

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MICHELE OLIVEIRA HÜTTEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DE XIAP NO MECANISMO DA  
AUTOFAGIA EM GLIOMAS**

Porto Alegre  
JULHO DE 2013

MICHELE OLIVEIRA HÜTTEN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO SILENCIAMENTO DE XIAP NO MECANISMO DA  
AUTOFAGIA EM GLIOMAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr Guido Lenz

Porto Alegre  
Julho de 2013

**Dedico esse trabalho às três pessoas mais importantes da minha vida. Por me motivarem e me apoiarem em todos os momentos; por serem um exemplo a seguir e por confiarem nas minhas decisões. Obrigado pai, mãe e Dedé.**

Gostaria de agradecer muito à minha família e a todos os colegas e amigos que fiz durante a graduação e a todos meus amigos, em especial ao Guigo, por serem um estímulo a mais na hora de provas e trabalhos, por me divertirem nas horas em que eu estava mais preocupada e me apoiarem sempre.

Gostaria de agradecer a todos do grupo do professor Guido, o Labsinal é um local incrível para trabalhar, e todos, pós-graduandos ou mesmo iniciação científica, estão sempre dispostos a ajudar e compartilhar conhecimento e me auxiliaram de uma forma ou de outra na realização desse trabalho.

E em especial, gostaria de agradecer ao Andrew Oliveira Silva, por ter me passado todo o conhecimento necessário para a realização desse trabalho, por estar sempre disposto a me ajudar a resolver problemas e por me puxar a orelha quando necessário; e também ao professor Guido Lenz, por ter me guiado durante o meu tempo de iniciação científica e me auxiliado com a sua experiência.

Muito Obrigada!

## ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
I.1 GLIOMAS .....	6
I.1.1 <i>Características Gerais e Epidemiologia.....</i>	6
I.1.2 <i>Classificação .....</i>	7
I.1.3 <i>Glioblastoma (GBM).....</i>	7
I.2 XIAP (X-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN) .....	8
I.3 AUTOFAGIA.....	10
<b>II. ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>14</b>
II.1 RESUMO.....	16
II.2 INTRODUÇÃO .....	17
II.3 RESULTADOS.....	18
II.3.1 <i>Confirmação do silenciamento de XIAP .....</i>	18
II.3.2 <i>Avaliação do perfil proliferativo da linhagem de glioma U373. ....</i>	18
II.3.3 <i>Avaliação do perfil Autofágico da linhagem de glioma U373.....</i>	19
II.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	20
II.5 MATERIAL E MÉTODOS .....	22
II.5.1 <i>Cultura de células.....</i>	22
II.5.2 <i>Ensaio de proliferação celular .....</i>	22
II.5.3 <i>Quantificação de organelas vesiculares ácidas (AVOs) por marcação com Laranja de Acridina .....</i>	22
II.5.4 <i>Análise por Western Blot.....</i>	23
II.6 REFERÊNCIAS.....	23
<b>III. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS QUE NÃO CONSTAM NO ARTIGO .....</b>	<b>26</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>27</b>

## Resumo

Gliomas são os tipos mais comuns de tumores primários no sistema nervoso central, sendo o Glioblastoma (GBM) a forma mais agressiva e mortífera, com alta resistência, tanto à quimioterapia, quanto radioterapia. Um importante fator que contribui para esta resistência é a superexpressão de XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), proteína que bloqueia apoptose por inibir, diretamente, as caspases 3, 7 e 9. Existe um controle fino entre os principais processos celulares que garantem a manutenção da homeostasia celular e a interação entre os mecanismos da apoptose e autofagia ganha destaque quando a abordagem é sobreviver ou morrer. A autofagia é um mecanismo celular fisiológico de degradação e reciclagem de componentes celulares que, em cânceres, pode atuar tanto como um processo supressor tumoral, levando à morte com aspectos autofágicos, quanto oncogênico, auxiliando as células tumorais a sobreviver sob condições adversas. O controle das vias autofágica e apoptótica ocorre por meio de diversas proteínas de ambos os processos celulares como, por exemplo, a interação da proteína Beclina, importante para o início da autofagia, com a proteína Bcl-xL, que atua de forma a bloquear a via mitocondrial da apoptose. Em um estudo prévio, com dados não publicados, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foram encontrados níveis de autofagia aumentados em linhagem de gliomas humano U87 silenciada para XIAP, sugerindo a presença de um novo ponto de controle entre as vias da autofagia e da apoptose. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos do silenciamento da proteína XIAP na autofagia, desvendar de que maneira esta proteína pode modular o processo autofágico e a proliferação celular. Como resultado, foi visto que, na linhagem de glioma U373, o silenciamento de XIAP não foi capaz de alterar o índice de proliferação celular. A partir daí, o mecanismo de autofagia foi investigado e foi encontrado um aumento dos níveis do processo autofágico nas células silenciadas em relação aos controles. Assim sendo, é possível inferir que a redução dos níveis da proteína XIAP é capaz de aumentar o processo autofágico em células de linhagem de glioblastoma humano.

Observação: este trabalho usará números [1 a 39], para as referências que se encontram no artigo científico, e letras [A a I], par as referências que não foram usadas pelo artigo científico.

## I. Introdução

### I.1 GLIOMAS

#### *I.1.1 Características Gerais e Epidemiologia*

Gliomas são tumores histologicamente heterogêneos, com características semelhantes à células gliais e são possivelmente derivados de células precursoras gliais [1]. Constituem o tipo mais comum de tumor primário do sistema nervoso central, sendo sua principal característica o perfil altamente proliferativo e invasivo. O desenvolvimento de gliomas pode se dar em qualquer idade, mas possui um pico de incidência em adultos a partir da quinta década de vida. Representa 31% das ocorrências de câncer nos Estados Unidos (EUA) e cerca de 81% de tumores malignos do sistema nervoso central em jovens adultos. Já nas idades de 0 a 14 anos, gliomas representam 53% dos tumores e em adolescentes de 15 a 19 anos representam 37%. Além disso, a taxa de incidência mostra-se um pouco mais alta em homens do que em mulheres [A].

O perfil proliferativo e invasivo dos gliomas se dá por uma série de alterações genéticas em diversas vias de sinalização como, por exemplo, em receptores de fatores de crescimento, alterando o ciclo celular e permitindo a proliferação e migração das células tumorais [1, 2]. Essa série de alterações é diferente para cada tipo de tumor, e varia mesmo entre tumores do mesmo tipo e grau. Como existe essa variação, vêm sendo estudados, ao longo dos anos, marcadores moleculares que sejam comuns a esses tipos e diferentes graus e auxiliem como indicativo da doença [6, B]. No caso dos gliomas, foram encontrados apenas três marcadores, os quais envolvem alterações moleculares que estão correlacionadas com prognósticos mais favoráveis. As três alterações são: hipermetilação do promotor da enzima MGMT (*O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyl-transferase*), a codeleção do braço curto do cromossomo 1 e do braço longo do cromossomo 19 e uma mutação na enzima IDH1 (isocitrato desidrogenase 1). Pacientes com as duas primeiras alterações possuem indicativo de melhores resultados com o tratamento por radioterapia ou quimioterapia do que pacientes que não possuem essas alterações. Já o terceiro marcador não está relacionado com predição clínica, mas sim com prognóstico mais favorável, independente da terapia [B].

