. 6) (Zeng *et al.*, 2006). A proteína antiapoptótica BCL2 se liga a BECN1 e previne a interação desta com PI3KC3, inibindo a autofagia (Zhong *et al.*, 2009). Outra proteína que se liga a BECN1 é KIAA0226/Rubicon, inibindo a atividade de PI3KC3 no complexo formado com UVRAG (Zhong *et al.*, 2009). Dois reguladores positivos do complexo PtdIns3K são AMBRA1 (que se liga diretamente a BECN1) (Fimia *et al.*, 2007) e SH3GLB1/Bif-1 (que interage com BECN1 através de UVRAG e parece promover a geração da curvatura da membrana) (Takahashi *et al.*, 2007).

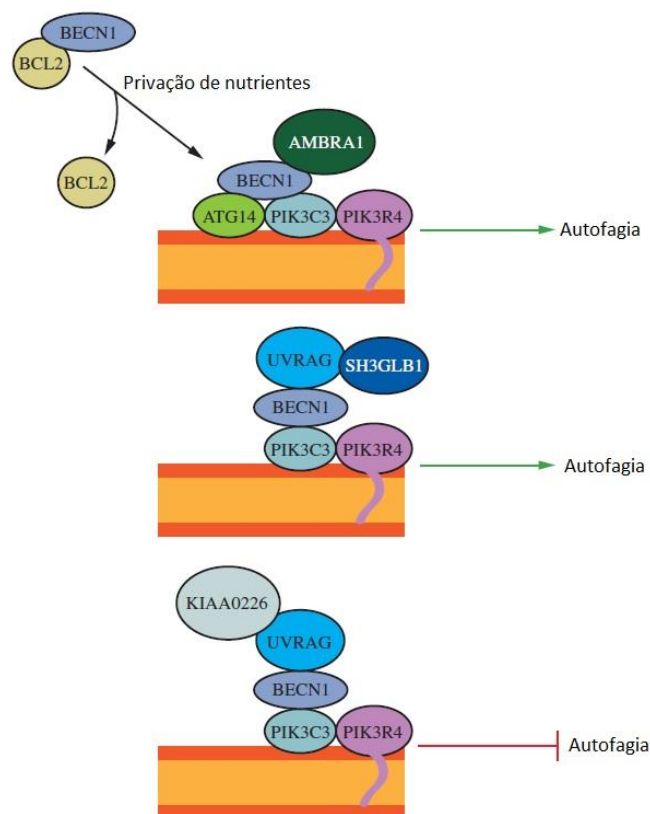


Figura 6 – A atividade de PI3K classe III é regulada pela composição do complexo. Este pode ser regulado positivamente por AMBRA1 e negativamente por BCL2, ambos se ligando diretamente a BECN1. UVRAG também se liga diretamente a BECN1 e pode ser regulado positivamente por SH3GLB1/Bif-1 ou negativamente por KIAA0226/Rubicon. Adaptada de (Parzych e Klionsky, 2014).

Atg14L tem papel fundamental da autofagia em células de mamíferos. Em situações de disponibilidade de nutrientes, está localizada no retículo endoplasmático e, sob privação de nutrientes, co-localiza com marcadores do fagóforo e de autofagossomos, de maneira independente de Vps34 e Beclina-1. Uma provável função de Atg14L é direcionar o complexo PI3K classe III ao fagóforo para iniciar o recrutamento da maquinaria Atg (Furuya *et al.*, 2005). UVRAG compete com Atg14L pela ligação com BECN1, tornando as interações de Atg14L e UVRAG com o complexo BECN1-Vps34-p150 mutuamente exclusivas.

4.3.2.4 Sistemas de conjugação 'Ubiquitin-like'

Existem dois sistemas de conjugação de proteínas que atuam na autofagia seletiva e não seletiva durante as fases de nucleação e expansão da membrana do fagóforo, envolvendo as duas proteínas do tipo ubiquitina Atg12 e Atg8. Estes sistemas estão descritos aqui como 'sistemas Ubl'. Ambos os sistemas de conjugação são conservados evolutivamente e são assim denominados por semelhanças no mecanismo de ubiquitinação de proteínas.

Atg12 é covalentemente ligada a Atg5 através de uma ligação isopeptídica entre a glicina carboxi-terminal de Atg12 e um resíduo de lisina interno da cadeia de Atg5, cujas reações de conjugação são catalisadas por duas proteínas adicionais, Atg7 e Atg10 (Mizushima, Noda, *et al.*, 1998), (Mizushima, Sugita, *et al.*, 1998). Atg7 é homóloga à enzima ativadora de ubiquitina E1, Uba1, na região ligadora de ATP e no resíduo de cisteína no sítio catalítico, mas não em estrutura geral (Tanida *et al.*, 1999). Atg10 funciona como uma enzima conjugadora de ubiquitina E2, embora não apresente homologia nenhuma com as enzimas E2 que participam no sistema de ubiquitinação (Shintani *et al.*, 1999). Atg7 hidrolisa ATP resultando na ativação de Atg12 através da formação de uma ligação tioéster de alta energia entre a glicina carboxi-terminal da Atg12 e a cisteína 507 da Atg7; subsequentemente, Atg12 ativada é transferida diretamente para a cisteína 133 da Atg10 para formar uma ligação tioéster Atg12-Atg10. Finalmente Atg12 é transferida para a proteína alvo, Atg5, para formar o conjugado final. Atg5 é adicionalmente conjugada não covalentemente a outra proteína, Atg16, para formar uma estrutura multimérica Atg12-Atg5-Atg16 através da homo-oligomerização de Atg16 (Fig. 7). Este multímero possui massa molecular de aproximadamente 350 kDa e se apresenta na forma de tetrâmero. Os ortólogos deste sistema em células de mamíferos ATG12, ATG5 e ATG16L1 funcionam da mesma maneira (Ohsumi, 2001), formando um complexo de aproximadamente 800 kDa. O complexo ATG16L1 é essencial para especificar o local de lipidação de LC3 para a biogênese da membrana do autofagossomo (Fujita *et al.*, 2008).

A segunda proteína que sofre conjugação em um sistema Ubl, Atg8, é conjugada ao lipídeo de membrana fosfatidiletanolamina (PE) (Ichimura *et al.*, 2000).

Logo após sua síntese, Atg8 sofre uma clivagem proteolítica na arginina 117 pela protease Atg4, expondo uma glicina na parte carboxi-terminal (Kirisako *et al.*, 2000). Esta glicina é então ligada a cisteína 507 da Atg7, a mesma enzima E1 usada no sistema de conjugação Atg12-Atg5. A proteína Atg8 ativada é então transferida a uma segunda enzima E2, Atg3, via formação de ligação tioéster com o resíduo de cisteína 234. Eventualmente, Atg8 é conjugada a uma PE através de ligação amida entre a glicina carboxi-terminal e o grupo amino da PE. Atg8-PE permanece fortemente associado à membrana. Diferentemente do conjugado Atg12-Atg5, a conjugação de Atg8-PE é um processo reversível no qual Atg4 libera a proteína Atg8 do lipídeo alvo para que possa ser reutilizada (Fig. 7).

Em células de mamíferos existem pelo menos quatro homólogos de Atg8 – MAP1LC3, GATE16, GABARAP e Atg8L – e todos eles possuem o resíduo de glicina conservado, onde ocorre a conjugação com o fosfolipídeo da mesma maneira que em leveduras (Tanida *et al.*, 2002), (Tanida *et al.*, 2006). Entre todos, LC3 é a mais abundante na membrana dos autofagossomos e é bem estabelecida como um marcador para monitorar a atividade autofágica.

Durante a formação do autofagossomo, ambos complexos Atg12-Atg5-Atg16 e o conjugado Atg8-PE estão localizados no PAS. O primeiro está principalmente localizado na membrana externa do fagóforo e liberado ao citoplasma após a conclusão da formação do autofagossomo (Kabeya *et al.*, 2000). A proteína Atg8, conjugada ao fosfolipídeo, apresenta uma distribuição simétrica nas faces interna e externa da membrana do autofagossomo. A Atg8-PE que está localizada na face externa é liberada por uma clivagem dependente de Atg4, enquanto que a localizada na face interna é degradada juntamente com o material contido no autofagossomo após a fusão com o lisossomo (Suzuki *et al.*, 2001).

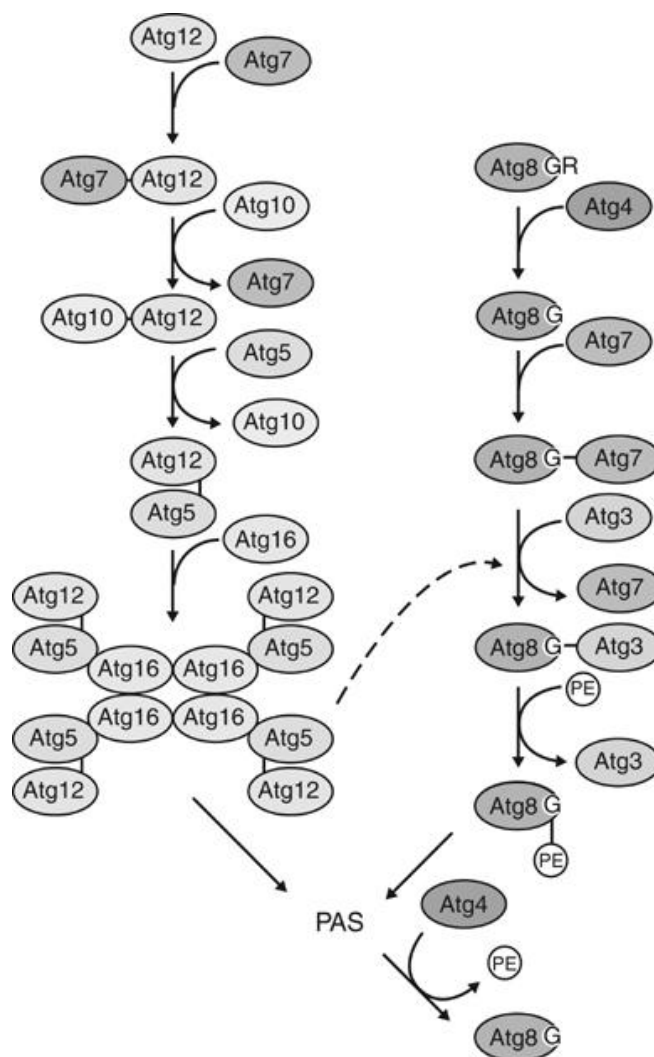


Figura 7 – Dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitina descrito para leveduras. A conjugação de Atg12 a Atg5 inicia com a ativação por Atg7, considerada homóloga da enzima ativadora de ubiquitina, E1. Atg7 hidroliza ATP, resultando na formação de uma ligação tioéster entre a glicina carboxi terminal de Atg12 e uma cisteína de Atg7. Subsequentemente, Atg12 é transferida para Atg10, enzima do tipo E2, a qual cataliza a conjugação de Atg12 e Atg5 pela formação de uma ligação isopeptídica. Esse conjugado se liga a Atg16, a qual forma um tetrâmero, o que permite a formação de uma estrutura multimérica Atg12-Atg5-Atg16. A conjugação entre Atg8 e PE inicia com uma clivagem carboxi terminal da Atg8 pela protease Atg4. A glicina exposta é então ligada a Atg7 e então transferida para Atg3. O conjugado Atg12-Atg5 parece funcionar como uma enzima do tipo E3, para promover a ligação entre Atg8 e PE. Ambos complexos, Atg12-Atg5-Atg16 e Atg8-PE se localizam no PAS para promover a formação da membrana do autofagossomo. (Yorimitsu e Klionsky, 2005).

4.3.3 Regulação

A autofagia é importante para que a célula consiga responder a uma grande variedade de sinais de estresse intra e extracelulares, incluindo privação de nutrientes, presença/ausência de insulina e outros fatores de crescimento, hipóxia e estresse do retículo endoplasmático (Fig. 8). Duas vias envolvidas em privação de nutrientes são reguladas pela proteína cinase A dependente de cAMP (PKA) e TOR, as quais respondem principalmente a fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente (Stephan *et al.*, 2010). Em mamíferos, a inibição da autofagia mediada por PKA ocorre, pelo menos em parte, através da fosforilação de LC3 por PKA. MTORC1 é positivamente regulado pela presença de aminoácidos e, também, ativado por PKA, a qual pode também ativar MTORC1 indiretamente através da inibição da proteína cinase ativada por AMP (AMPK).

AMPK é a principal cinase sensora dos níveis de energia na célula e responde aos níveis intracelulares de AMP/ATP para regular uma grande variedade de processos celulares, incluindo autofagia. AMP e ATP possuem efeitos opostos na atividade de AMPK e níveis elevados de AMP promovem a ativação da sua atividade cinase. Quando ativada, em situações de baixos níveis de energia, AMPK pode fosforilar e ativar o complexo TSC1/2, o qual inibe indiretamente a atividade de MTORC1. AMPK pode, também, fosforilar e ativar o ULK1. Em ambos os casos levando a indução da autofagia (Parzych e Klionsky, 2014).

Concentrações elevadas de Ca^{2+} citosólicas, resultante de estresse do retículo endoplasmático, fazem com que a proteína cinase cinase 2 dependente de calcio/calmodulina (CAMKK2/CaMKK β) ative AMPK, também levando a indução de autofagia (Hoyer-Hansen *et al.*, 2007).

