

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Centro de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM

TESE DE DOUTORADO

PAPEL DA AUTOFAGIA NA SENESCÊNCIA CELULAR

EDUARDO CREMONESE FILIPPI CHIELA

Orientador: Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Centro de Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM

PAPEL DA AUTOFAGIA NA SENESCÊNCIA CELULAR

Tese de doutorado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

EDUARDO CREMONESE FILIPPI CHIELA

Orientador: Dr. Guido Lenz

Porto Alegre, Maio de 2014

### Dedicatória

Dedico esta tese às pessoas que me mostram diariamente o que é 'amor incondicional', que supera a distância, a saudade e a falta diárias: meus pais e heróis, pelo altruísmo de toda uma vida em prol da felicidade dos filhos, e minha irmã, pelo companheirismo, amizade e encorajamento constantes.

**AGRADECIMENTOS**

**A Deus,**

À coordenadora do PPGBCM, **Marilene H. Vainstein**, aos demais professores e funcionários do PPGBCM, especialmente à **Sílvia** e ao **Luciano**, além dos membros da comissão de acompanhamento, prof. **Rogério Margis** e **Diego Bonatto**.

Ao **CNPq**, pela bolsa de doutorado, e às demais agencias financiadoras.

Aos colaboradores diretos ou indiretos dos projetos de pesquisa nos quais me envolvi nos últimos anos.

Aos meus bolsistas **Marcos** e **Mardja**, pela contribuição fundamental e realização de experimentos em larga escala, além de colaborações em outros trabalhos.

Aos colegas e ex-colegas de laboratório (especialmente à **PatiLu**, **AleP**, **AleT** e **José**) pelas discussões intelectuais, apoio, companheirismo constante e momentos de diversão.

À **Lauren Zamin**, com quem desenvolvi minha base científica e meu pensamento crítico.

Ao professor **Guido**, a quem me faltam palavras pra agradecer pela confiança, otimismo, inspiração, humildade, presença, conhecimento e amizade demonstradas ao longo destes anos, com quem espero ter o prazer de seguir convivendo tanto na vida científica quanto pessoal.

À **Maria Cristina F. Heuser** e à **Tati Luft** pela oportunidade de realizar a prática didática em Biologia Celular para Biomedicina.

Aos meus amigos de Guaporé, especialmente a **Andréa** e o **Tiago**, pela amizade de mais de 20 anos, os quais quero ter por perto sempre que possível.

Aos irmãos que a biomedicina me deu **Maurício**, **Matheus**, **Gabriel**, **Dinler** e **Zé Felipe**, pela enorme parceria no laboratório (José e Andrew) mas principalmente na vida, com quem sempre pude contar e confiar; espero tê-los por perto sempre que possível.

Aos demais colegas de **biomedicina**, principalmente com quem convivi mais nos anos pós-biomedicina turma da qual tenho maior orgulho e com os quais espero não perder contato.

Ao 'ex-labsinal' **José Vargas** por todo convívio, risadas, companheirismo e, acima de tudo, pela amizade sincera e confiança.

Ao grande irmão **Andrew Oliveira Silva** por toda parceria, presença e companheirismo em discussões de laboratório, jogos do grêmio, jantas, festas, viagens, (muitas) caronas e, acima de tudo, pelo convívio diário nos últimos anos; agradeço também aos seus pais, **Marinez** e **Thomas**, minha família porto-alegrense, e à **Daniela Khun** e sua família, sempre tão receptivos e queridos comigo.

Ao **Dr. Nereu Tramontina** e **Dr. Adroaldo Mallmann** e ao fisioterapeuta **Diego Camini**, fundamentais no tratamento e recuperação do Guillain-Barré.

À família da minha **Tia Lilian** pela torcida, certeza da presença constante e preocupação.

Às demais pessoas queridas com quem tenho o prazer de conviver e que tornam a vida mais prazerosa.

Ao meu cunhado **Tiago** e, principalmente, à minha irmã **Patrícia**, por me fazer sentir o cara mais capaz do mundo, pela presença sempre constante e pelo amor incondicional.

Ao meu pai, **Onofre**, e à minha mãe **Sônia**... por tudo - Por tudo que eu sou como pessoa, tudo que eu tenho como princípios, e por toda força e exemplo de perseverança que me dão mesmo sem saber, com a qual luto para fazê-los sentir o tamanho do orgulho que tenho da nossa família e o quanto sou feliz e abençoado por ser filho deles.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS _____	07
LISTA DE FIGURAS E TABELAS _____	09
RESUMO _____	10
ABSTRACT _____	11
APRESENTAÇÃO DA TESE _____	12
INTRODUÇÃO _____	13
1. AUTOFAGIA _____	15
1.1 Conceitos básicos _____	15
1.2 Mecanismos moleculares em autofagia _____	19
a. Proteínas Atg: os controladores diretos da autofagia _____	19
b. Vias de sinalização moduladoras indiretas da autofagia _____	22
1.3 Autofagia e câncer _____	27
2. SENESCÊNCIA _____	30
2.1 Conceitos básicos _____	30
2.2 Tipos de Senescência _____	32
a. Senescência Replicativa _____	32
b. Senescência Induzida _____	33
2.3 Mecanismos moleculares em senescência _____	34
2.4 O estudo da senescência _____	35
2.5 Senescência e câncer _____	36
3. <i>CROSSTALK</i> ENTRE AUTOFAGIA, SENESCÊNCIA E MORTE CELULAR _____	38
3.1 Autofagia e senescência celular _____	38
3.2. Autofagia e apoptose _____	40
OBJETIVOS _____	42
CAPÍTULO I - Nuclear Morphometric Analysis (NMA) _____	43
CAPÍTULO II - Autophagy and Genome Integrity _____	67
CAPITULO III - The Connection of Autophagy and Senescence _____	79
CAPITULO IV - Sleep Or Let Die: Two Sides of Autophagy Inhibition _____	106
CAPITULO V - Kinetic Analysis Of Morphological Alterations In Senescence _____	114
DISCUSSÃO INTEGRADA _____	125
i. A Hipótese Oxidativa _____	125
ii. A Hipótese Mitocondrial _____	130
iii. A hipótese da proteína Atg5 _____	137