As opções de tratamento para pacientes com glioma envolvem ressecção cirúrgica, seguida de radioterapia ou quimioterapia, sendo a Temozolomida (TMZ) a

primeira droga de escolha [1, B]. No entanto, levando-se em conta que as células do gliomas invadem o tecido cerebral de forma difusa [2, B], dependendo do tamanho da massa tumoral e do sítio em que o tumor se encontra no cérebro, a cirurgia torna-se perigosa ao paciente, dificultando a remoção total da massa tumoral e permitindo, assim, que haja uma futura recidiva do tumor. Portanto, em razão dessas inúmeras dificuldades é que novas terapias focadas em alvos moleculares vêm sendo desenvolvidas.

### *1.1.2 Classificação*

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divide os tumores em quatro graus, de acordo com a escala de malignidade, utilizando parâmetros como: características histológicas, morfologia nuclear e celular e outros fatores como, por exemplo, perfil proliferativo [C]. Tumores de **grau I** são lesões com baixo potencial proliferativo e possuem tipicamente bom prognóstico, com possibilidade de cura por ressecção cirúrgica; características de tumores de **grau II** envolvem sua capacidade infiltrativa e baixa atividade proliferativa, no entanto, com frequente recorrência. Alguns tipos de grau II tendem a evoluir para tipos de maior grau de malignidade. Os tumores de graus III e IV são considerados tumores malignos, sendo o **grau III** reservado à lesões com características malignas como atipia nuclear e capacidade mitótica ativa, e o **grau IV**, o tipo mais agressivo e mortífero, atribuído a tumores citologicamente malignos, mitoticamente ativos, com evidências de angiogênese e áreas de necrose [2, 6, C].

Através de outra abordagem histológica e patológica tradicional, os tumores também podem ser classificados de acordo com a sua semelhança morfológica e molecular às células gliais normais como, por exemplo, astrócitos e oligodendrócitos. As categorias que representam a maior parte dos tumores são os astrocitomas e os oligodendrogliomas [A]. Os subtipos de oligodendroglioma podem ser de grau II ou III e os subtipos de astrocitomas podem ser de todos os graus, sendo o glioblastoma pertencente ao subtipo de grau IV [2, 6, C].

### *1.1.3 Glioblastoma (GBM)*

Glioblastomas são tumores astrocíticos de grau IV, os mais agressivos e letais, que correspondem a 54% das ocorrências de gliomas nos Estados Unidos entre anos de 2005 a 2009 [A]. Possuem características que evidenciam seu alto

grau de malignidade como crescimento tumoral acelerado, alta taxa proliferativa, invasividade, presença de áreas de necrose focal no interior do tumor e angiogênese. Em razão dessas particularidades do GBM, a sobrevida média de pacientes, mesmo após ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, se mantém baixa, variando de 12 a 18 meses após o diagnóstico [1 – 3, 7].

Na maioria dos casos, os glioblastomas originam-se a partir de alterações em células saudáveis, podendo ser estas células precursoras gliais ou células progenitoras neuronais, sendo, assim, classificados como GBM primários. Porém, em alguns casos, a origem dos glioblastomas ocorre pela progressão tumoral de gliomas de graus mais baixos, a partir do acúmulo de novas alterações celulares, sendo chamados de GBM secundário [1]. O subtipo primário é geralmente encontrado em pacientes mais velhos, e o subtipo secundário geralmente se manifesta em pacientes mais jovens com tumores de graus mais baixos que depois de anos progridem ao GBM [1, 2, 7]. Ambos os subtipos são histologicamente e clinicamente indistinguíveis, uma vez que possuem as mesmas características de malignidade. No entanto, as bases moleculares das alterações sofridas pelo tumor são diferentes para os dois subtipos, de forma que estas neoplasias podem responder da mesma forma ao tratamento convencional, mas podem responder melhor a tratamentos direcionados para cada tipo, de acordo com às características peculiares de cada um [3 – 5, 7].

## 1.2 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

XIAP é uma proteína pertencente à família das IAPs (Inhibitor of apoptosis protein) com função de bloquear o mecanismo da apoptose por inibir diretamente e especificamente, tanto a caspase iniciadora 9, quanto as caspases efetoras 3 e 7, sendo considerada a mais potente inibidora da apoptose dessa família [9 – 11]. As proteínas IAPs possuem sítios denominados sítios BIR (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat), que são responsáveis pela interação física da IAP à outra proteína, permitindo a ligação direta da IAP à proteína alvo. A estrutura da XIAP contém três repetições de domínio BIR, que lhe confere a capacidade de ligação às caspases. A XIAP bloqueia a apoptose em resposta a diversos estímulos como, por exemplo, radiação ou quimioterapia, e é negativamente regulada por, pelo menos,



duas proteínas, Smac/DIABLO (direct IAP binding protein with low PI) e XAF1 (XIAP associated factor) [9 – 11, 13, D]. A figura 1 resume as vias pelas quais ocorrem os estímulos de morte celular apoptótica: a via extrínseca, agindo como um sensor de sinais extracelulares envolvendo receptores de morte; e a via intrínseca, que detecta danos intracelulares e promove liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais. Em ambas as vias ocorre ativação de caspases iniciadoras, que clivam e ativam as procaspases efetoras (3 e 7), as quais podem ser inibidas por XIAP. Além disso, é representada na figura a liberação de outros fatores mitocondriais, como Smac/DIABLO, que impede a ação inibitória de XIAP, potencializando, assim, a indução do processo apoptótico.