Outros sinais que promovem indução de autofagia são hipóxia e ausência de fatores de crescimento, ambos regulados através de MTORC1 (Lum *et al.*, 2005).

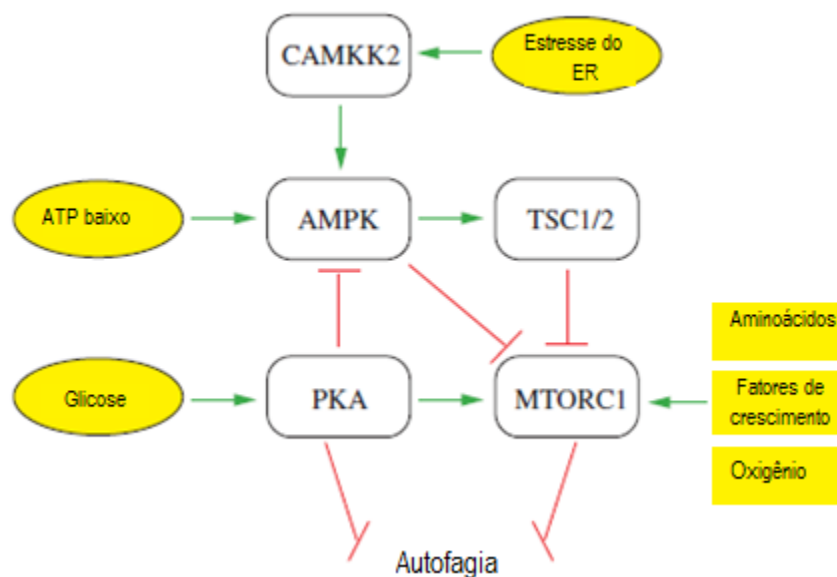


Figura 8 – Regulação da autofagia. Três das principais cinases que regulam autofagia são PKA, AMPK e MTORC1. Essas cinases, juntamente com proteínas como TSC1/2 e CAMKK2/CaMKK β , respondem a uma grande variedade de sinais intra e extracelulares para regular autofagia. Flechas verdes indicam ativação do alvo e barras vermelhas indicam inibição. Adaptada de (Parzych e Klionsky, 2014).

4.3.4 Métodos de avaliação de autofagia

A pesquisa em autofagia tem sido historicamente desafiada pela avaliação estática de um processo dinâmico e as limitações inerentes associadas a fazer inferências biológicas baseadas em tais medidas. Esse desafio tem sido parcialmente superado pela aplicação dos avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares para o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de autofagia. Desse modo, novas técnicas têm sido desenvolvidas para monitorar a autofagia como um processo dinâmico e para modulá-la, a fim de investigar as suas funções em um determinado processo celular.

Uma ideia errônea comum é que o número aumentado de autofagossomos invariavelmente corresponde a um fluxo autofágico aumentado. Dado que o autofagossomo é uma estrutura intermediária de uma via dinâmica, o número de autofagossomos observados em um momento específico é um balanço entre a taxa de geração e a taxa de conversão a autolisossomo. Com isso, acúmulo de autofagossomo pode representar indução ou, alternativamente, supressão dos eventos posteriores a

formação dos autofagossomos. Por exemplo, comparado aos níveis basais de autofagia (Fig. 9A), a ativação do processo resulta no aumento de estruturas autofágicas (membrana de isolamento, autofagossomo e autolisossomo) (Fig. 9B). Se alguma das etapas antes da formação do autofagossomo for bloqueada, o número de estruturas diminui (Fig. 9C). Ao contrário, se alguma etapa posterior for bloqueada, resulta em aumento do número de autofagossomos e redução de autolisossomos (Fig. 9D). Com isso, é visto que a simples determinação do número de autofagossomos é insuficiente para uma estimação geral de autofagia. O termo “fluxo autofágico” é usado para descrever o processo dinâmico da síntese do autofagossomo, entrega dos substratos ao lisossomo e degradação, sendo um indicador mais fidedigno da atividade autofágica.

4.3.4.1 Avaliação da quantidade de autofagossomos

Os principais métodos para monitorar a quantidade de autofagossomos baseiam-se em avaliações por microscopia ou detecção bioquímica da proteína LC3 associada à membrana dessa organela.

A autofagia foi originalmente descoberta no final dos anos 1950 por microscopia eletrônica durante estudos de lisossomos e se mantém até hoje o método mais tradicional para avaliação ultraestrutural das diferentes etapas da autofagia. A utilização desta metodologia é válida e importante para avaliações qualitativas e quantitativas de diferentes estruturas autofágicas que sequencialmente formam o fagóforo, autofagossomo e autolisossomo. Além de ser uma das metodologias mais largamente utilizada para monitorar autofagia, também é uma das mais problemáticas pelo fato de interpretações incorretas, majoritariamente provenientes de artefatos metodológicos. Por isso, embora seja uma importante ferramenta, não é um método perfeito e apresenta um limitado potencial de aplicação em estudos funcionais e de larga escala.

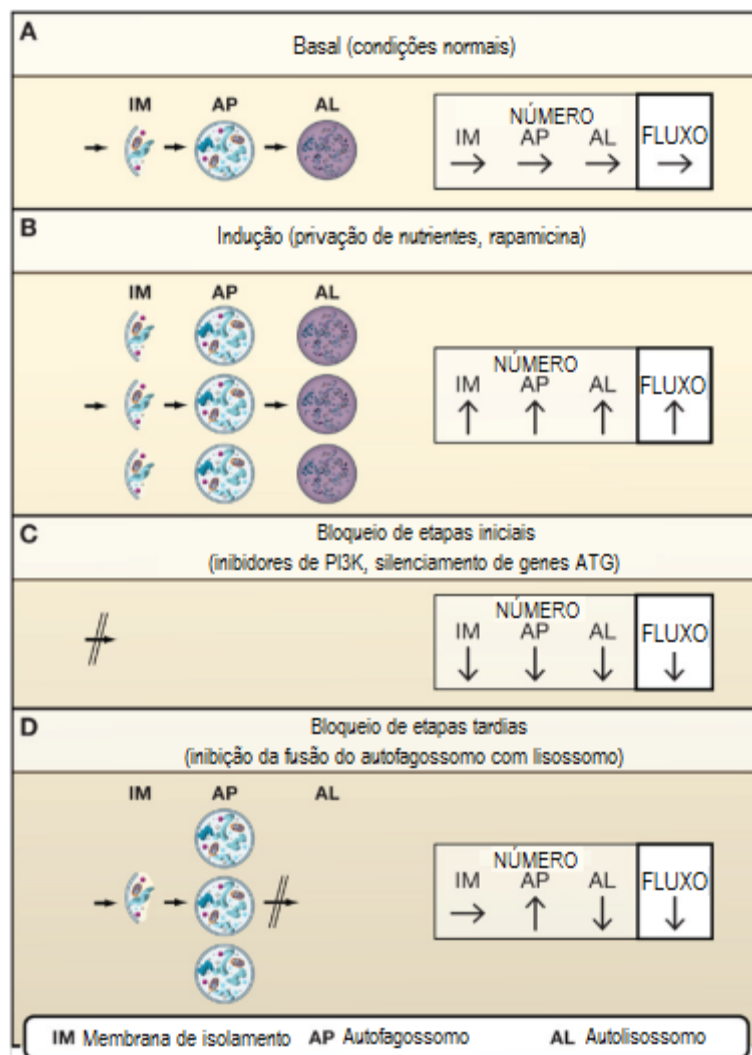


Figura 9 – Regulação dinâmica do acúmulo de diferentes estruturas autofágicas. Está descrito as quantidades relativas de membrana de isolamento (IM), autofagossomos (AP) e autolisossomos (AI). (A) Autofagia basal em condições normais. (B) Situação de indução de autofagia, por exemplo, privação de nutrientes. (C) Inibição da autofagia numa etapa inicial, onde não há geração de estruturas autofágicas. (D) Bloqueio da autofagia numa etapa final, posterior à formação do autofagossomo, levando ao acúmulo somente dessas estruturas. Adaptada de (Mizushima *et al.*, 2010).

A avaliação do número de autofagossomos por microscopia eletrônica requer conhecimentos consideravelmente especializados, pode apresentar artefatos inerentes da técnica e é de caráter qualitativo. Por isso, está sendo cada vez mais substituída por métodos baseados em microscopia de luz e bioquímicos, os quais são amplamente acessíveis e quantificáveis. Como descrito anteriormente, a proteína LC3 em células de mamíferos é um marcador de autofagossomos. Logo que sintetizada, a proteína LC3 é clivada em sua porção carboxi-terminal pela ATG4, sendo então

chamada de LC3-I, a qual contém um resíduo de glicina na extremidade. A LC3-I é então conjugada com a fosfatidiletanolamina (PE) pra se tornar LC3-II, pela reação já descrita na figura 7. Em contraste com a localização citoplasmática de LC3-I, LC3-II está associada as membranas interna e externa do autofagossomo. Assim, LC3 endógena ou GFP-LC3 é vizualizada por microscopia de fluorescência como um conjunto citoplasmático difuso ou como agregados puntiformes que representam os autofagossomos (Fig. 10 e Fig. 11B).

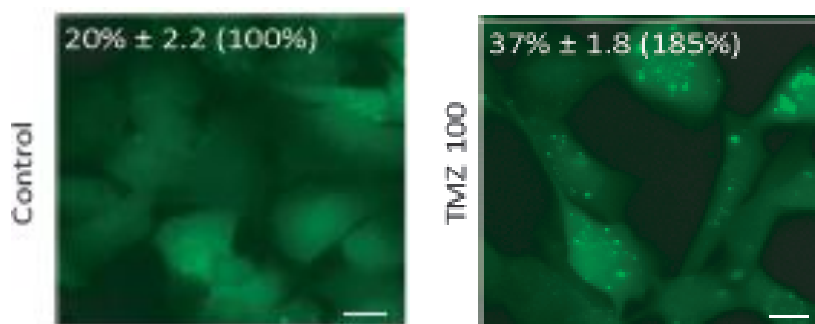


Figura 10 – Visualização da distribuição de GFP-LC3. A proteína LC3-I possui localização citoplasma e é visualizada como fluorescência verde dispersa, quando analisando GFP-LC3-I (imagem da esquerda). Em situação de indução de autofagia se observam pontos verdes, correspondendo aos autofagossomos, e representando a proteína GFP-LC3-II (imagem da direita). Dados não publicados.

Uma das principais limitações do ensaio de GFP-LC3 é que ele requer um sistema eficiente de introdução de um gene exógeno e o seu uso em células primárias é desafiador.

Além do seu potencial de aplicação em ensaios por microscopia de fluorescência, LC3 também é útil para ensaios bioquímicos para avaliar a quantidade de autofagossomos. A conversão de LC3-I em LC3-II pode ser detectada por *western blot* e a quantidade de LC3-II normalmente correlaciona bem com o número de autofagossomos ou, mais precisamente, com a quantidade de membranas autofágicas marcadas com LC3-II (Fig. 11C).

Ensaio		MÉTODOS DE DETECÇÃO	Resultado esperado			
			BASAL	INDUÇÃO	BLOQUEIO INICIAL	BLOQUEIO TARDIO
MORFOLOGIA	A Detecção de AP/AL 	EM	→ AP → AL	↑↑AP ↑↑AL	↓AP ↓AL	↑↑AP ↓AL
	B Número de pontos de GFP-LC3 	FM	→	↑↑	↓	↑↑
QUANTIDADE DE AP	C Quantidade de LC3-II (conversão de LC3) 	IB	→	↑↑	↓	↑↑
	D Turnover de LC3 Inibidor lisossomal - + Diferença dos níveis de LC3-II	IB	→	↑↑	↓	↓
FLUXO AUTOFÁGICO	E Quantidade total de LC3, GFP-LC3, p62 	IB FC FM	→	↓	↑	↑
	F Mudança de cor de mRFP-GFP-LC3 	FM	→R →Y	↑↑R ↑↑Y	↓R ↓Y	↓R ↑↑Y

AP Autofagossomo EM Microscopia eletrônica IB Imunodeteção
 AL Autolisossomo FM Microscopia de fluorescência FC Citometria de fluxo

Figura 11 – Métodos para monitorar quantidade de autofagossomos e fluxo autofágico. (A) Detecção de autofagossomos e autolisossomos por microscopia eletrônica. (B) Contagem de pontos GFP-LC3 avaliado por microscopia de fluorescência. (C) Detecção da conversão de LC3 por *western blot*. (D) Avaliação da degradação de LC3-II nos autolisossomos na presença ou ausência de inibidores de atividade lisossomal. (E) Avaliação por *western blot* da degradação de substratos da autofagia. (F) Detecção de autofagossomos (amarelo) e autolisossomos (vermelho) pela proteína fluorescente mRFP-GFP-LC3. Adaptada de (Mizushima *et al.*, 2010)

4.3.4.2 Avaliação do fluxo autofágico

Os métodos recém-abordados são úteis para avaliação da quantidade de autofagossomos que geralmente, mas nem sempre, indicam fluxo autofágico. Na maioria dos casos é necessário distinguir se o acúmulo de autofagossomos é pela indução de autofagia ou bloqueio das etapas finais; para isso são necessários ensaios que avaliam o fluxo autofágico (Fig. 11D, E e F). Através de microscopia eletrônica também é possível avaliar a quantidade de autofagossomos e autolisossomos e, se alguma das etapas está bloqueada, ocorre o acúmulo dessas vesículas. Porém, por este método não se obtém informação sobre a degradação lisossomal dos substratos e, portanto, não é classificado como um método para avaliar fluxo autofágico.

Um dos principais métodos para essa avaliação é a medida de LC3, a qual é baseada na observação da geração e degradação de LC3-II. Na presença de reagentes lisossomotrópicos, como cloreto de amônio, cloroquina ou bafilomicina A1 – os quais inibem a acidificação dos lisossomos ou impedem a fusão destes com os autofagossomos – a degradação de LC3-II é bloqueada, resultando no seu acúmulo, assim como na presença de inibidores de proteases lisossomais, como catepsinas ou peptatina A (Tanida *et al.*, 2001). Assim, as diferenças na quantidade de LC3-II observadas entre amostras na presença ou ausência desses inibidores representam a quantidade de LC3 que foi degradada pela atividade lisossomal, representando o fluxo autofágico (Fig. 11D) (Klionsky *et al.*, 2012).

Além da LC3, outros substratos da autofagia podem ser avaliados para monitorar fluxo autofágico. A proteína SQSTM1/p62 é seletivamente incorporada nos autofagossomos através de um domínio de ligação a LC3 e é degradada com a conclusão da autofagia (Bjorkoy *et al.*, 2005). Assim, o nível total de p62 é inversamente proporcional a atividade autofágica (Fig. 11E). Por exemplo, células privadas de nutrientes ativam autofagia e os níveis de p62 reduzem, enquanto que células deficientes em autofagia acumulam essa proteína.

Outro método para avaliar fluxo autofágico é baseado no conceito de 'quenching' da fluorescência do GFP em ambiente ácido, como no autolisossomo. Ao contrário, RFP (e outras proteínas fluorescentes vermelhas, como mCherry) são mais

estáveis e apresentam fluorescência mesmo em compartimentos ácidos. Explorando essa diferença, o fluxo autofágico pode ser morfológicamente monitorado com a proteína mRFP-GFP-LC3 ou mCherry-GFP-LC3 (Fig. 11F). Em células expressando essa proteína, autofagossomos aparecem marcados em amarelo (RFP⁺/GFP⁺) e autolisossomos em vermelho (RFP⁺/GFP⁻). Se o fluxo autofágico aumenta, ambos pontos amarelos e vermelhos aumentam; porém, se a maturação de autofagossomos é bloqueada, somente os pontos amarelos aumentam.

A utilidade e limitações de cada um desses métodos pode variar para diferentes tipos celulares e diferentes contextos experimentais. Por isso, é recomendado a combinação de diferentes métodos para medir o fluxo autofágico; sendo de extrema importância o desenvolvimento ou aprimoramento de métodos existentes para avaliação do processo autofágico em grande escala e em pacientes, como em amostras de sangue ou de tecidos.

4.3.5 Laranja de acridina

O corante laranja de acridina (AO) foi primeiramente extraído a partir do alcatrão de carvão no final do século XIX e teve sua patente depositada em 1895 com aplicação como corante industrial e marcação de microorganismos. AO possui a característica de metacromasia, emitindo fluorescência verde na forma de monômero e fluorescência vermelha na forma de dímero, quando excitado pela luz azul (Fig. 12).

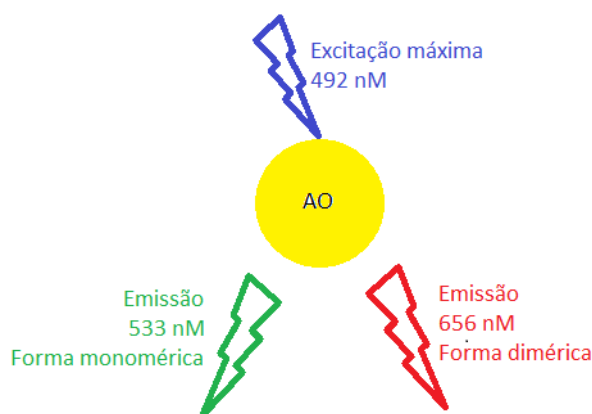


Figura 12 – Metacromasia do laranja de acridina. AO é excitado pela luz azul (máx 492 nm) e emite fluorescência verde (máx 533 nm) na forma monomérica e fluorescência vermelha (máx 565 nm) na forma dimérica. (Kapusinski *et al.*, 1983), (Kusuzaki *et al.*, 2000).

Devido a sua estrutura química simples e baixo peso molecular, AO tem a capacidade de cruzar membranas biológicas rapidamente por difusão passiva e acumular especialmente em ambientes ácidos, onde é ionizado por protonação. AO ionizado então não é mais capaz de cruzar membranas biológicas através de transportadores ou canais iônicos e a sua concentração aumenta, formando dímeros e resultando na emissão de fluorescência vermelha sob excitação por luz azul. Existem evidências experimentais que AO não acumula em organelas como mitocôndrias, aparato de Golgi e retículo endoplasmático (Kusuzaki *et al.*, 2000).

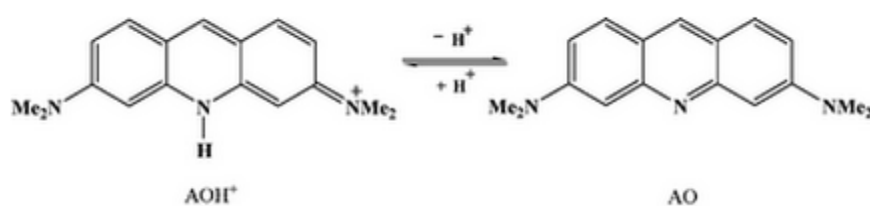


Figura 13 – Estrutura química do laranja de acridina. Em solução aquosa, AO pode existir em dois estados de protonação, forma protonada (esquerda) ou neutra (direita). (Shaikh *et al.*, 2008)

Devido à característica de acumular em ambientes ácidos, AO é utilizado para monitorar autofagia, sendo capaz de detectar o aumento do volume de compartimentos ácidos na célula, como os autolisossomos. Sua utilização como método quantitativo para avaliação de organelas vesiculares ácidas é pela detecção de fluorescências verde e vermelha por citometria de fluxo em células marcadas com AO. Para a condição controle se estabelece um limiar levando em conta a fluorescência vermelha e, a partir daí, se observa o aumento ou redução da porcentagem de células com os níveis de fluorescência acima ou abaixo deste limiar.

Embora AO é frequentemente considerado uma sonda não específica para monitorar autofagia, continua atrativa por ser de fácil utilização e não requerer manipulação genética, sendo aplicável para células de difícil transfecção e, de grande importância, por detectar a etapa final da autofagia, podendo dar uma visão do fluxo autofágico.

5 Objetivos

Dentro de uma população podem haver variações nos tamanhos das células, assim como diferentes tratamentos podem induzir essas mudanças (Fingar *et al.*, 2002) ou variações em diferentes fases do ciclo celular. Por este fato, análises de fluorescência da marcação de células com laranja de acridina podem resultar em falsos positivos ou negativos se considerado somente a fluorescência vermelha absoluta.

Objetivo geral

- Fundamentar o uso do marcador laranja de acridina para a avaliação da indução de autofagia.

Objetivos específicos

- Analisar a indução de autofagia pela marcação com laranja de acridina em linhagens celulares e comparar os resultados obtidos pela quantificação da maneira usual, que leva em conta somente a fluorescência vermelha, e com a abordagem proposta, que considera a razão das fluorescências verde e vermelha;
- Comparar as duas formas de análise da marcação em tratamentos que promovem aumento ou redução do tamanho celular e comparar os resultados obtidos com outras metodologias clássicas de avaliação de autofagia;
- Avaliar a indução de fluxo autofágico pela marcação com laranja de acridina em linhagens celulares proficientes e deficientes em autofagia;
- Avaliar a indução de autofagia pela marcação com laranja de acridina em culturas primárias.

6 Artigo científico

Neste capítulo está apresentado o artigo científico resultante do trabalho desenvolvido durante o período do mestrado. Este foi recentemente submetido ao periódico 'Autophagy', por isso a formatação deste capítulo está de acordo com as regras deste periódico com algumas adaptações. A decisão dos revisores foi negativa, porém com contribuições e sugestões, abrindo a possibilidade de resubmissão para a mesma revista assim que concluído o trabalho experimental sugerido pelos mesmos. Estes experimentos encontram-se em andamento e os resultados preliminares serão apresentados no capítulo 'Resultados adicionais e Discussão'.

Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of autophagy

Marcos Paulo Thomé¹; Eduardo Cremonese Filippi-Chiela^{1,2}; Emilly Schlee Villodre¹, Celina Borges Migliavaca¹, Karina Bettega Felipe¹, Guido Lenz^{1,3}

1 – Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2 – Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA), UFRGS.

3 – Center of Biotechnology, UFRGS.

Corresponding author: lenz@ufrgs.br

Department of Biophysics, Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43431 – Lab. 115

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Abbreviations

AO – **A**cridine **O**range

ATG – **A**utophagy-related

AVOs – **A**cidic **V**esicular **O**rganelles

BafA1 - Bafilomycin A1

GFP – **G**reen **F**luorescent **P**rotein

LC3 – Microtubule associated protein 1 **L**ight **C**hain 3 (MAP1LC3)

TMZ (or T) – **T**emozolomide

Rapa - **R**apamycin

PT - **P**erpendicular **t**hreshold

IT - **I**nclined **t**hreshold

FSC - **F**orward **S**catter

SSC - **S**ide **S**catter

Abstract

Several methods have been developed and extensively employed in determining various aspects of the autophagic process. Acridine orange (AO) is a cell permeable fluorophore that fluoresces red in Acidic Vesicular Organelles (AVOs) and green in the remaining of the cell. Therefore, AO staining is a fast and cheap method to assess AVO mass in a cell, which increases upon autophagy induction. Since the specificity of AO staining for measuring autophagy has been questioned, we developed a ratiometric analysis of autophagy, considering the red-to-green fluorescence ratio to quantify data obtained from AO flow cytometry. This method measured with accuracy the increase in autophagy induced by rapamycin, which was blocked by the lysosome acidification inhibitor bafilomycin A1 as well as stable knockdown of genes that regulate different steps in the autophagy pathway. In comparison to the most-commonly used threshold that considers only the absolute red fluorescence, results obtained with our proposed threshold setting had higher correlation with well-established specific methods for autophagy quantification, such as LC3-I to LC3-II conversion, SQSTM1 degradation and GFP-LC3 puncta formation assay. Additionally, we suggest a new dynamic way to present and interpret AO data, considering both the percentage of cells above the established threshold and, concurrently, their fluorescence intensity. These new ways of AO data analysis will allow this simple assay to be used as an initial and objective method for evaluating the late step of the autophagic process in individual cells, complementing other methods.

Key words: Acridine Orange, flow cytometry, single cell, method, autolysosome.

Introduction

Several methods for monitoring autophagy have been developed, including methods based on electron or fluorescent microscopy, western blot and flow cytometry.^[1] Electron microscopy^[2] and fluorescent-tagged LC3 puncta (such as GFP-LC3) quantification by fluorescence microscopy^[3] are good methods for evaluating the initial steps of autophagy, whereas electron microscopy and tandem fluorescent-tagged LC3 (such as mRFP-EGFP-LC3 and mCherry-EGFP-LC3)^[4] are employed to analyze both early and late autophagic vesicles. Western blots for both SQSTM1 and LC3I/II in the presence or absence of agents that block lysosome acidification and fusion to the autophagosome, such as bafilomycin A1 (BafA1) or chloroquine,^[1] have been extensively employed to measure autophagic flux.

The assays available to measure autophagy that are fast, easy and that allow population analysis *in vitro* are limited.^[5] Furthermore, there are several assays to evaluate early steps of autophagy, while the study of late steps is, technically, much more limited, requiring for example, genetic encoded reporters or electron microscopy. Therefore, the development of new strategies as well as the improvement of current methods may contribute to the study of autophagy, especially considering heterogeneous populations of cells, such as cancer cells.^[6]

The acridine orange (AO) dye fluoresces red in Acidic Vesicular Organelles (AVOs)^[7] and green in the remaining of the cell, thus enabling its use as a marker of matured autophagosomes (*i.e.* autolysosomes). The fluorescent cytoplasmic particles that accumulate in cells treated with AO, previously referred to as 'AO particles',^[8] were later shown to represent acidic Multivesicular Bodies (MVB).^[9] Nowadays, it is known that the autophagosome fuses with MVBs to generate the so called amphisome, a prelysosomal hybrid organelle.^[10,11] Thus, induction of autophagy leads to an increase in the mass of the acidic compartments of the cell, which can be assessed through AO staining.

AO is frequently thought to be a poor and nonspecific probe for monitoring autophagy.^[1] However, it is attractive because it is easy to use and does not require a genetic reporter, therefore being applicable in cells that are difficult to transfect and,

most importantly, can be employed to evaluate the late step of autophagy. Here we propose improvements in the analysis of AO flow cytometry data to measure autophagy.

Results

Acridine orange staining measures autophagy induction if the correct threshold setting is used

Since AO specificity for measuring autophagy has been questioned, we initially checked its ability to assess autophagy in U87 glioma cells knocked down (KD) for *BECN1* and *ATG7*, two genes that regulate different steps in the autophagy pathway (Fig. 1A). As expected, treatment with rapamycin 200 nM for 24 h efficiently induced autophagy in shRNA scrambled control cells (shCtrl), as indicated by the increased conversion from LC3-I to LC3-II and decreased SQSTM1 levels, whereas knockdown of *BECN1* and *ATG7* strongly impaired this induction (Fig. 1B).