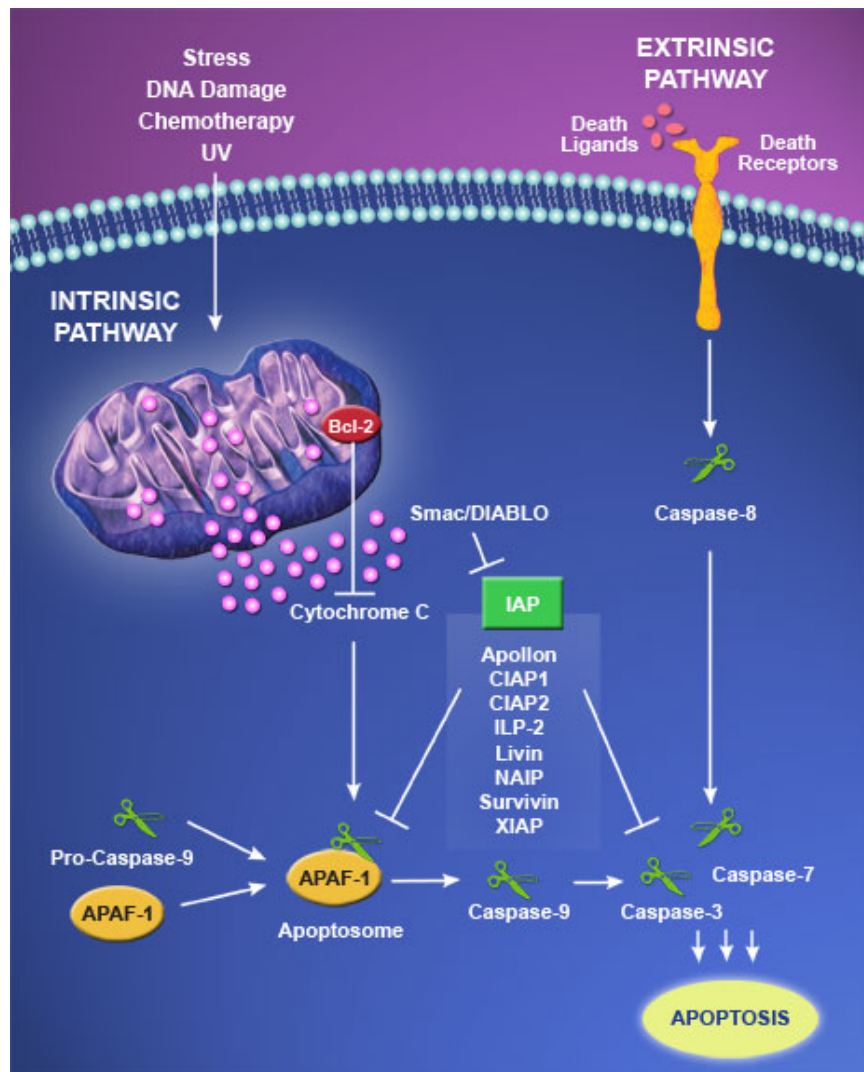


Figura 1: **Via simplificada da apoptose.** Ativação da apoptose por ligação ao receptor de morte celular ou por estresse intracelular resulta na ativação das caspases efetoras 3 e 7, que podem ser inibidas por XIAP. Além disso, a ação de XIAP pode ser bloqueada por outras proteínas. Adaptado de [http://imgenex.com/view\\_data\\_page.php?id=168](http://imgenex.com/view_data_page.php?id=168).

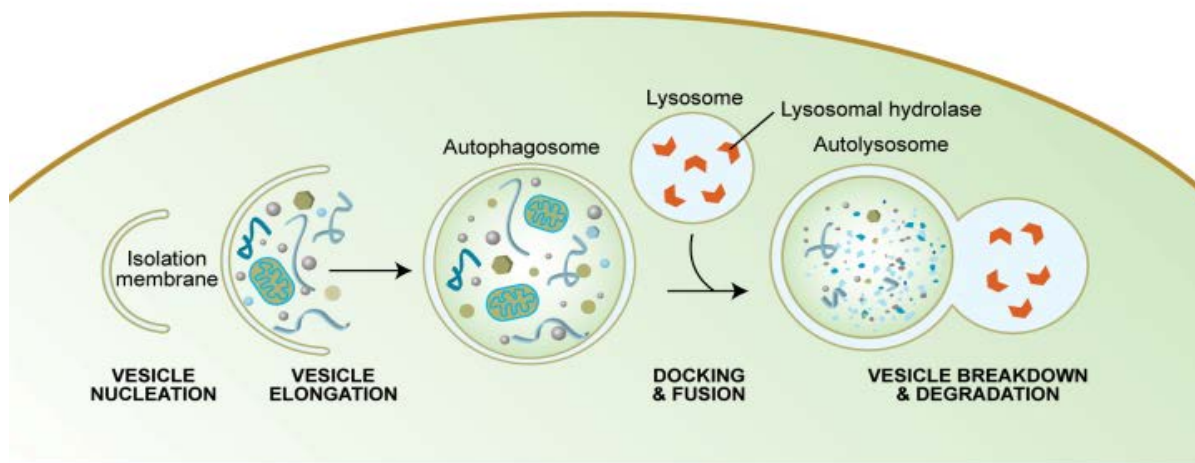
Em diversos tipos de câncer, incluindo os gliomas, XIAP encontra-se superexpressa, podendo ser correlacionada a um mau prognóstico e conferir resistência à quimioterapia, tanto para estímulos da via de morte mitocondrial (intrínseca), quanto da via de receptores de morte (extrínseca) [8, 13, 17, D, E]. Apesar de alguns estudos não indicarem direta relação entre prognóstico e nível de expressão de XIAP e que apenas alteração nessa proteína não é suficiente para conferir resistência a drogas [12, F], a diminuição nos níveis de expressão da proteína inibe a proliferação de diversos tipos de tumor, induz apoptose e aumenta a sensibilidade das células a quimioterápicos [14 – 16].

### I.3 Autofagia

A autofagia é um processo celular evolutivamente conservado de degradação e reciclagem de proteínas e organelas, que atua em níveis basais para manutenção de homeostasia das células. É um mecanismo induzido como resposta a diversos estímulos, tais como: estresse oxidativo, hipóxia ou depleção de nutrientes. Consiste na formação de uma membrana de isolamento, a qual sequestra os componentes celulares a serem degradados, formando vacúolos autofágicos de membrana dupla, chamados autofagossomos. A partir daí ocorre fusão desses vacúolos aos lisossomos, formando os chamados autofagolisossomos ou autolisossomos, para a subsequente degradação e “reciclagem” das unidades básicas formadoras destes componentes como aminoácidos, lipídeos, açúcares e pequenas moléculas [18, 19, 21, 24]. A figura 2 ilustra, esquematicamente, o fluxo autofágico celular, que é importante para a manutenção da homeostase celular, principalmente em condições adversas.

Esse mecanismo pode atuar em níveis basais para auxílio da renovação dos componentes citoplasmáticos. No entanto, a autofagia apresenta ações opostas, pois, ao passo que pode auxiliar na sobrevivência das células sob condições adversas (sendo ativada em situações em que ocorre falta de nutrientes ou de oxigênio, por exemplo), pode também, em excesso, causar a morte das células (sendo atualmente considerada como evento que leva à morte com aspectos autofágicos) [18, 19, 21, 24]. Dessa mesma forma paradoxal a autofagia atua em tumores, pois pode favorecer o desenvolvimento tumoral auxiliando, por exemplo, na

prevenção de apoptose; ou sobrevivência durante tratamento com quimioterápicos, mas também pode inibir o crescimento tumoral, causando morte celular com aspectos autofágicos ou através da manutenção de organelas e componentes [21 –



23].

Figura 2: **Ilustração esquemática das etapas do processo autofágico.** O início do processo começa pelo passo de nucleação, seguido pelo alongamento do vacúolo autofágico, formando o autofagossomo contendo os componentes a serem degradados. Quando as membranas do autofagossomo se fusionam ao lisossomo, é formado um autofagolisossomo, onde ocorre a ação das enzimas lisossômicas e degradação dos componentes englobados. Meléndez, A. e Levine, B. 2009. WormBook, ed. The C. elegans Research Community.

Molecularmente, a autofagia é regulada por uma família de genes chamados Atg (autophagy related genes). A via de sinalização que regula esse mecanismo é a via da PI3K de classe I e de classe III (class III e class I phosphatidylinositol 3-kinase) [21 – 23]. A figura 3 representa uma visão geral da via autofágica, mostrando a regulação negativa pela PI3K de classe I através da mTOR (mammalian target of rapamycin) e a regulação positiva pela PI3K de classe III, que forma complexo com as proteínas p150, Atg 14 e Beclina-1. A partir da ativação da autofagia pela via da PI3K de classe III, ocorre a formação de uma membrana de isolamento, que vai englobar componentes celulares e dar origem ao autofagossomo. A formação do autofagossomo é coordenada pelo complexo entre Atg5, Atg12 e Atg16. Durante esta etapa também ocorre o processamento da proteína LC3-I, em LC3-II, que se liga à membrana do autofagossomo. A partir daí ocorre a fusão com o lisossomo e degradação dos componentes englobados.

Além disso, em diversos pontos da via da autofagia ocorre interação com a apoptose, de forma que um processo pode regular o outro. Ocorre, por exemplo, atuação a favor da apoptose pelas proteínas Atg5 e Atg12, pois estas interagem com a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2). Outra interação importante é a interação entre a proteína Beclina e as proteínas Bcl-2 e Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large). No entanto, a interação entre estas proteínas não impede a ação anti-apoptótica de Bcl-2 e Bcl-XL, ocorrendo apenas inibição da atividade da Beclina e, portanto, da indução autofagia. [18, 20, G, H].

Sabendo que existe uma correlação entre apoptose e autofagia através da interação entre proteínas de ambas as vias, e sabendo dos papéis opostos da autofagia, torna-se importante relacionar ambos os mecanismos celulares em tumores, de forma a auxiliar o conhecimento sobre a biologia celular do câncer para futuros tratamentos. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo, avaliar as alterações no mecanismo de autofagia em gliomas através do silenciamento da proteína XIAP, avaliando o perfil proteico das células silenciadas e traçando uma relação entre apoptose e autofagia.

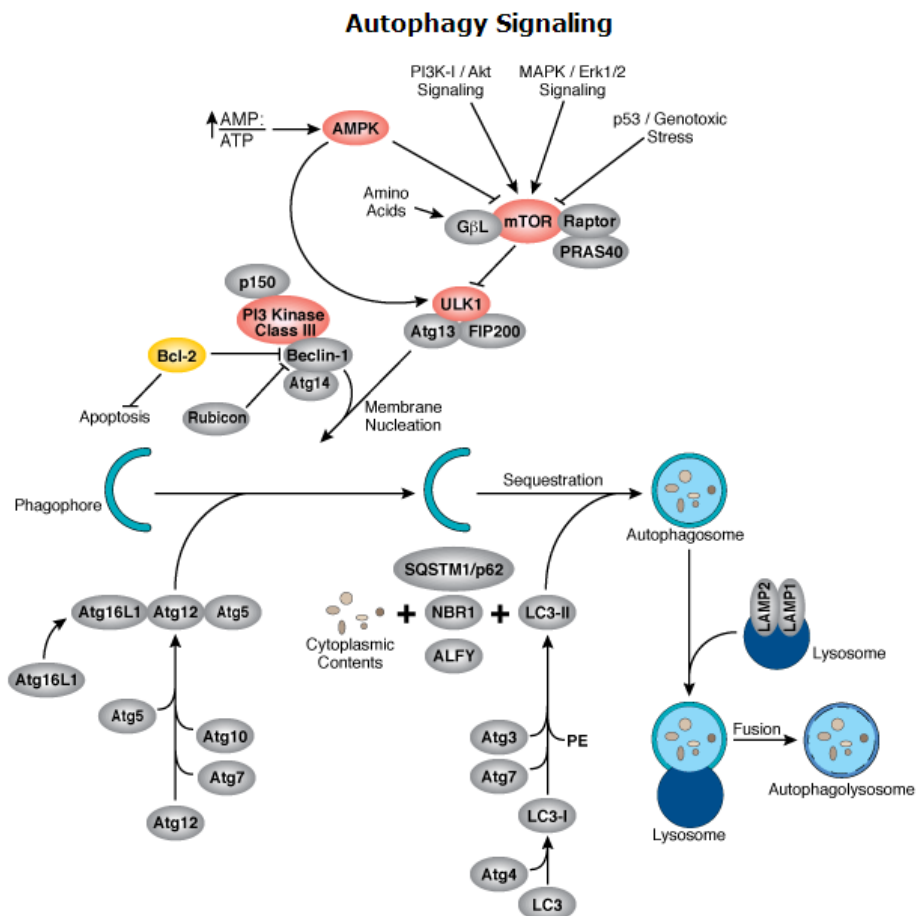


Figura 3: **Via geral de sinalização da autofagia.** Figura esquematizando proteínas importantes para os diversos passos na indução e progressão da autofagia. Figura retirada de <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html>

## II. Artigo Científico

Carta de submissão no formato requerido pelo periódico “Cell Death and Differentiation” (<http://www.nature.com/cdd/index.html>)

Michele O. Hütten<sup>1</sup>, Andrew O. Silva<sup>2</sup>, Guido Lenz<sup>3</sup>

1 – [miih.hutten@gmail.com](mailto:miih.hutten@gmail.com)

2 – [andrewbiomed@gmail.com](mailto:andrewbiomed@gmail.com)

3 – [gulenz@gmail.com](mailto:gulenz@gmail.com)

Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular ([www.ufrgs.br/labsinal](http://www.ufrgs.br/labsinal)),  
Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **Avaliação dos efeitos do silenciamento de XIAP no mecanismo da autofagia em gliomas**

Hütten, MO<sup>1, 2</sup>, Silva, AO<sup>1, 2</sup>, Lenz, G<sup>1, 2</sup>

- 1- Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular ([www.ufrgs.br/labsinal](http://www.ufrgs.br/labsinal)), Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 2- Endereço para correspondência: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Biofísica, Av. Bento Gonçalves, 9500. CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 51 3308 7620

## II.1 Resumo

Gliomas são os tipos mais comuns de tumores primários no sistema nervoso central, sendo o Glioblastoma (GBM) a forma mais agressiva e mortífera, com alta resistência tanto a quimio quanto radioterapia. Um importante fator que contribui com a resistência é a superexpressão de XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), proteína que bloqueia a apoptose por inibir diretamente as caspases 3, 7 e 9. Autofagia é um mecanismo fisiológico de degradação e reciclagem de componentes celulares que, em cânceres, pode atuar inibindo a progressão tumoral, levando as células à morte com aspecto autofágico, ou pode auxiliar as células tumorais a sobreviver sob condições adversas. O objetivo deste trabalho foi avaliar como o silenciamento de XIAP modula o processo autofágico em linhagens de glioma humano. Para tanto, células de glioma humano da linhagem U373 foram estavelmente silenciadas para XIAP, utilizando a técnica de RNA de interferência (RNAi). Através da análise dos perfis de proliferação, foi constatado que o silenciamento de XIAP não foi capaz de alterar a taxa de proliferação celular em relação aos controles. Na análise de autofagia foi constatado que, nas células silenciadas, os níveis desse mecanismo estavam aumentados em relação aos controles. Como perspectivas, deve ser confirmada a indução da autofagia por outros métodos, para avaliar o fluxo autofágico, investigar mais profundamente através de qual via celular este processo ocorre e traçar uma relação entre apoptose e autofagia mediada por XIAP.