One of the problems with fluorometric methods, such as AO, is that variations in cell size may lead to alterations in fluorophore uptake, leading to false positives (FP) or false negatives (FN). Treatment-induced reduction in cell size leads to a reduced uptake of AO and cells that are actually autophagic would not reach a given threshold of fluorescence (FN events Fig. 1C, yellow dots). Conversely, if a treatment induces an increase in cell size, augmented AO uptake would increase red fluorescence of cells not due to autophagy induction but because of this increased uptake (FP events - Fig. 1C, red dots). This occurs if the threshold setting is based solely on absolute red fluorescence, *i.e.* a threshold setting that is perpendicular to the red fluorescence intensity axis (Fig. 1C, cyan threshold). This is the most commonly used threshold to analyze AO data, being found in 75 out of 80 papers published from 2003 to March 2015.

According to this hypothesis, perpendicular threshold (PT) setting misidentifies non-autophagic cells as autophagic due to cell enlargement and misses positive cells due to their small size. The solution to this is an inclined threshold (IT) setting,

considering the red-to-green fluorescence ratio (Fig. 1C, green threshold). Consistent with the previous results, the analysis of AO data with IT setting indicated the induction of autophagy with rapamycin and the reduction of this effect in *BECN1*^{KD} and *ATG7*^{KD} cells, whereas the PT setting did not detect the induction of autophagy by rapamycin.

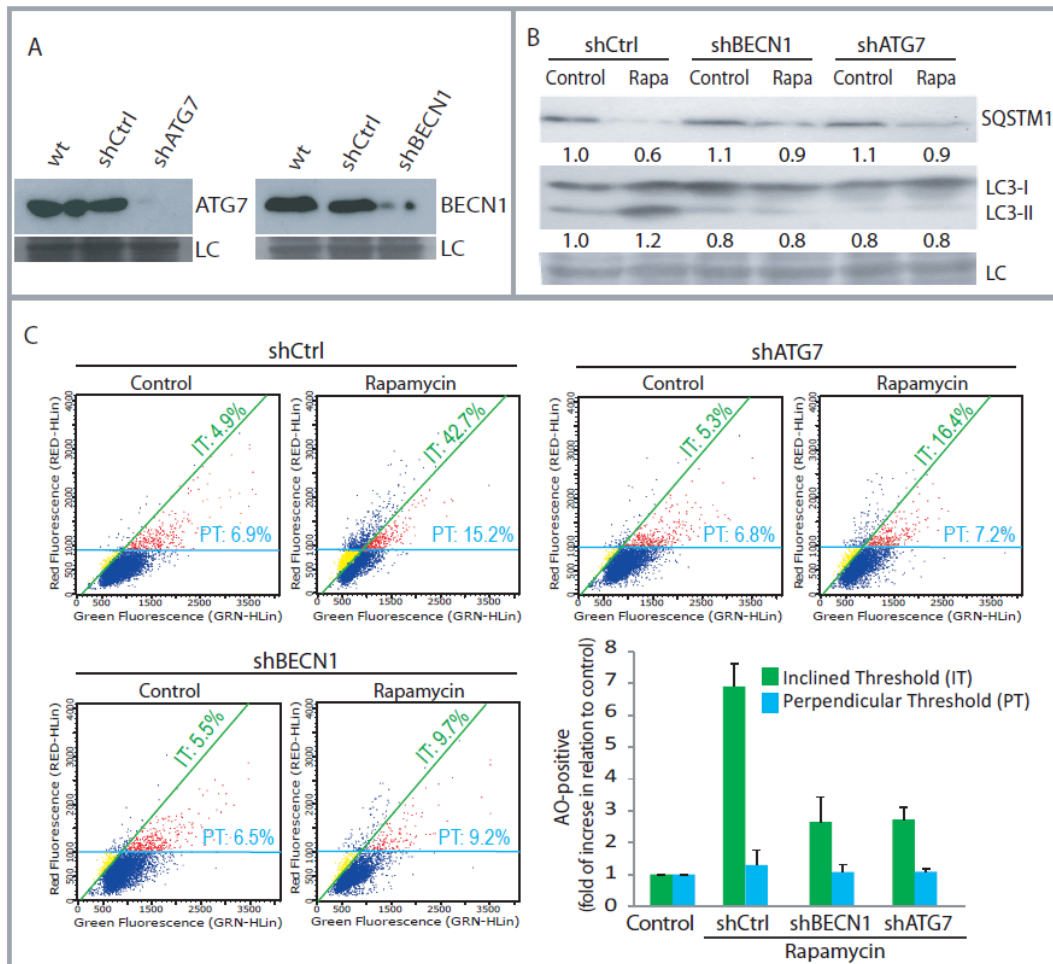


Figure 1 Ratiometric analysis of AO fluorescence measures autophagy **(A)** Western blots of ATG7 and BECN1 in wild type U87 cells, scrambled shRNA control (shCtrl) and specific shRNA of ATG7 or BECN1; LC - loading control. **(B)** LC3-I/II and SQSTM1 western blots in shBECN1, shATG7 and shCtrl U87 KD cells; **(C)** Red and green fluorescence of AO-stained cells silenced for the indicated genes analyzed with PT or IT setting. Red dots denote false positive (FP) and yellow dots denote false negative (FN) events. Values represent the percentage above PT (cyan) or left to IT (green) of the representative experiment shown. Column chart shows the average \pm SEM of the proportion of events above threshold with PT and IT of silenced cells treated with 200 nM of rapamycin for 24 h for three independent experiments.

Cell size variations have to be considered in the analysis of autophagy using AO

In order to test the abovementioned hypothesis, we used three treatments that differently affect cell size and autophagy. Rapamycin, which induces autophagy and reduces cell size (Fig. 2); Temozolomide (TMZ) in U251 cells, which increases cell size without inducing autophagy (Fig. 3) and TMZ in U87 cells, which increases cell size and induces autophagy (Fig. 4).

We treated U87 glioma cells stably expressing mCherry-GFP-LC3 tandem-tagged fluorescent protein (tfLC3) with rapamycin 200 nM for 24 h in the presence or absence of the proton V-ATPase inhibitor BafA1. It is well described that rapamycin decreases cell size^[12] and induces autophagy. As expected, rapamycin-treated cells accumulated red LC3 puncta (mCherry⁺/GFP) (Fig. 2A), increased the conversion of LC3-I to LC3-II and led to a decrease in SQSTM1 levels (Fig. 2B). The combination with BafA1 resulted in the accumulation of yellow dots (mCherry⁺/GFP⁺) (Fig. 2A), increased rapamycin-induced LC3-II accumulation and blocked SQSTM1 degradation (Fig. 2B), indicating augmented autophagic flux induced by rapamycin.

As stated above, analysis using IT setting may correct the misinterpretation of AO data caused by the PT setting in those contexts where cell size is altered by a given treatment. As expected, IT setting detected the increase in autophagy induced by rapamycin, which was not detected by the PT setting (Fig. 2C, upper and right graph). Since AO requires acidic organelles to fluoresce red, BafA1 reduced the proportion of positive events in both the IT and PT settings.

If the hypothesis of cell size is correct, PT settings would not detect the full increase in autophagy induced by rapamycin due to cell size reduction. The average of forward scatter (FSC), *i.e.* cell size, of the whole population was reduced by rapamycin from 1342 to 1062 (Fig. 2C, lower panels). Most importantly, a large proportion of the events were FN, *i.e.* considered non autophagic with PT, but autophagic with IT setting (Fig. 2C, upper panels) and the averaged size of FN cells was smaller when compared to the whole population, based on FSC analysis (Fig. 2C, lower panels). Conversely, the few cells that were considered autophagic by PT but not by IT setting, *i.e.* FP, presented higher FSC value than the total and the FN populations of cells.

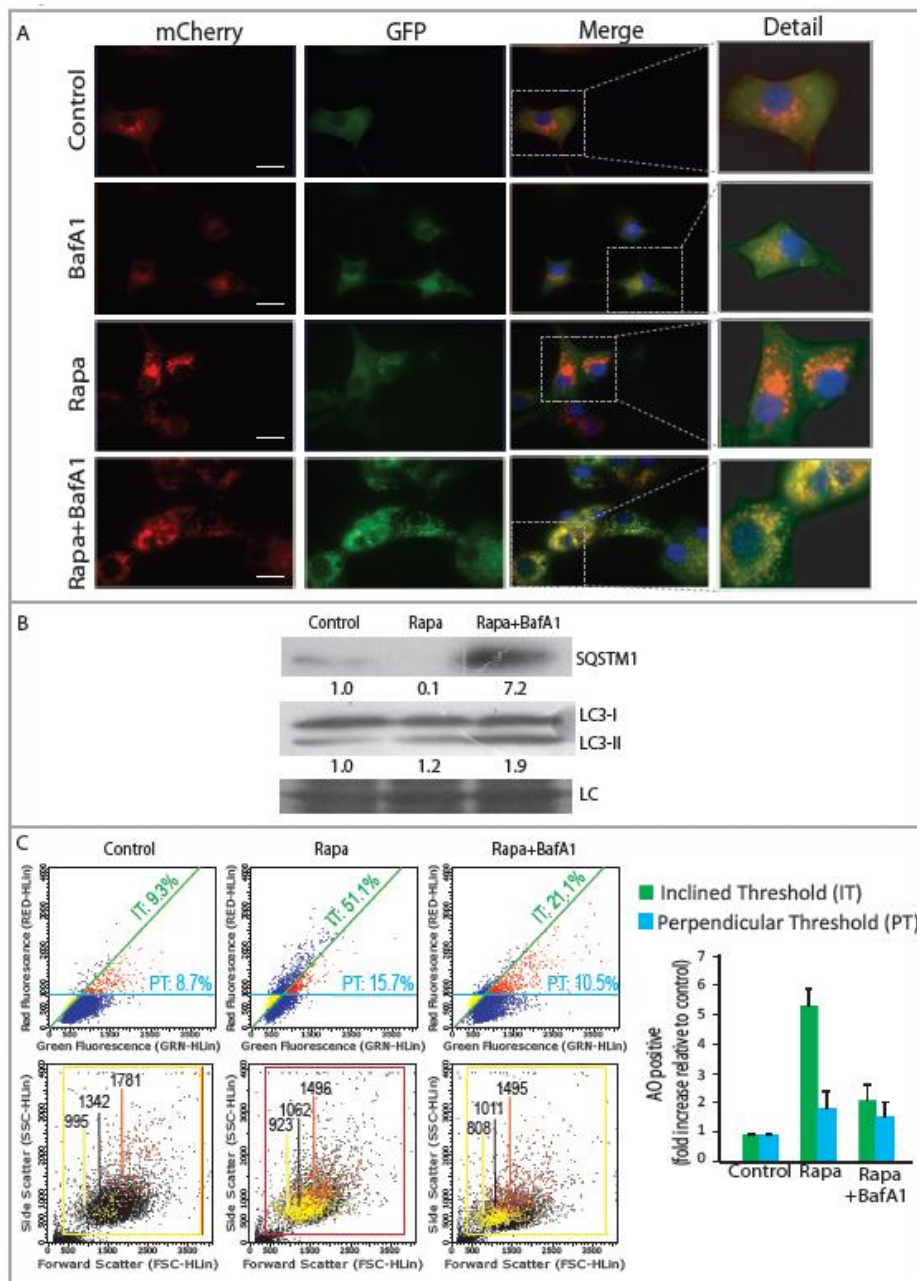


Figure 2 Inclined threshold setting corrects false negatives due to cell size reduction. **(A)** Representative images of U7 tflc3 cells treated with rapamycin 200 nM for 24 h in the presence or absence of BafA1 50 nM in the final 6 h of treatment; **(B)** Representative LC3-I/II and SQSTM1 western blots of knock down U7 cells treated with rapamycin 200 nM for 24 h. Quantification of the relative levels of LC3-II/I and SQSTM1 is shown, relative to control. **(C)** UPPER PANEL: Flow cytometric detection of red and green fluorescence of AO-stained cells analyzed with the threshold perpendicular to the red fluorescence axis (PT) or inclined threshold (IT). Red dots denote FP and yellow dots denote FN events. Values represent the percentage above PT (cyan) or left to IT (green) of the representative experiment shown. LOWER PANEL: FSC x SSC plots highlighting FP and FN events and the average FSC of the total population (black), FN (yellow) and FP (red). RIGHT: Column chart shows the average \pm SEM of the proportion of events considered positive with PT and IT for three independent experiments.

Next, we used a model in which the treatment increases cell size but does not induce autophagy. U251 glioma cells were treated with TMZ, an alkylating agent used in glioma therapy. TMZ 25 μ M and 50 μ M increased the mean FSC of the whole population from 3577 to 4136 and 4451, respectively (Fig 3A, bottom plots). When analyzing the red-to-green fluorescence ratio of AO-stained cells using the IT setting, TMZ treatment did not increase the percentage of cells considered positive (Fig. 3A, upper, green line, and Fig. 3B). However, using the PT setting, TMZ treatment increased the percentage of cells considered positive (Fig. 3A, upper, cyan line and Fig. 3B), which would be misinterpreted as a strong autophagy induction. This was due to a robust increase in the events with higher FSC, which represent the events that surpassed the PT due to cell enlargement and, thus, are considered FP events (Figure 3A, lower, red events). Since this treatment induces cell enlargement, much less FN events were observed here when compared to rapamycin-treated cells (compare yellow events of Fig. 3A and Fig 2C). Indeed, lack of autophagy induction was confirmed by LC3-I to LC3-II conversion and SQSTM1 levels (Fig. 3C), arguing in favor of IT in relation to PT settings.