Palavras-chave: glioma, XIAP, autofagia, U373, apoptose.



## II.2 Introdução

Glioblastomas (GBM) são tumores derivados de células gliais e correspondem aos tipos mais comuns de tumores do sistema nervoso central [1, 2]. São os subtipos mais malignos e agressivos de gliomas, com taxa de sobrevida variando de 12 a 18 meses, mesmo após ressecção cirúrgica e tratamento com quimioterapia ou radioterapia [3 – 5]. As características que conferem a alta malignidade dos glioblastomas envolvem sua alta proliferação celular, infiltração difusa, angiogênese, e resistência a apoptose [6, 7].

Uma causa importante para a resistência a apoptose é a alta expressão da proteína XIAP (x-linked inhibitor of apoptosis protein) [8], uma proteína pertencente à família das IAPs (inhibitor of apoptosis protein), que tem como principal função bloquear a apoptose através da interação direta com as caspases 3, 7 e 9, inibindo suas funções proteásicas [9 – 11]. Apesar de, sozinho, o aumento no nível de expressão de XIAP não ser capaz de aumentar a resistência tumoral a quimioterápicos [12], vêm sendo observados diversos casos em que a diminuição da expressão de XIAP contribui para o tratamento do câncer por inibir a proliferação celular, induzir apoptose e aumentar a sensibilidade a quimioterápicos [13 – 17].

Existem outras formas pelas quais células cancerígenas tornam-se resistentes aos tratamentos, sendo uma delas pelo mecanismo da autofagia, via pela qual ocorrem degradação e reciclagem de componentes celulares. Esse processo é correlacionado com a apoptose, uma vez que diversos pontos dessas vias interagem [18 – 20]. A autofagia ocorre em níveis basais para manter a homeostase celular e é ativada, por exemplo, durante a privação de nutrientes ou hipóxia. No entanto, é um mecanismo que apresenta ações opostas, já que pode auxiliar a sobrevivência da célula em situações de stress, como privação de nutrientes ou no caso de quimioterapia, mas também pode, em excesso, causar a morte da célula, sendo atualmente considerada como evento que leva a morte celular com características autofágicas [21, 22].

Sabendo das ações paradoxais da autofagia, e também sabendo que, em tumores, esse mecanismo pode auxiliar na resistência a quimioterápicos [22, 23], mas também pode se apresentar como alternativa para o tratamento do câncer [21, 22], torna-se importante avaliar qual o papel da autofagia quando XIAP é silenciada. Além disso, dada a inter-relação da via autofágica com a apoptose, também se torna importante esclarecer a importância dos pontos de intercomunicação entre os dois

mecanismos e tentar desvendar novos alvos capazes de regular as duas vias de sinalização. Dessa forma, o presente estudo visa estabelecer a relação entre apoptose e autofagia mediada por XIAP.

## II.3 Resultados

### II.3.1 Confirmação do silenciamento de XIAP

A confirmação do silenciamento de XIAP foi realizada por Western Blot. A figura 4 mostra o silenciamento de XIAP nas linhagens U373 X6 e X8, com uma maior redução dos níveis proteicos de XIAP na linhagem X8 e uma redução menor na linhagem X6.

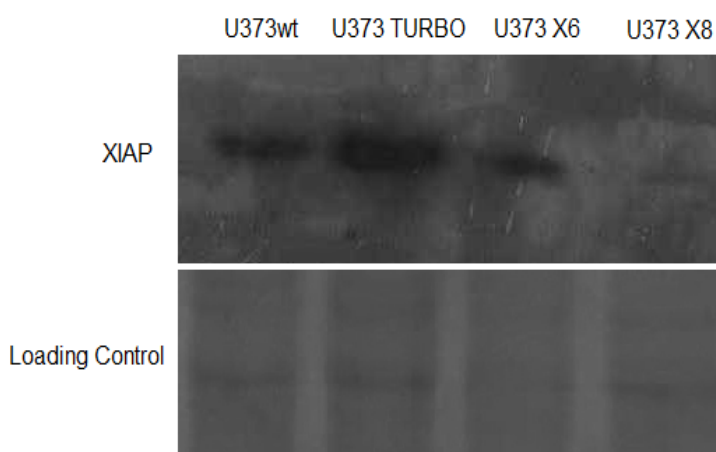


Figura 4: **Silenciamento de XIAP na linhagem U373.** O silenciamento foi eficaz. Houve uma grande redução para a sequência X8 e uma menor redução para X6. A sequência TURBO é uma sequência controle de shRNA.

### II.3.2 Avaliação do perfil proliferativo da linhagem de glioma U373.

Como demonstrado em diversos trabalhos [14 – 17], a diminuição da expressão de XIAP tem efeitos positivos na indução de apoptose e diminuição de resistência a drogas. Dessa forma, foi realizado o ensaio de *population doubling* para verificar se ocorreria alteração na taxa de proliferação das linhagens silenciadas em relação ao controle. De acordo com a figura 5, os gráficos de PD cumulativo indicam que não houve diferença significativa nas taxas de crescimento das linhagens silenciadas para XIAP em relação aos controles. No entanto, houve uma leve e não significativa redução na proliferação das linhagens silenciadas, de forma coerente com os níveis de expressão apresentados pela figura 4. A linhagem X8, que expressa menos XIAP, apresenta menor taxa de crescimento, enquanto a linhagem X6, que apresentou menor redução dos níveis de XIAP, possui perfil

proliferativo mais parecido com o controle. A figura suplementar S1 apresenta um resultado semelhante, utilizando a linhagem de glioma U87 (dados não publicados. Silva, AO).

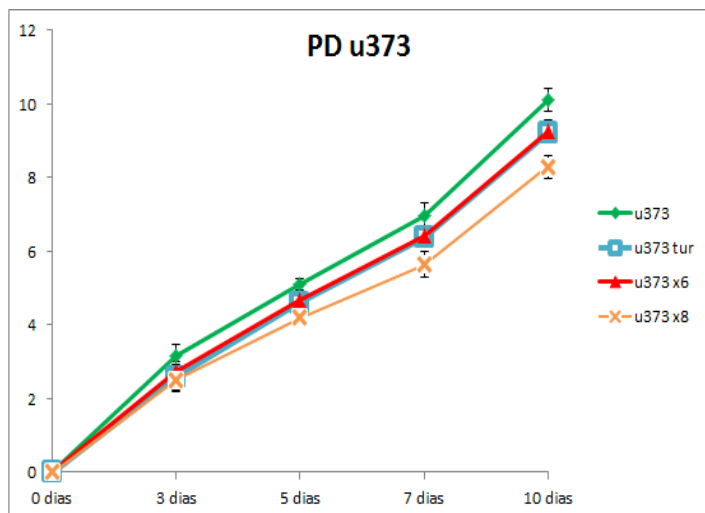


Figura 5: **Silenciamento de XIAP não influencia na taxa de crescimento.** O gráfico mostra os valores de PD (eixo y) obtidos pela contagem de células durante os dias de ensaio (eixo x). As células foram semeadas e contadas por citometria de fluxo nos dias 3, 5, 7 e 10 após o plaqueamento. (n=3)

### II.3.3 Avaliação do perfil Autofágico da linhagem de glioma U373

O perfil autofágico das células selvagens e silenciadas foi traçado a partir da marcação com laranja acridina (AO). A figura 6 mostra os resultados da citometria e um gráfico de porcentagem de marcação por AO e de porcentagem de marcação em relação ao controle selvagem. O silenciamento de XIAP desloca a população de células para a direita, indicando aumento da marcação com laranja de acridina, evidenciando um aumento no processo autofágico. Os resultados demonstram que o nível de autofagia parece estar correlacionado com o nível de silenciamento de XIAP, uma vez que, para a linhagem X8, que obteve forte inibição da expressão de XIAP, houve um grande aumento dos níveis de autofagia. Já para a linhagem X6, cujo silenciamento de XIAP não foi tão expressivo, não obteve tanto efeito na marcação com o laranja de acridina. A figura suplementar S2 apresenta um resultado de aumento de indução de autofagia em linhagens de glioblastoma humano U87 silenciadas para XIAP (dados não publicados. Silva, AO).

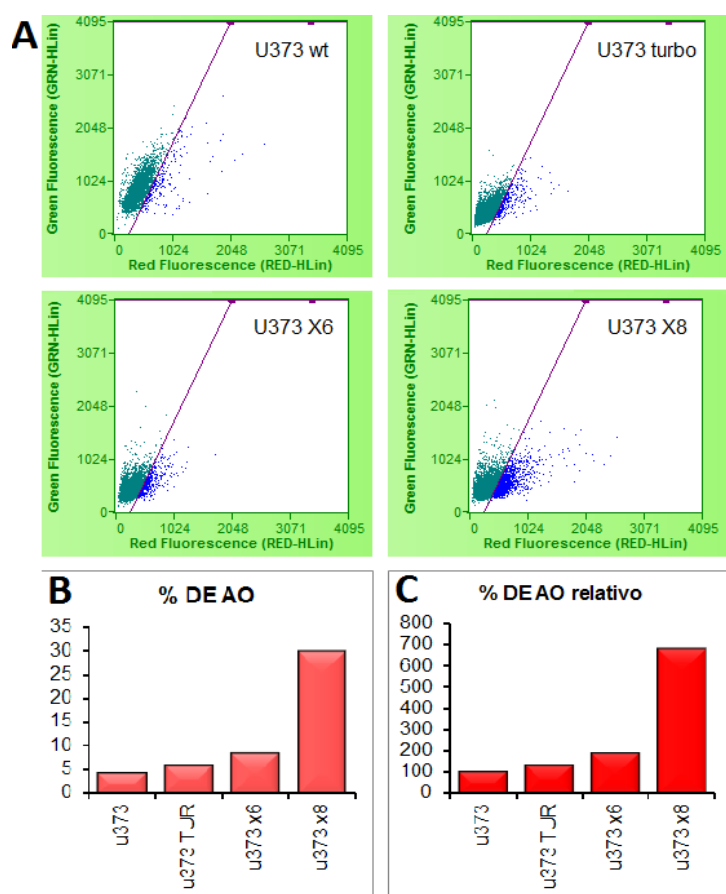


Figura 6: **Silenciamento de XIAP aumenta a marcação por laranja de acridina.** Figuras obtidas pelo citômetro de fluxo GUAVA (A) mostrando deslocamento da população de células silenciadas para a direita com o aumento da marcação em vermelho, indicando aumento nos níveis de autofagia. B) gráfico apresentando a porcentagem da marcação de AO (eixo y) em cada linhagem (eixo x) e C) porcentagem de marcação em relação ao controle selvagem.

#### II.4 Discussão e Conclusão

A autofagia recentemente vem sendo estudada como indutora de morte celular. Apesar de existirem estudos indicando a ação da autofagia em tumores por auxiliar a tumorigênese ou na resistência a quimioterápicos [22, 23], existem, também, indícios de que a autofagia pode atuar como supressora tumoral [24 – 27]. Uma vez que contornar o câncer é tarefa difícil devido à sua variabilidade genética e variabilidade de resposta a tratamentos, novas estratégias vêm sendo abordadas, inclusive com relação à função supressora tumoral da autofagia [21, 24, 27, 28]. Dessa forma, esse estudo procura buscar o efeito de XIAP sobre o mecanismo da autofagia, tentando auxiliar na resolução de uma possível interação entre a via apoptótica e autofágica.

A ferramenta de silenciamento estável se mostrou eficaz, pois, ainda que a sequência de shRNA nomeada X6 tenha reduzido de forma fraca os níveis de XIAP, a sequência nomeada X8 foi capaz de reduzir fortemente os níveis dessa proteína, como demonstrado pela figura 4. A partir do silenciamento, foram investigadas as taxas de proliferação das linhagens. Como o silenciamento de XIAP é capaz de

induzir apoptose, inibir proliferação celular e sensibilizar células cancerígenas a quimioterápicos [14 – 17], poderia se esperar encontrar taxas de proliferação reduzidas para as linhagens U373 X6 e U373 X8. No entanto, de acordo com resultados prévios (dados não publicados. Silva, AO) e com o gráfico de *Population Doubling* cumulativo representado pela figura 5, não há diferença significativa no perfil proliferativo das linhagens silenciadas em relação aos controles. Houve um pequeno, mas visível, efeito de redução na proliferação para a linhagem X8. Esse efeito, no entanto, não foi o mesmo para a linhagem X6, cuja expressão de XIAP não foi tão fortemente reduzida pelo silenciamento.

Por fim, a autofagia foi investigada pelo ensaio por marcação com Laranja de Acridina e, de acordo com a figura 6, pode-se perceber que o silenciamento de XIAP aumenta a marcação vermelho-positiva para laranja de acridina, indicando um aumento nos níveis do processo autofágico na linhagem U373 X8. O resultado obtido na linhagem U373 X6 está dentro do esperado, uma vez que, como os níveis de XIAP não foram fortemente reduzidos, não deveria se obter um resultado de aumento da mesma forma que a linhagem U373 X8. Dessa forma, fica evidenciada que a redução dos níveis de XIAP é capaz de desencadear o mecanismo autofágico.