We next set out to evaluate a cell line in which TMZ treatment not only induces autophagy but also increases cell size. We and others have previously shown that TMZ induces autophagy in several cells, including U87 glioma.^[13,14,15] Autophagy induction was confirmed through GFP-LC3 puncta formation assay (Fig. 4A) and western blot for SQSTM1 and LC3 (Fig. 4B). In cells treated with TMZ 50 μ M and 100 μ M, analysis with PT setting of AO data indicated an increase in AVOs of 330 % and 399 %, respectively, in relation to control, while IT setting indicated an increase of 171 % and 229 %, respectively (Fig. 4C). Results from GFP-LC3 puncta, SQSTM1 and LC3 I/II conversion correlated better with AO results using IT setting (Fig 4D - top) in relation to PT setting (Fig. 4D - middle). It is interesting to notice that the correlations between the specific methods used to assess autophagy were similar to the correlations of AO results using IT with those methods (Fig. 4D - bottom). Similarly to what was observed for U251 cells, in U87 cells the FN population had a smaller FSC value than the whole population, while FP events had a higher FSC value (Supp. Fig. 1), further supporting

the hypothesis that cell size is central to the misidentification of autophagy by the PT setting in AO analysis.

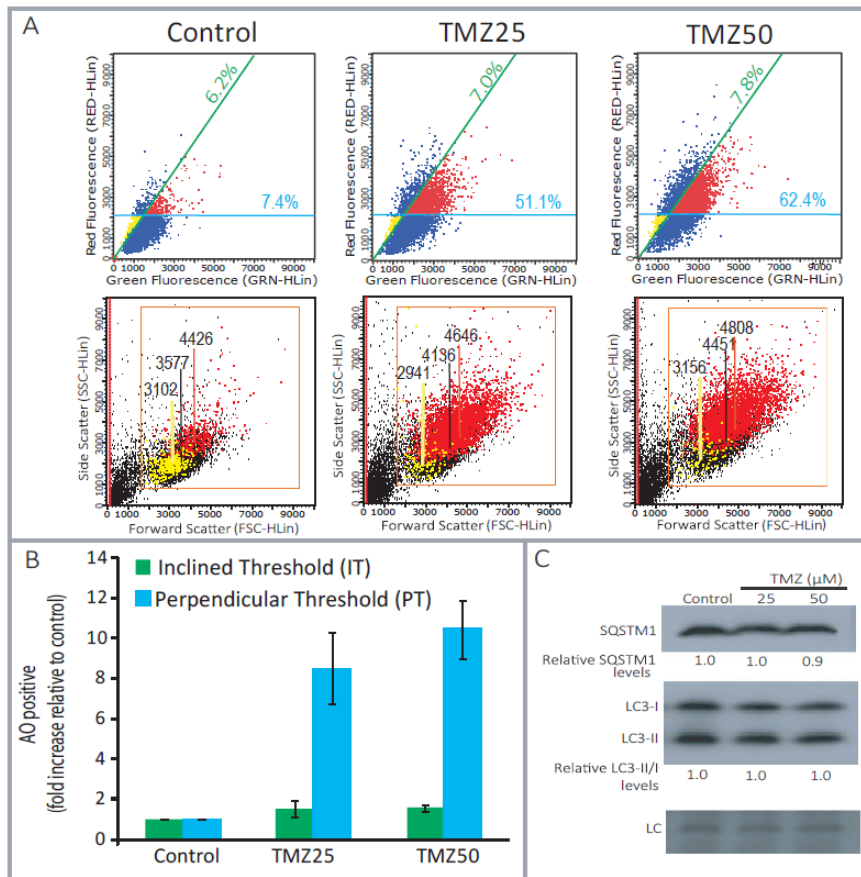


Figure 3 IT setting corrects false positives due to cell size increase. **(A)** UPPER PANEL: Flow cytometric detection of red and green fluorescence in AO-stained U251 cells untreated or treated with TMZ 25 μ M or TMZ 50 μ M for 72 h, and analysis using IT (green) and PT (cyan). Values represent the percentage above PT or left to IT of the representative experiment shown. FP are shown as red dots and FN as yellow dots. LOWER PANEL: FSC x SSC plots highlighting FP and FN events and the average FSC of the total population (black), FN (yellow) and FP (red). **(B)** Column chart with the relative increase in the percentage of events considered positive with PT and IT for three independent experiments. **(C)** LC3-I/II and SQSTM1 westerns blots. Quantification of the relative levels of LC3-II/I and SQSTM1 is shown, relative to control.

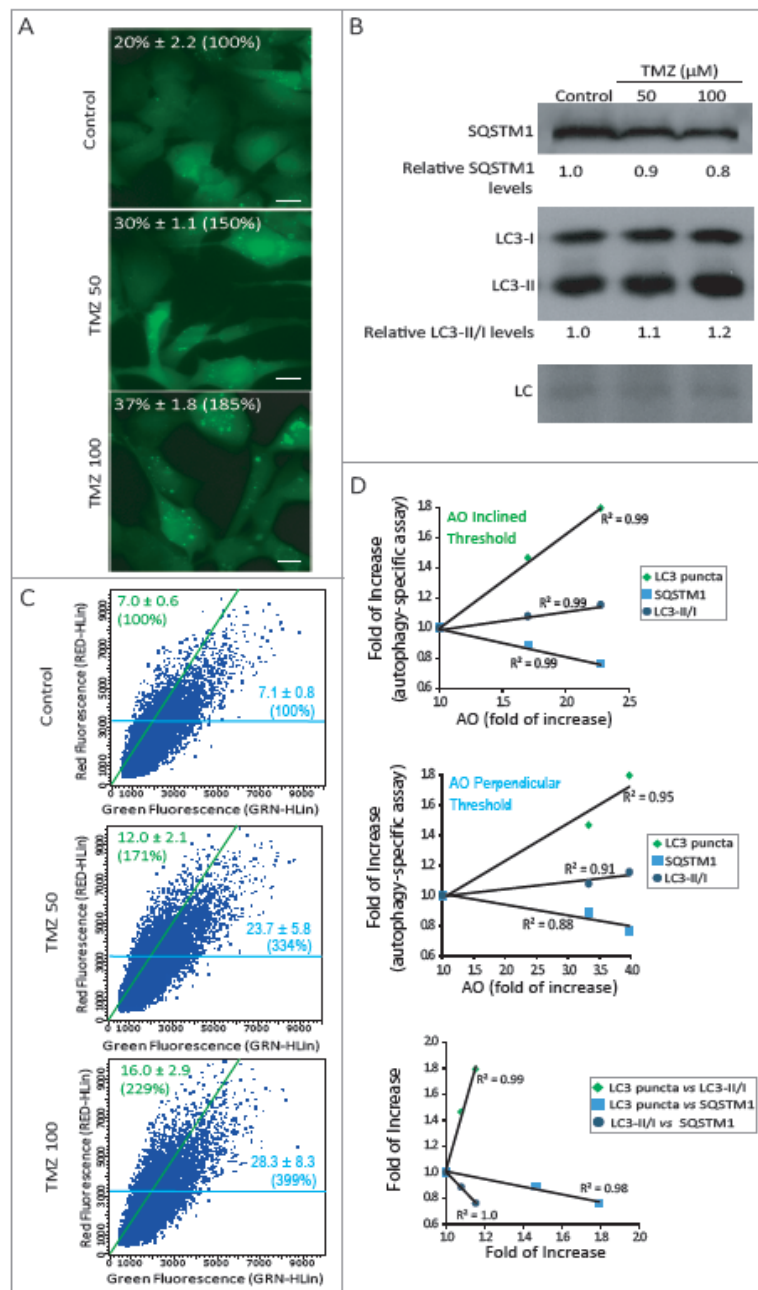


Figure 4 Autophagy-specific assays correlate better with IT in relation to PT setting. **(A)** Representative micrographs of GFP-LC3 puncta formation analysis in U87 cells stably expressing GFP-LC3 protein in untreated cells and cells treated with TMZ 50 μM or TMZ 100 μM for 48 h. **(B)** Representative western blots showing the expression of SQSTM1 and LC3-I/II. The values indicate the quantification of relative LC3-I/II and SQSTM1 levels, relative to control. **(C)** Flow cytometric detection of red and green fluorescence in AO-stained cells and quantification of autophagy induction using PT (cyan) and IT (green) setting. FSC means for all, UR and LL quadrants events are shown. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. **(D)** Correlation between LC3-I/II conversion, SQSTM1 degradation and GFP-LC3 puncta formation and results with AO staining analyzed by both IT (top graph) and PT setting (middle graph). Bottom - correlation between LC3-I/II conversion, SQSTM1 degradation and GFP-LC3 puncta formation results. The data represent the mean ± SEM of three independent experiments.

A new way to present acridine orange results to improve data interpretation

To further improve interpretation AO flow cytometry data, we propose the presentation of this kind of data concurrently plotting the percentage and fluorescence intensity of the 'red-to-green' positive cells in the x axis and y axis, respectively (Fig. 5). As an example, we present autophagy induction in U87 cells acutely treated with TMZ, followed by cell replating in drug-free medium.^[16] The advantages of visualizing AO data this way are made clear by the shift seen between the days 4 and 5. In this interval, the proportion of positive cells remained unchanged while the red-to-green fluorescence intensity of the positive population increased, suggesting that the cells considered autophagic at day 4 increased their average content of AVOs at day 5, however AVO mass of the negative cells was not enhanced to pass the threshold and become positive. Treating the cells at day 5 with rapamycin increased both the percentage of positive cells and the red-to-green fluorescence ratio intensity, suggesting that cells not considered positive prior to rapamycin treatment became positive and that the amount of AVOs *per cell* also increased in the positive population. This information is only clear with single cell methods such as cytometric analysis with AO, which would be lost in methods based on cell lysates, or would require extensive data analysis of electron or fluorescent microscopy data, being subjected to bias in the analysis.

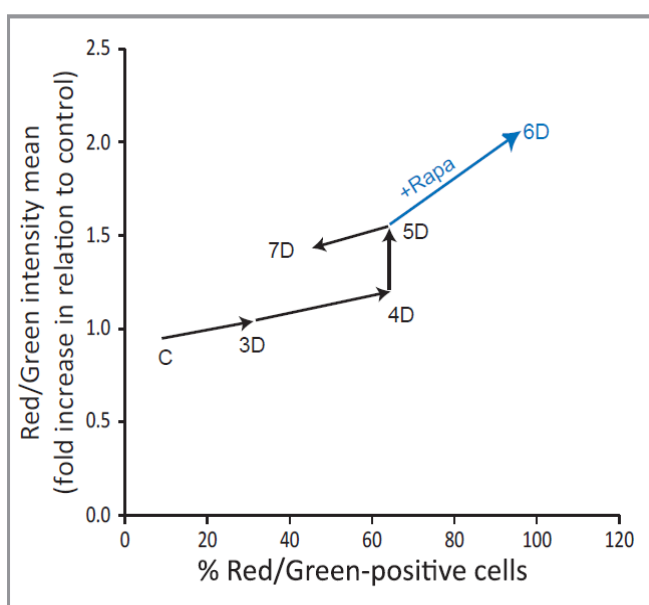


Figure 5 New way of portraying AO data. U87 cells were acutely treated with a TMZ 100 μ M for 3 h followed by replating in drug-free medium (DFM) for 3, 4, 5 and 7 days. In these days cells were analysed with AO (indicated by 3D, 4D, 5D and 7D). Data are presented as percentage of 'red/green positive' cells (x axis), using IT and the red-to-green mean intensity of the AO-positive population (y axis). Blue line shows the effect of rapamycin added at day 5 and analyzed at day 6.^[16]

Discussion

We validated that the ratiometric analysis of AO data measures autophagy induced by the well-established treatment rapamycin as well as TMZ in U87 cells. This autophagy induction was blocked both genetically and pharmacologically. In addition, we showed that AO data provided accurate results in accordance to methods commonly used to measure autophagy.

When AO data was analyzed by the proposed IT setting, results correlated much better with other well-established methods for quantifying autophagy, namely GFP-LC3 puncta, LC3-I/II conversion and SQSTM1 degradation. We established that the increase in cell size is the main cause of FP and cell size reduction is the main cause of FN when analyzing with the threshold setting based solely on red fluorescence intensity. This effect of cell size can be easily corrected by the ratiometric analysis of AO fluorescence, *i.e.* the use of the IT setting in the analysis of AO data.

Additionally, we suggest the presentation in the same plot of both the percentage of 'red-to-green positive' cells and the averaged intensity of this red-to-green fluorescence ratio. This allows a good view of the effect of a given treatment over time, concerning the number of cells that pass from a non-autophagic to an autophagic state as well as the mass of AVOs that is formed by AO-positive cell population.