A partir de dados não publicados utilizando a linhagem de glioblastoma humano U87 MG (Silva, AO), foi originada a ideia de realizar experimentos envolvendo a regulação da autofagia por XIAP em outras linhagens de glioblastoma humano. No mês de junho deste ano (2013), foi publicado um artigo sobre XIAP e autofagia [29], que desvenda a via pela qual XIAP atua inibindo autofagia, relacionando essa atuação com a via das proteínas Mdm2 e p53. Podemos perceber que obtivemos resultados semelhantes de indução de autofagia após o silenciamento de XIAP da mesma forma que o artigo. Além disso, a relação de XIAP e p53 com autofagia também se mostra correta, de acordo com o observado pelas figuras suplementares S1 e S2 (dados não publicados. Silva, AO). Portanto, este presente artigo se apresenta coerente e correto, de forma que os objetivos iniciais de relacionar apoptose e autofagia mediadas por XIAP se mantêm para complementar este trabalho.

## II.5 Material e Métodos

### II.5.1 *Cultura de células*

Células de glioblastoma humano U373 MG selvagens (U373wt) foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EUA). Células silenciadas para a proteína XIAP, cujas sequências de RNAi foram nomeadas X6 e X8 (U373 X6 e U373 X8), foram produzidas através do silenciamento estável com RNA de interferência por transdução lentiviral pelo nosso grupo de pesquisa (Silva AO, dados não publicados). As células foram cultivadas em *DMEM low glucose* (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1% de penicilina/streptomicina (GIBCO) e 0,1% de anfotericina B (GIBCO) e mantidas em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### II.5.2 *Ensaio de proliferação celular*

Células selvagens e silenciadas foram semeadas em confluência de  $1 \times 10^4$  células por poço em placa de 24 poços. Nos dias 3, 5, 7 e 10 após o plaqueamento, as células foram suspensas e uma parcela foi destinada a contagem através de citometria de fluxo (Guava Technologies, Hayward, CA, USA) e outra parcela foi ressemeada. Dessa forma foram obtidos os valores de número inicial e final de células em cada tempo do experimento. Então, foi determinado o Population Doubling (PD) de cada poço a partir da fórmula  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , onde  $N(t)$  é o número final de células por poço no tempo de passagem e  $N(t_0)$  é o número inicial de células semeadas. Os valores obtidos foram inseridos num gráfico de PD cumulativo contra o tempo de cultura.

### II.5.3 *Quantificação de organelas vesiculares ácidas (AVOs) por marcação com Laranja de Acridina*

O desenvolvimento de organelas vesiculares ácidas (AVOs) é um evento típico da autofagia. Sua formação indica maturação dos autofagossomos e eficiência do processo autofágico, uma vez que apenas autofagossomos maduros tornam-se ácidos [30]. Laranja de Acridina (AO) (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA) é um marcador fluorescente verde que, em compartimentos ácidos, fluoresce vermelho. Para a quantificação das AVOs, um número indeterminado de células em

cultura (confluência de 70% em uma garrafa de cultura de 25cm<sup>2</sup>) foi suspenso e marcado por 15 minutos com o AO (2,7 µM), para então ser analisado por citometria de fluxo, através do aumento na marcação de eventos com alta fluorescência vermelha (Guava Technologies, Hayward, CA, USA).

#### II.5.4 Análise por Western Blot

As células selvagens e silenciadas foram semeadas em placas de 6 cm de diâmetro. A extração proteica foi realizada utilizando solução de lise desnaturante e a quantificação de proteína das amostras foi feita pelo método de Lowry. Quarenta microgramas de proteína foram submetidos à SDS-PAGE 12% ou 15% e transferido, overnight, para uma membrana de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó solubilizado em TTBS por uma hora e incubada overnight com o anticorpo primário anti-XIAP (diluição 1000 – *Cell Signaling*), sob agitação, seguido da incubação com o anticorpo secundário apropriado conjugado à peroxidase (1:2000 – *Cell Signaling*) por, no mínimo, duas horas, sob agitação. A imunodeteção foi realizada usando ECL e filmes de raios-X (Kodak X-Omat, Rochester, NY, EUA).

#### II.6 Referências

- [1] Wen, P.Y. Kesari, S. (2008). Malignant Glioma in Adults. *The New England Journal of Medicine* 359: 492 - 507.
- [2] Louis, D. N. (2006). Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1: 97 - 117.
- [3] Sulman, E.P. Guerrero, M. Aldape, K. (2009). Beyond Grade: Molecular Pathology Of Malignant Gliomas. *Seminars in Radiation Oncology* 19: 142 - 149.
- [4] Preusser, M. Ribaupierre, S. Wöhrer, A. Erridge, S.C. Hegi, M. Weller, M. Stupp, R. (2011). Current Concepts and Management of Glioblastoma. *Annals of Neurology* 70: 9 - 21.
- [5] Westermarck, B. (2012). Glioblastoma - a moving target. *Upsala Journal of Medical Sciences* 117: 251 - 256.
- [6] Gladson, C.L. Prayson, R.A. Liu, W. (2010). The Pathobiology of Glioma Tumors. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5: 33 - 50.

- [7] Marumoto, T. Saya, H. (2012). Molecular Biology of Glioma. Glioma: Immunotherapeutic Approaches. 1 - 10.
- [8] Wagenknecht, B. Glaser, T. Naumann, U. Kügler, S. Isenmann, S. Bähr, M. Korneluk, R. Liston, P. Weller, M (1999). Expression and biological activity of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) in human malignant glioma. *Cell Death and Differentiation* 6: 370 - 376.
- [9] Deveraux, Q.L. Takahashi, R. Salvesen, G.S. Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Letters to Nature* 388: 300 - 304.
- [10] Holcik, M. Gibson, M. Korneluk, R.G. (2001). XIAP: Apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 6: 253 - 261.
- [11] Fulda, S. Vucic, D. (2012). Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews* 11: 109 - 123.
- [12] Seeger, J.M. Brinkmann, K. Yazdanpanah, B. Haubert, D. Pongratz, C. Coutelle, O. Krönke, M. Kashkar, H. (2010). Elevated XIAP expression alone does not confer chemoresistance. *British Journal of Cancer* 102: 1717 - 1723.
- [13] Schimmer, A.D. Dalili, S. Batey, R.A. Riedl, S.J. (2006). Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death and Differentiation* 13: 179 - 188.
- [14] Ma, J. Chen, B. Xin, X (2009). XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 146: 222 - 226.
- [15] Tong, Q. Zheng, L. Wang, L. Zeng, F. Chen, F. Dong, J. Lu, G. (2005). Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 12: 509 - 514.
- [16] LaCasse, E. C. (2013). Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156. *Cancer Letters* 332: 215 - 224.
- [17] Augello, C. Caruso, L. Maggioni, M. Donadon, M. Montorsi, M. Santambrogio, M. Torzilli, G. Vaira, V. Pellegrini, C. Roncalli, M. Coggi, G. Bosari, S. (2009). Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 9: 125.
- [18] Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature Reviews* 6: 505 - 510.



- [19] Galluzzi, L. Vicencio, J.M. Kepp, O. Tasdemir, E. Maiuri, M.C. Kroemer, G. (2008). To Die or Not to Die: That is the Autophagic Question. *Current Molecular Medicine* 8: 78 - 91.
- [20] Rubinstein, A.D. Kimchi, A. (2012). Life in the balance – a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Journal of Cell Science* 125: 5259 - 5268.
- [21] Høyer-Hansen, M. Jäättelä, M. (2008). Autophagy: An Emerging Target for Cancer Therapy. *Autophagy* 4(5): 574 - 580.
- [22] Levine, B. (2007). Autophagy and Cancer. *Nature* 446: 745 - 747.
- [23] Maes, H. Rubio, N. Garg, A.D. Agostinis, P. (2013). Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends in Molecular Medicine* 19(7): 426 - 446.
- [24] Levine, B. Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation* 115: 2679 - 2688.
- [25] Liang, X.H. Jackson, S. Seaman, M. Brown, K. Kempkes, B. Hibshoosh, H. Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672-676, 1999.
- [26] Miracco, C. Cosci, E. Oliveri, G. Luzi, P. Pacenti, L. Monciatti, I. Mannucci, S. de Nisi, M.C. Toscano, M. Malagnino, V. Falzarano, S.M. Pirtoli, L. Tosi, P. (2007). Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *International Journal of Oncology* 30: 429 – 436.
- [27] Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death and Differentiation* 11: 448 – 57.
- [28] LeFranc, F. Kiss, R. (2006). Autophagy, the Trojan Horse to combat glioblastomas. *Neurosurgical Focus* 20: E7.
- [29] Huang, X. Wu, Z. Mei, Y. Wu, M. (2013). XIAP inhibits autophagy via XIAP-Mdm2-p53 signalling. *The Embo Journal*.
- [30] Klionsky, D.J. Abeliovich, H. Agostinis, P. Agrawal, D.K. Aliev, G. et al. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4: 151–175.

### III. Conclusões e Perspectivas

A partir do presente trabalho, mostramos que o silenciamento de XIAP não é capaz de causar diferença na taxa de proliferação celular na linhagem de glioblastoma U373 e em trabalhos prévios na linhagem U87 (dados não publicados. Silva, AO), e que esse silenciamento resulta num aumento da autofagia. Infelizmente, não foi possível realizar alguns dos objetivos, que envolviam analisar o perfil proteico das células silenciadas e traçar a relação entre apoptose e autofagia nessas células. Sendo assim, as perspectivas do trabalho são:

A) Confirmar a indução de autofagia após o silenciamento de XIAP por outros métodos, analisando, dessa forma, o início, o progresso e a finalização do fluxo autofágico.

B) Avaliar alterações nos níveis de proteínas relacionadas com autofagia e apoptose nas células silenciadas em relação aos controles para que seja identificada a via pela qual o silenciamento de XIAP influencia a autofagia.

C) Traçar a relação entre a autofagia e a apoptose, realizando um ensaio de marcação com Anexina V e Iodeto de propídeo para avaliar o perfil de morte por apoptose sofrido pelas células silenciadas e, posteriormente, inibir e ativar, em etapas diferentes, tanto a autofagia quanto a apoptose, para verificar alterações nos resultados obtidos da forma basal.

D) Por fim, os ensaios de PD e AO foram realizados com as linhagens U87 e A172 (ambas selvagens e silenciadas), mas ainda faltam resultados conclusivos para que essas linhagens sejam incluídas no trabalho.

### Referências bibliográficas que não constam no artigo

[A] Dolecek, T.A. Propp, J.M. Stroup, N.E. Kruchko, C. (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-Oncology* 14: v41 - v49.

[B] Wang, Y. Jiang, T. (2013). Understanding high grade glioma: Molecular mechanism, therapy and comprehensive management. *Cancer Letters* 331: 139 - 146.

[C] Louis, D.N. Ohgaki, H. Wiestler, O.D. Cavenee, W.K. Burger, P.C. Jouvett, A. Scheithauer, B.W. Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica* 114: 97 - 109.

[D] Dubrez-Daloz, L. Dupoux, A. Cartier, J.(2008). IAPs More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 7(8): 1036 - 1046.

[E] Yang, L. Cao, Z. Yan, H. (2003). Coexistence of High Levels of Apoptotic Signaling and Inhibitor of Apoptosis Proteins in Human Tumor Cells: Implication for Cancer Specific Therapy. *Cancer Research* 63: 6815 - 6824.

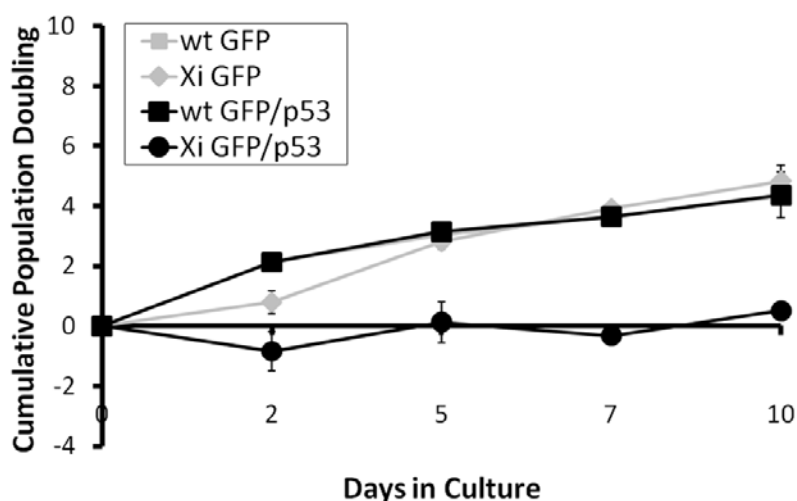
[F] Kashkar, H. (2010). X-linked Inhibitor of Apoptosis: A Chemoresistance Factor or a Hollow Promise. *Clinical Cancer Research* 16: 4496 - 4502.

[G] Kang, R. Zeh, H.J. Lotze, M.T. Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 18: 571 - 580.

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

## Anexos

Figura suplementar S1: **Silenciamento de XIAP combinado com superexpressão de p53 reduz as taxas de proliferação celular.** As células foram transfectadas e, nos dias 2, 5, 7 e 10 após a transfecção, o Population Doubling foi determinado por



contagem automática por citometria de fluxo. O gráfico mostra redução significativa da taxa de proliferação das células U87 silenciadas para XIAP (sequência X6) quando p53 é superexpressa, em comparação com os controles. (n = 5)

Figura suplementar S2: **Silenciamento de XIAP aumenta o número de células com autofagia.** Após 24h de transfecção com plasmídeo contendo LC3-GFP, foram contadas 100 células GFP positivas por poço, através de microscopia de fluorescência. A presença de mais de 5 autofagossomos marcados com GFP por célula foi considerada positiva. Ambas as linhagens, após superexpressão de p53, apresentam redução no processo autofágico. Dados em porcentagem.