The availability of an accurate flow cytometry marker that does not require a genetically encoded reporter represents a useful tool for quantifying autophagy for high throughput screening. Here, we propose a ratiometric analysis of AO data to make it more trustworthy, meaningful and easy to assess the late autophagic step. Similarly to the rationale behind tfLC3 to measure autophagic flux, high levels of acidic compartments detected through this improved AO analysis can give an indirect assessment of autophagic flux. Although, it is important to highlight that AO, similarly to other fluorescent dyes, such as LysoTracker,^[17] detects increase in the acidic compartments of the cell and conditions that alter these compartments without affecting autophagy may lead to misinterpretation, and therefore AO analysis must be accompanied by other assays to specifically confirm autophagy modulation.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Anti-LC3B, anti-SQSTM1/p62, anti-Atg7 and anti-Beclin-1 were purchased from Cell Signaling Technology. Rapamycin, BafA1, TMZ, Hoechst 33258 and the fluorescent dye acridine orange hemi(zinc chloride) salt (Sigma-Aldrich, 158550) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Rapamycin, BafA1 and TMZ were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Acros Organics, NJ, USA), Hoechst and AO were dissolved in water. All culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

Cell culture and treatments

U87 and U251 human glioma cell lines were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC). U87 cells, permanently expressing the protein LC3 fused with GFP, elsewhere described U87 GFP-LC3, were kindly provided by Carlos F. Menck. Cell lines were cultured in DMEM low glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin/streptomycin and 0.1 % amphotericin B at 37 °C and 5 % CO₂ in a humidified incubator. Cells were treated with rapamycin 200 nM for 24 h. When indicated, BafA1 50 nM was added for the final 6 h of treatment with rapamycin. U251 cells were treated for 72 h and U87 GFP-LC3 for 48 h in the indicated concentrations of TMZ.

Generation of stable cell lines with retroviral/lentiviral infection

U87 cells stably expressing the tandem fluorescent-tagged LC3 (mCherry-GFP-LC3), described as U87 tFLC3, were generated by retroviral infection. Retrovirus-expressing U87 cells were selected with puromycin 7.4 μM (4 μg/ml) to generate stable pools. *BECN1* and *ATG7* genes were knocked down by transduction of U87 cells with lentivirus vectors produced with the plasmid clone NM_019584.2-970s1c1 and NM_028835.3-1655s21c1, respectively, from the Mission RNAi library from Sigma-Aldrich. Non-target (pLKO.1-puro) sequence was used as a control. Lentiviruses were produced as described previously.^[18] Knock down was confirmed by western blot. Cell

viability in both knockdown cells in relation to wild type and scrambled shRNA control cells was not altered (shCtrl) (data not shown).

Autophagy detection and quantification by acridine orange staining

To quantify the development of AVOs, we performed AO staining as described previously.^[13,19,20] Briefly, cells were collected by trypsinization, stained with AO 2.7 μM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 min at room temperature and analyzed on a GUAVA EasyCyte flow cytometer using InCyte 2.6 software (Guava Technologies). Perpendicular threshold rely on quantifying the development of AVOs setting a threshold perpendicular to the red fluorescence axis, considering as positive those events placed above this threshold. Our proposal is to set an inclined threshold (IT) along the population axis, so that the red-to-green fluorescence ratio, rather than only the red fluorescence, is considered, which may be determined by a linear equation $y = ax + b$, where the slope (a) can be set according to the population distribution and b is ideally zero.

Western Blot Analysis

Analysis of protein levels was performed as described previously with minor modifications.^[13] Briefly, cells were lysed, protein concentration was quantified by QuantiPro BCA Assay Kit. Thirty μg of protein extracts were separated on 15% SDS-PAGE, followed by electrotransfer to a PVDF membrane (Millipore, IPVH00010). Then membranes were blocked with non-fat dry milk and incubated overnight at $+4^{\circ}\text{C}$ with primary antibody for LC3B (Cell Signaling, 3868) and SQSTM1/p62 (Cell Signaling, 5114), both in 1:1000 dilution. Primary antibody was detected by using a horseradish peroxidase (HRP) linked-secondary antibody (Cell Signaling, 7074), 1:2000 dilution for 2h, followed by ECL and X-ray films exposition (Kodak-Xmat). Optical densities of the bands were obtained and quantified using ImageJ Software.

GFP-LC3 puncta formation assay

U87 GFP-LC3 cells present a diffuse green fluorescence under non-autophagic conditions, whereas a punctuate pattern of GFP-LC3 aggregation (GFP-LC3 dots) is shown when autophagy is triggered. U87 GFP-LC3 cells were fixed with 4 %

paraformaldehyde and imaged under an inverted fluorescence microscope with a 40 x objective. Numbers of autophagic cells were obtained by counting the number of cells with at least 5 green dots *per cell* among, at least, 300 cells *per treatment*.

Live-cell imaging of U87 tfLC3 cells

Live-cell imaging was performed for qualitative autophagic flux induction analysis. U87 tfLC3 cells were plated on uncoated glass coverslips and cultured for 2 days before treatments. Nuclei were stained with Hoechst 33258 3.7 μM (2 $\mu\text{g/ml}$) incubated directly in the culture media for the last 30 min before imaging. Imaging was performed on an inverted fluorescence microscopy with a 100 x oil immersion objective. Images were processed using ImageJ software.

Acknowledgements

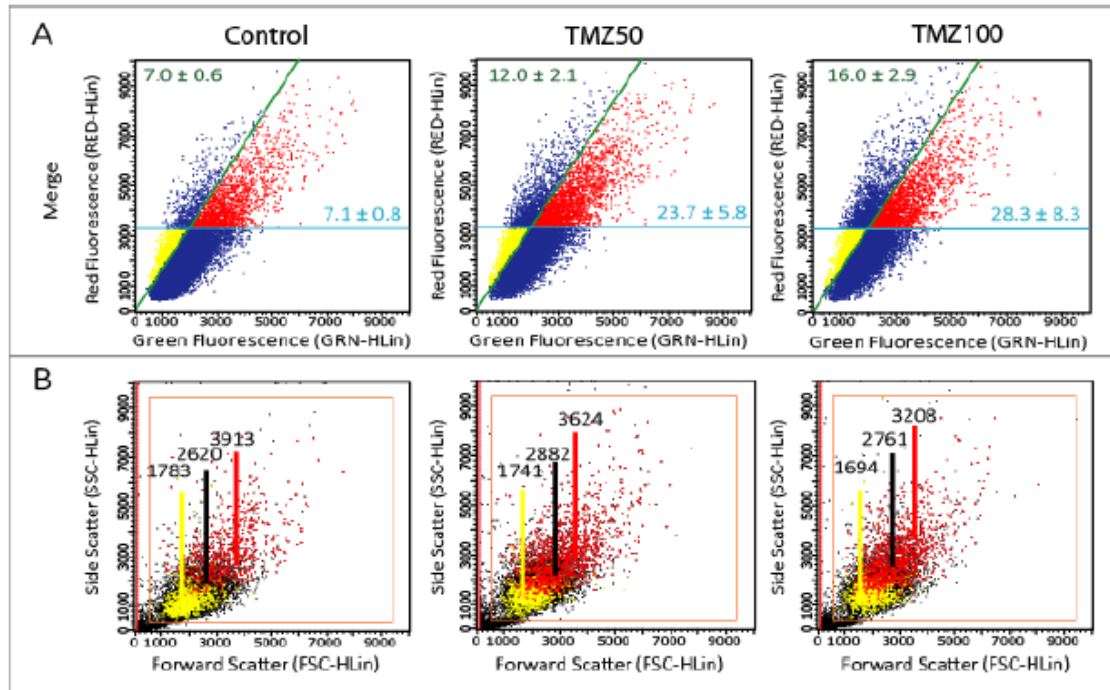
We thank to Carlos F. Menck and Alexandre T. Vessoni for U87 GFP-LC3 cells and Alexandra Vigna for reviewing the manuscript. This work was supported by CNPq, 472512/2011-0; ICGEB BRA11/01, Pronex-Fapergs 10/0044-3 and FAPERGS/PRONEN 11/2072-2. MPT, ECFC, KBF, CBM and GL are recipients of CNPq fellowships and ESV is recipient of CAPES fellowship.

DISCLOSURE STATEMENT: The authors declare no conflicts of interest.

References

- (1) Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, et.al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:4, 445-544.
- (2) Swanlund JM, Kregel KC, Oberley TD. Investigating autophagy: quantitative morphometric analysis using electron microscopy. *Autophagy* 2010; 6: 270-277.
- (3) 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* 2000; 19: 5720-5728.
- (4) Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 2007; 3: 452-460.
- (5) Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140: 313-326.
- (6) Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 323-334.
- (7) Traganos F, Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol* 1994; 41: 185-194.
- (8) Robbins E, Marcus PI. Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. *J Cell Biol* 1963; 18: 237–250.
- (9) Robbins E, Marcus PI, Gonatas NK. Dynamics of acridine orange-cell interaction II. Dye-induced ultrastructural changes in multivesicular bodies (acridine orange particles). *J Cell Biol* 1964; 21: 49-62.
- (10) Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 2009; 16: 70–78.
- (11) Fader CM, Sanchez D, Furlan M, Colombo MI. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 2008; 9: 230–250.

-
- (12) Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002; 16: 1472–1487.
- (13) Filippi-Chiela, EC; Thomé, MP; Bueno e Silva, MM; Pelegrini, AL; Ledur, PF; Garicochea, B; Zamin, LL; Lenz, G. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* 2013; 13: 147-160.
- (14) Natsumeda M, Aoki H, Miyahara H, Yajima N, Uzuka T, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Fujii Y. Induction of autophagy in temozolomide treated malignant gliomas. *Neuropathology* 2011; 31: 486–493.
- (15) 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 Differ* 2007; 14: 548-558.
- (16) Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thome MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 2015.
- (17) Chikte S, Panchal N, Warnes G. Use of LysoTracker dyes: a flow cytometric study of autophagy. *Cytometry* 2014, 85: 169–178.
- (18) Tamajusuku ASK, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battastini AMO, Wink MR, Lenz G. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010; 109: 983-991.
- (19) Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004, 11: 448-457.
- (20) Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL, Lenz G. Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *Plos One* 2011; 6: 20849.



Supplementary Figure 1 Detection of autophagy induction in TMZ-treated U87 cells. Detection of red and green fluorescence in AO-stained cells using flow cytometry in untreated cells and cells treated with TMZ 50 μ M or TMZ 100 μ M for 48 hours. (A) Representative flow cytometry dot plots and quantification of autophagy induction are shown merging the two threshold settings (PT, cyan and IT, green). Percentages represent the proportion considered positive for each setting; (B) FSC x SSC plots highlighting events from Upper Right and Lower Left quadrants from plot A. FSC means for all (black), Upper Right (red) and Lower Left (yellow) quadrants events are shown.

7 Resultados adicionais

Conforme mencionado anteriormente, este trabalho foi submetido ao periódico *Autophagy* e dentre os pontos levantados pelos revisores estão as seguintes sugestões: 1. Mostrar a utilidade do método para avaliação da indução de autofagia em células primárias; 2. Demonstrar as reais vantagens da abordagem proposta para quantificação, separando células de maior e menor atividade autofágica pela marcação com AO, e comparar entre essas populações as diferenças entre autofagossomos e autolisossomos por microscopia eletrônica.

Os resultados parciais para responder essas questões estão apresentados a seguir e após finalizados serão incorporados ao manuscrito para ressubmissão para a mesma revista.

i. Detecção da indução de autofagia em culturas primárias pela marcação com AO

Para abordar a questão da validade da marcação com AO para detectar indução de autofagia em culturas primárias, foram utilizados fibroblastos isolados de pele e de pulmão de rato Wistar adulto e células tronco mesenquimais humanas isoladas de gordura. Para indução de autofagia foi utilizado o tratamento com Rapamicina 200 nM, o indutor clássico de autofagia, por 24 h para culturas murinas e 48 h para cultura humana.

Pela análise da marcação com AO foi possível observar o aumento do desenvolvimento de AVOs em todas as culturas primárias, conforme apresentado na Figura 14, reforçando a utilidade da marcação com AO para detecção da indução de autofagia mesmo em culturas primárias.

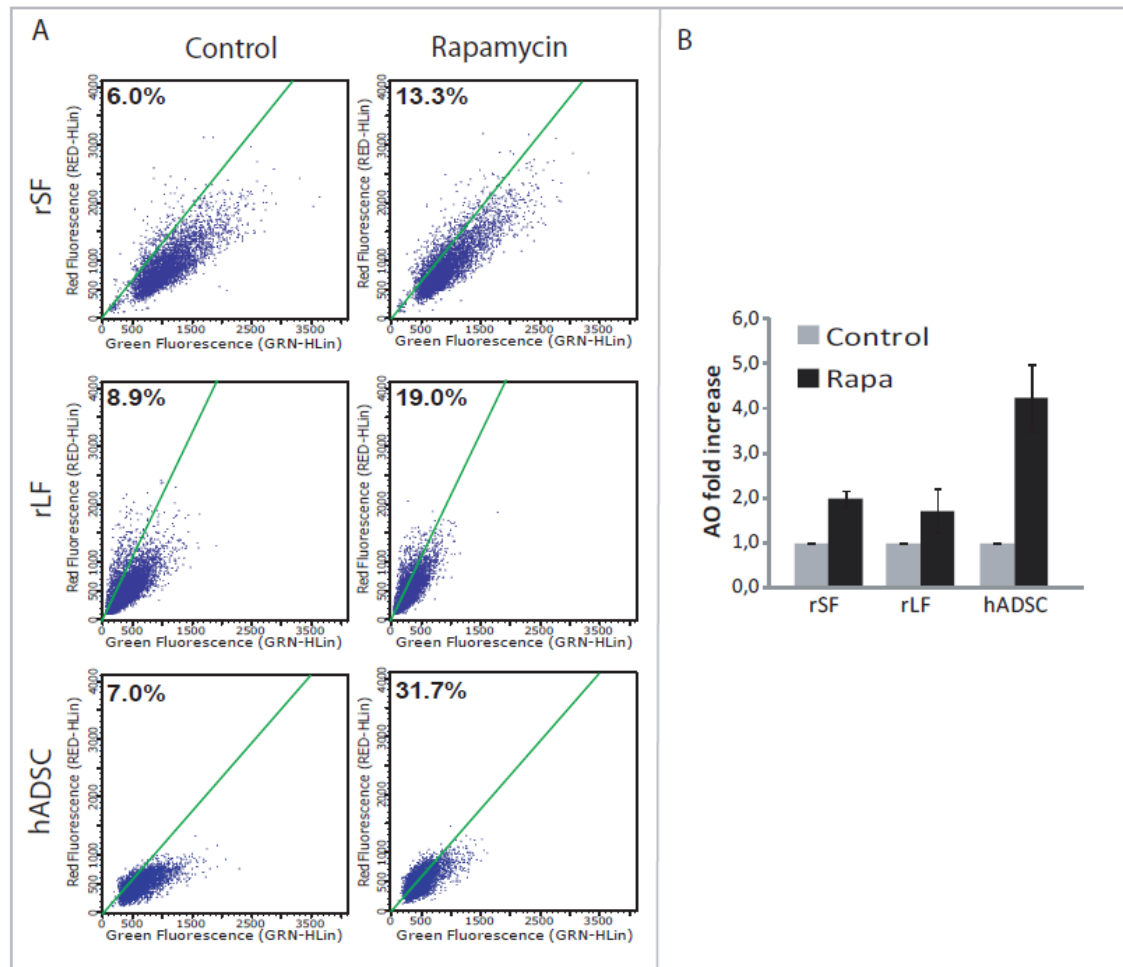


Figura 14 – Avaliação da indução de autofagia em culturas de células primárias pela marcação com AO. (A) Plotagens representativas da detecção por citometria de fluxo das fluorescências verde e vermelha em células marcadas com AO, indicando a quantificação da formação de AVOs. (B) Gráfico de barras mostrando a média \pm DP do aumento da proporção de células positivas em relação ao controle para três experimentos independentes. rSF – Fibroblastos murinos derivados da pele; rLF – Fibroblastos murinos derivados do pulmão; hADSC – Células tronco mesenquimais humanas derivadas de gordura.

ii. ***Fluorescence activated cell sorting – FACS – de populações marcadas com AO***

Essa abordagem tem o objetivo de mostrar diferenças nos níveis de autofagia comparando as populações de maior e menor atividade autofágica na detecção da marcação com AO, que serão aqui chamadas populações '*high autophagy/P+*' e '*low autophagy/P-*'. Para isso, foram utilizadas células U87 tratadas com rapamicina nas mesmas condições apresentadas no capítulo do artigo científico. As células marcadas com AO tiveram suas fluorescências verde e vermelha detectadas em um citômetro BD FACSAria III e a quantificação da marcação foi feita utilizando o software BD FACSDiva.

O tratamento com rapamicina provocou um aumento da população positiva em 6,3 vezes em relação ao controle (Controle - 12,9 %; Rapamicina 81,6 %) (Fig. 15A), consistente com os resultados previamente obtidos e apresentados na Figura 2C do artigo. Para as células tratadas foram delimitados dois *gates*: 'P+' (que representa as células com maior atividade autofágica) e 'P-' (com menor atividade autofágica) (Fig. 15A – direita). Essas duas populações foram separadas por FACS e coletadas em solução de lise desnaturante para avaliação por *western blot* do perfil de proteínas envolvidas no processo autofágico. Ao final da separação, uma fração das populações P+ e P- foram coletadas para avaliar a pureza e eficiência da separação (Fig. 15B), ficando clara a diferença entre elas. Observou-se um leve deslocamento para a esquerda e para baixo no gráfico para ambas as populações, indicando a perda de fluorescência, que possivelmente se justifica por essas células já terem sido previamente excitadas pelo laser, provocando redução da fluorescência do marcador, ou pelo fato de estar sendo avaliado um processo dinâmico em células vivas e essas terem alterado seu estado autofágico ao longo da separação.

Adaptamos a recomendação do revisor e realizaremos avaliação por *western blot* das proteínas LC3-I/II e SQSTM1/p62, comparando as diferentes populações provenientes de FACS. Um resultado preliminar mostra a diferença do nível da proteína LC3-II entre o controle e a população P+ mostrando, conforme esperado, um acúmulo nessa última (Fig. 15C). Pretendemos mostrar diferenças LC3-I/II e para p62 entre as populações P+ e P-, para assim confirmar plenamente as vantagens desta abordagem para quantificar os dados provenientes da marcação com AO.

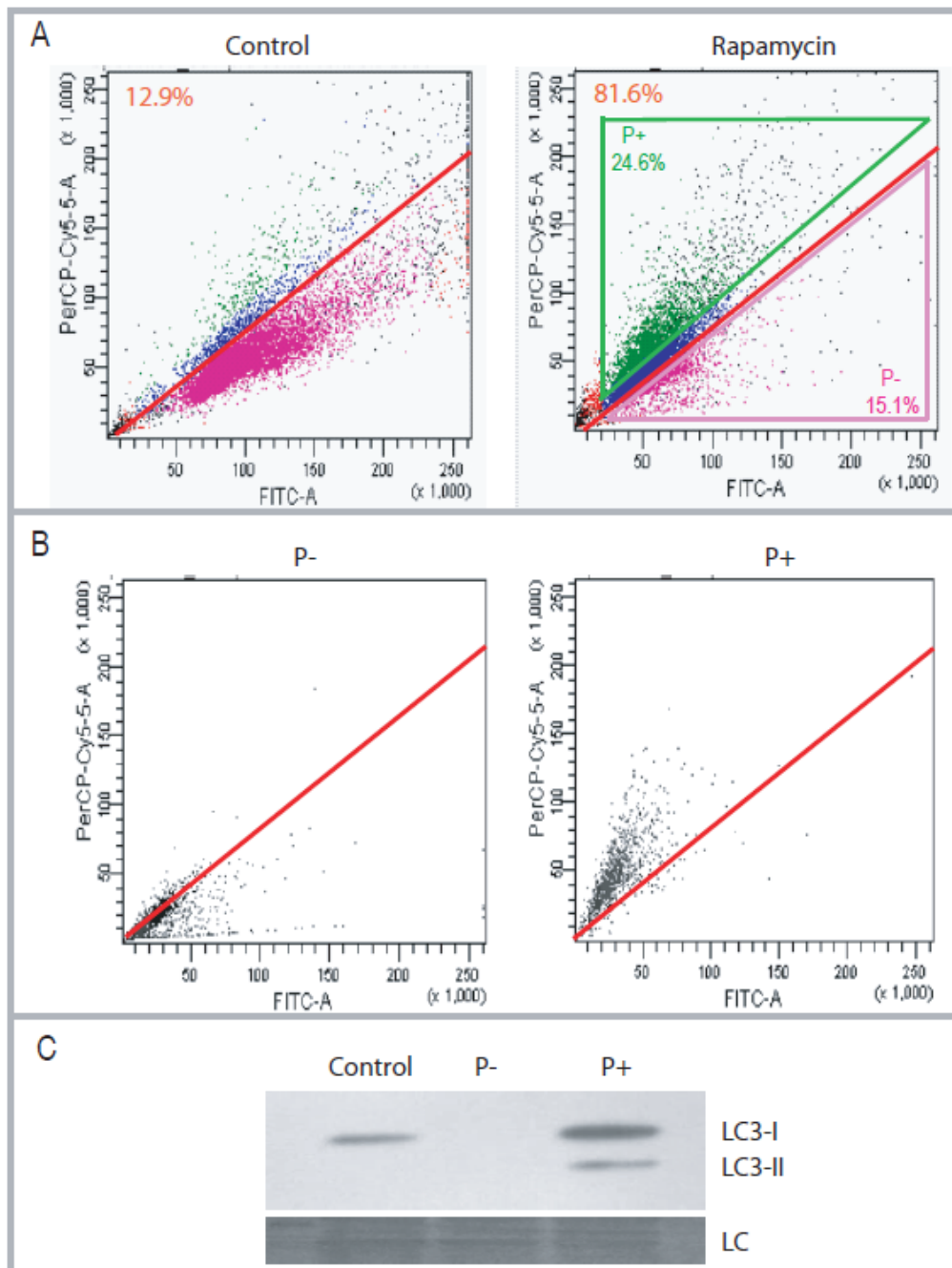


Figura 15 – FACS de células marcadas com AO. (A) Quantificação da indução de autofagia por rapamicina em células U73 – limiar vermelho – e delimitação dos gates para separação por FACS das populações P- e P+, que representam as populações com maior e menor atividade autofágica, respectivamente; (B) Análise pós FACS das populações P- e P+; (C) Detecção por *western blot* da proteína LC3-I/II das populações controle, P- e P+.

8 Discussão

O estudo de autofagia tem sido de grande interesse nos últimos anos dado o reconhecimento deste mecanismo celular estar envolvido em processos fisiológicos e patológicos. Consequentemente, existe uma necessidade crescente do aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas ferramentas para detectar com precisão a autofagia em sistemas biológicos, especialmente em células de mamíferos. Isso favorecerá uma melhor compreensão do envolvimento da autofagia nos processos biológicos, permitindo sua manipulação para fins terapêuticos.

Foi demonstrado na década de 1960 por Elliott Robbins e colaboradores que AO acumula e emite fluorescência em vesículas intracelulares, inicialmente chamadas 'partículas de laranja de acridina', e posteriormente mostradas que representavam corpos multivesiculares (Robbins e Marcus, 1963; Robbins *et al.*, 1964). Com o avanço nos estudos de autofagia mostrou-se que corpos multivesiculares se fundem com autofagossomos e em seguida ocorre a degradação do material interno dessa organela pela via lisossomal (Fader e Colombo, 2009). Isso torna AO uma sonda atrativa para a avaliação da etapa final da autofagia e aperfeiçoamentos na técnica favorecerão sua maior utilização.

O presente trabalho teve como principal objetivo demonstrar que o marcador AO é uma sonda que pode ser utilizada para medir autofagia, desde que sejam consideradas as possíveis alterações celulares que influenciam em sua incorporação e marcação. Para essa correção, sugerimos a análise da relação entre fluorescências verde e vermelha, a qual denominamos 'análise relativa de AO', ao contrário da análise usual, que é feita levando em conta somente a fluorescência vermelha.

Validamos que a análise relativa de AO é capaz de detectar a indução de autofagia em linhagens celulares e em culturas primárias. Além disso, com esta análise mostramos o bloqueio genético e farmacológico da autofagia, a qual teve resultados de acordo com os métodos mais comumente utilizados para detectar autofagia. Também mostramos que a análise relativa de AO gera resultados que correlacionam melhor com esses outros métodos, quando comparada com a análise usual da fluorescência vermelha absoluta, pois é capaz de corrigir resultados falso positivos ou

falso negativos desse último tipo de análise, tornando essa abordagem útil para avaliação da modulação de autofagia por tratamentos que provocam alteração do tamanho celular.

Por ser um método quantitativo e dada a sua facilidade de utilização, esperamos que o marcador AO tenha uma melhor aceitação e maior utilização como um método de triagem no estudo de autofagia, sempre acompanhado por outros ensaios específicos para corroborar os resultados.

9 Referências

- ARIAS, E.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 2, p. 184-9, Apr 2011. ISSN 1879-0410
- BJORKOY, G. et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **J Cell Biol**, v. 171, n. 4, p. 603-14, Nov 21 2005. ISSN 0021-9525
- DICE, J. F. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 8, p. 5, 1990.
- DICE, J. F. Chaperone-mediated autophagy. **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 295-9, Jul-Aug 2007. ISSN 1554-8627
- FADER, C. M.; COLOMBO, M. I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 70-8, Jan 2009. ISSN 1476-5403
- FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. **Cell Res**, v. 24, n. 1, p. 24-41, Jan 2014. ISSN 1748-7838
- FIMIA, G. M. et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1121-5, Jun 28 2007. ISSN 1476-4687
- FINGAR, D. C. et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. **Genes Dev**, v. 16, n. 12, p. 1472-87, Jun 15 2002. ISSN 0890-9369
- FUJITA, N. et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. **Mol Biol Cell**, v. 19, n. 5, p. 2092-100, May 2008. ISSN 1939-4586
- FURUYA, N. et al. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. **Autophagy**, v. 1, n. 1, p. 46-52, Apr 2005. ISSN 1554-8627
- GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **EMBO J**, v. 34, n. 7, p. 856-80, Apr 1 2015. ISSN 1460-2075
- HAILEY, D. W. et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656-67, May 14 2010. ISSN 1097-4172
- HAMASAKI, M. et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 389-93, Mar 21 2013. ISSN 1476-4687
- HOSOKAWA, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 7, p. 1981-91, Apr 2009. ISSN 1939-4586
- HOYER-HANSEN, M. et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. **Mol Cell**, v. 25, n. 2, p. 193-205, Jan 26 2007. ISSN 1097-2765
- ICHIMURA, Y. et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 488-92, Nov 23 2000. ISSN 0028-0836
- ITAKURA, E.; MIZUSHIMA, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. **Autophagy**, v. 6, n. 6, p. 764-76, Aug 2010. ISSN 1554-8635

- KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J**, v. 19, n. 21, p. 5720-8, Nov 1 2000. ISSN 0261-4189
- KAPUSCINSKI, J.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Interactions of acridine orange with nucleic acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 24, p. 16, 1983.
- KIHARA, A. et al. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol**, v. 152, n. 3, p. 519-30, Feb 5 2001. ISSN 0021-9525
- KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 132-41, Feb 2011. ISSN 1476-4679
- KIRISAKO, T. et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. **J Cell Biol**, v. 151, n. 2, p. 263-76, Oct 16 2000. ISSN 0021-9525
- KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 4, p. 445-544, Apr 2012. ISSN 1554-8635
- KUMA, A. et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, v. 432, n. 7020, p. 1032-6, Dec 23 2004. ISSN 1476-4687
- KUSUZAKI, K. et al. Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells. **Anticancer Res**, v. 20, n. 2A, p. 971-5, Mar-Apr 2000. ISSN 0250-7005
- LINDMO, K.; STENMARK, H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 4, p. 605-14, Feb 15 2006. ISSN 0021-9533
- LUM, J. J. et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, v. 120, n. 2, p. 237-48, Jan 28 2005. ISSN 0092-8674
- MARI, M. et al. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. **J Cell Biol**, v. 190, n. 6, p. 1005-22, Sep 20 2010. ISSN 1540-8140
- MIJALJICA, D.; PRESCOTT, M.; DEVENISH, R. J. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. **Autophagy**, v. 7, n. 7, p. 673-82, Jul 2011. ISSN 1554-8635
- MIJALJICA, D.; PRESCOTT, M.; DEVENISH, R. J. The intriguing life of autophagosomes. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 3, p. 3618-35, 2012. ISSN 1422-0067
- MIZUSHIMA, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 132-9, Apr 2010. ISSN 1879-0410
- MIZUSHIMA, N.; KLIONSKY, D. J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. **Annu Rev Nutr**, v. 27, p. 19-40, 2007. ISSN 0199-9885
- MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B. Autophagy in mammalian development and differentiation. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 823-30, Sep 2010. ISSN 1476-4679
- MIZUSHIMA, N. et al. A protein conjugation system essential for autophagy. **Nature**, v. 395, n. 6700, p. 395-8, Sep 24 1998. ISSN 0028-0836
- MIZUSHIMA, N. et al. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. **J Biol Chem**, v. 273, n. 51, p. 33889-92, Dec 18 1998. ISSN 0021-9258

- MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in mammalian autophagy research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313-26, Feb 5 2010. ISSN 1097-4172
- OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 3, p. 211-6, Mar 2001. ISSN 1471-0072
- PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 3, p. 460-73, Jan 20 2014. ISSN 1557-7716
- PURI, C. et al. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1285-99, Sep 12 2013. ISSN 1097-4172
- RAVIKUMAR, B.; MOREAU, K.; RUBINSZTEIN, D. C. Plasma membrane helps autophagosomes grow. **Autophagy**, v. 6, n. 8, p. 1184-6, Nov 2010. ISSN 1554-8635
- REGGIORI, F. et al. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. **Dev Cell**, v. 6, n. 1, p. 79-90, Jan 2004. ISSN 1534-5807
- ROBBINS, E.; MARCUS, P. I. Dynamics of Acridine Orange-Cell Interaction. I. Interrelationships of Acridine Orange Particles and Cytoplasmic Reddening. **J Cell Biol**, v. 18, p. 237-50, Aug 1963. ISSN 0021-9525
- ROBBINS, E.; MARCUS, P. I.; GONATAS, N. K. Dynamics of Acridine Orange-Cell Interaction. II. Dye-Induced Ultrastructural Changes in Multivesicular Bodies (Acridine Orange Particles). **J Cell Biol**, v. 21, p. 49-62, Apr 1964. ISSN 0021-9525
- RUSSELL, R. C.; YUAN, H. X.; GUAN, K. L. Autophagy regulation by nutrient signaling. **Cell Res**, v. 24, n. 1, p. 42-57, Jan 2014. ISSN 1748-7838
- SANTAMBROGIO, L.; CUERVO, A. M. Chasing the elusive mammalian microautophagy. **Autophagy**, v. 7, n. 6, p. 652-4, Jun 2011. ISSN 1554-8635
- SHAIKH, M. et al. Complexation of acridine orange by cucurbit[7]uril and beta-cyclodextrin: photophysical effects and pKa shifts. **Photochem Photobiol Sci**, v. 7, n. 4, p. 408-14, Apr 2008. ISSN 1474-905X
- SHINTANI, T. et al. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. **EMBO J**, v. 18, n. 19, p. 5234-41, Oct 1 1999. ISSN 0261-4189
- STEPHAN, J. S. et al. The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **Autophagy**, v. 6, n. 2, p. 294-5, Feb 2010. ISSN 1554-8635
- SUZUKI, K. et al. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. **EMBO J**, v. 20, n. 21, p. 5971-81, Nov 1 2001. ISSN 0261-4189
- TAKAHASHI, Y. et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 10, p. 1142-51, Oct 2007. ISSN 1465-7392
- TAKAHASHI, Y. et al. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. **Autophagy**, v. 7, n. 1, p. 61-73, Jan 2011. ISSN 1554-8635
- TANIDA, I. et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. **Autophagy**, v. 1, n. 2, p. 8, 2001.

TANIDA, I. et al. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. **Mol Biol Cell**, v. 10, n. 5, p. 1367-79, May 1999. ISSN 1059-1524

TANIDA, I. et al. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3. **FEBS J**, v. 273, n. 11, p. 2553-62, Jun 2006. ISSN 1742-464X

TANIDA, I. et al. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. **J Biol Chem**, v. 277, n. 16, p. 13739-44, Apr 19 2002. ISSN 0021-9258

TOOZE, S. A.; YOSHIMORI, T. The origin of the autophagosomal membrane. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 831-5, Sep 2010. ISSN 1476-4679

YAMAMOTO, H. et al. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. **J Cell Biol**, v. 198, n. 2, p. 219-33, Jul 23 2012. ISSN 1540-8140

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. An overview of the molecular mechanism of autophagy. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 335, p. 1-32, 2009. ISSN 0070-217X

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, n. 2, p. 124-31, Apr 2010. ISSN 1879-0410

YLÄ-ANTTILA, P. et al. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. **Autophagy**, v. 5, n. 8, 2009.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1542-52, Nov 2005. ISSN 1350-9047

YOUNG, A. R. et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 18, p. 3888-900, Sep 15 2006. ISSN 0021-9533

ZENG, X.; OVERMEYER, J. H.; MALTESE, W. A. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 2, p. 259-70, Jan 15 2006. ISSN 0021-9533

ZHONG, Y. et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 4, p. 468-76, Apr 2009. ISSN 1476-4679

10 Currículo



Marcos Paulo Thomé

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

Última atualização do currículo em 20/02/2015

Resumo informado pelo autor

Bacharel em Biomedicina com habilitações em Biologia Molecular e Reprodução Humana Assistida, formado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul com período sanduíche na Universidade do Porto. Atualmente é bolsista de mestrado do CNPq pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, desenvolvendo atividade de pesquisa na área de autofagia na terapia tumoral.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Marcos Paulo Thomé
Filiação	Ademir Thomé e Tânia Maria Popielek Thomé
Nascimento	23/08/1991 - Campinas do Sul/RS - Brasil
Endereço profissional	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica Avenida Bento Gonçalves-Prédio 43431, Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular Agronomia - Porto Alegre 90501-970, RS - Brasil Telefone: 051 33087620
Endereço eletrônico	E-mail para contato : marcosp.thm@gmail.com e-mail alternativo : marcosp_thome@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

2013	Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil Orientador: Guido Lenz
	Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
2009 - 2013	Graduação em Biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil com período sanduíche em Universidade do Porto (Orientador : Olga Lage) Título: Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina Orientador: Guido Lenz

Formação complementar

2009 - 2009	Extensão universitária em Identificação Fúngica Laboratorial. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
2002 - 2007	Oral and Written Communication Course. Centro de Cultura Anglo-Americana, CCAA, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2013 - Atual	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado Acadêmico, Regime: Dedicção exclusiva
2012 - 2013	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2010 - 2010	Vínculo: Monitoria Acadêmica , Enquadramento funcional: Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2010 - 2013	Vínculo: Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

08/2012 - 01/2013	Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica <i>Estágio: Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD da disciplina de Biofísica Biomédica III</i>
08/2010 - 12/2010	Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica <i>Estágio: Monitoria Voluntária na disciplina de Biofísica Biomédica I (BIO10013).</i>
04/2010 - 08/2013	Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica <i>Estágio: Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular</i>

03/2010 - 07/2010 Estágio, Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, Departamento de Ciências Morfológicas
Estágio:
Bolsista de Monitoria Acadêmica PROGRAD da disciplina de Anatomia Humana I para Biomedicina (CBS05032)

07/2009 - 10/2009 Estágio, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos
Estágio:
Estágio Voluntário de Iniciação Científica. Ênfase em microbiologia e biologia molecular.

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

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Atividade didática orientada , Enquadramento funcional: Estágio de docência, Regime: Parcial

Atividades

08/2014 - 09/2014 Graduação, Enfermagem
Disciplinas ministradas:
Biologia Molecular e Genética

3. Hospital Femina - FEMINA

Vínculo institucional

2013 - 2013 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Curricular Supervisionado , Carga horária: 36, Regime: Parcial

Atividades

02/2013 - 08/2013 Estágio, Setor de Reprodução Assistida
Estágio:
Estágio realizado em Reprodução Humana Assistida

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- 1.** **Filippi-Chiela, E. C., Thomé, M. P., Lenz, G., Manssur, M. M. B. E., Zamin, L. L., Ledur, P. F., Flores, P. A., Bernardo, A. L., Zamin, L. L., Lenz, G., Guidão, J. C.** Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer (Online)*. **13**, p.147 - , 2013.

Artigos aceitos para publicação

- 1.** FILIPPI-CHIELA, E. C., SILVA, M. M. B. E., THOMÉ, M. P., Lenz, G. SINGLE CELL ANALYSIS CHALLENGES THE CONNECTION BETWEEN AUTOPHAGY AND SENEESCENCE INDUCED BY DNA DAMAGE. *Autophagy (Georgetown, TX)*. **11**, 2015.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- 1.** FILIPPI-CHIELA, E. C., SILVA, M. M. B. E., THOMÉ, M. P., Lenz, G. AMPK1-ULK1 axis and p38 MAPK activation are early events in autophagy and senescence induction by DNA damage In: *Keystone - Autophagy: Fundamentals to Disease*, 2014, Austin, TX. **Abstracts of Keystone Symposia - Autophagy: Fundamentals to Disease** , 2014.
- 2.** Lenz, G., FILIPPI-CHIELA, E. C., SILVA, M. M. B. E., THOMÉ, M. P. An Integrative Single Cells Analysis of Autophagy and Senescence Induced by DNA-Damage In: *Keystone - Autophagy: Fundamentals to Disease*, 2014, Austin, TX. **Abstracts of Keystone Symposia - Autophagy: Fundamentals to Disease** , 2014.
- 3.** THOMÉ, M. P., FILIPPI-CHIELA, E. C., BUENO E SILVA, M. M. , Lenz, G. MUCH MORE THAN CELL CYCLE ARREST: THE MULTITUDE OF MECHANISMS INDUCED BY VINCISTINE IN GLIOMA CELLS In: *46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2014, Fortaleza. **46th Brazilian Congress on Pharmacology and Experimental Therapeutics** , 2014.
- 4.** FILIPPI-CHIELA, E. C., BUENO E SILVA, MARDJA MANSSUR, THOMÉ, M. P., Lenz, G. Single Cell Analysis Challenges the Connection of Autophagy and Senescence Induced by DNA damage In: *Keystone Symposia - Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System*, 2014, Guarujá, SP. **Annals of the "Keystone Symposia - Cell Death Signaling in Cancer and the Immune System** , 2014.
- 5.** SILVA, M. M. B. E., FILIPPI-CHIELA, E. C., THOMÉ, M. P., Lenz, G. Avaliação do papel da autofagia na senescência induzida por Temozolomida em células de glioma In: *XXIV do Salão de Iniciação da UFRGS*, 2012, Porto Alegre. **Anais dos Salões de Iniciação Científica da UFRGS**, 2012 , 2012.
- 6.** FILIPPI-CHIELA, E. C., BUENO E SILVA, M. M. , THOMÉ, M. P., Lenz, G. Papel da Autofagia na Senescência Induzida por Temozolomida em Células de Glioma In: *XIV Reunião Anual do PPGBCM*, 2012, PORTO ALEGRE. **Resumos da XIV Reunião Anual do PPGBCM** , 2012.
- 7.** SILVA, M. M. B. E., FILIPPI-CHIELA, E. C., ZAMIN, L. L., THOMÉ, M. P., PELEGRINI, A. L., Lenz, G. Resveratrol potencializa o efeito citotóxico crônico da Temozolomida em células de glioma: papel da senescência e dano ao DNA In: *XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE*, 2012, Águas de Lindóia - SP. **XXVII Reunião Anual da FeSBE**, 2012 , 2012.
- 8.** THOMÉ, M. P., FILIPPI-CHIELA, E. C., Lenz, G. Vincristina induz apoptose, parada no ciclo celular e autofagia em células de gliomas In: *XXIII Salão de Iniciação Científica*, 2011, Porto Alegre. **XXIII Salão de Iniciação Científica** , 2011.