iv. Dano ao DNA: um sinal agudo, múltiplas respostas crônicas integradas _____	139
v. Modulação da autofagia na terapia anti-câncer _____	142
vi. Análise de Células Únicas x Análise Populacional _____	146
CONCLUSÕES _____	149
PERSPECTIVAS _____	150
FIGURAS SUPLEMENTARES _____	151
REFERÊNCIAS _____	154
ANEXO I - Métodos Suplementares ao desenvolvimento do NMA (Capítulo I) _____	172
ANEXO II - Patente de Registro referente ao NMA _____	187
CURRICULO LATTES _____	196

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3MA** – 3-metiladenina (*3-methyladenin*)
- 4EBP1** – Proteína ligadora do Fator de Elongamento da tradução eIF4 (*eIF4 Elongation Factor-binding Protein*)
- AMPK** – proteína quinase ativada por AMP (*AMP-activated Protein Kinase*)
- AO** – Laranja de Acridina (*Acridine Orange*)
- ATM** – proteína mutada na ataxia telangiectasia (*Ataxia Telangiectasia-mutated Protein*)
- AVOs** – Organelas Acídicas Vacuolares (*Acidic Vacuolar Organelles*)
- BafA1** – Bafilomicina A1
- Bcl-2** – proteína 2 de linfoma de células B (*B-cell Lymphoma 2*)
- Bec-1** – beclina-1 (*Beclin-1*)
- BER** – Reparo por Excisão de Base (*Base Excision Repair*)
- β-Gal** – Enzima b-galactose ácida associada à senescência (*Senescence-associated β-galactosidase*)
- Bnip3** – *Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3*
- CDKs** – quinases dependentes de ciclinas (*Cyclin-dependent Kinases*)
- Chk1/2** – quinase de ponto de checagem 1 e 2 (*Checkpoint proteins 1 and 2*)
- cP1-4** – população de área celular 1-4 (*cell area Population 1 - 4*)
- DDR** – Resposta de Dano ao DNA (*DNA Damage Response*)
- DFM** – Meio Livre de Droga (*Drug-Free Medium*)
- Doxo** – Doxorubicina
- EGFR** – receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- eIF4E** – fator de iniciação da tradução em eucariotos 4E (*Eukariotic Initiation Factor 4E of*)
- GSK-3β** – glicogênio sintase quinase 3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*)
- HIF-1** – fator induzido por hipóxia 1 (*Hypoxia-induced Factor 1*)
- IDH1** – isocitrato desidrogenase-1 (*Isocytate Dehydrogenase 1*)
- Índice CALA** – Razão entre a área celular e a área de LC3-GFP (*Cell Area / LC3-GFP Area Index*)
- LC3 I/II** – formas I e II da cadeia leve 3 das proteínas associadas a microtúbulos 1A e 2A (*Light Chain 3 of microtubule-associated protein 1A and 2A*)
- LC3-GFP** – proteína LC3 fusionada à proteína verde fluorescente (GFP) (*LC3 protein fused to Green Fluorescence Protein*)
- LR nuclei** – Núcleos Grandes e Regulares (*Large and Regular Nuclei*)
- MAPK** – proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated Protein Kinase*)



- MGMT** – O(6)-metilguanina-DNA metiltransferase (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*)
- MMP** - Potencial de Membrana Mitocondrial (*Mitochondrial Membrane Potential*)
- MMR** – Reparo de Pareamento Incorreto (*Mismatch Repair*)
- mTOR** – proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin*)
- NA1-3** – região de Área Nuclear 1-3 (*Nuclear Area region 1-3*)
- NER** – Reparo por Excisão de Nucleotídeos (*Nucleotides Excision Repair*)
- NHEJ** – Ligação de Terminações Não-Homólogas (*Non-homologous End Junction*)
- NII** – Índice de Irregularidade Nuclear (*Nuclear Irregularity Index*)
- NMA** – Análise Morfométrica Nuclear (*Nuclear Morphometric Analysis*)
- nP1-5** – população de área nuclear 1-5 (*nuclear area Population 1 - 5*)
- OIS** – Senescência Induzida por Superexpressão de Oncogene (*Oncogene-Induced Senescence*)
- PI3K (I a III)** – fosfatidilinositol 3-quinase (classes I à III) (*Phosphoinositide Kinase-3 class I to III*)
- Proteínas Atg** – membros da família de proteínas relacionadas à autofagia (*Autophagy-related protein*)
- PTEN** – proteína homóloga a fosfatase e tensina (*Phosphatase and Tensin Homolog*)
- RAPA** – Rapamicina
- RAPTOR** – Proteína de mTOR Regulada por Rapamicina (*regulatory associated protein of mTOR*)
- ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)
- Rsv** – Resveratrol
- TMZ** – Temozolomida (*Temozolomide*)
- ULK-1** – Proteína quinase semelhante à Unc51 (*Unc-51-like kinase 1*)
- VEGF** – fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor*)
- VCR** – Vincristina

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### FIGURAS PRINCIPAIS

<b>Figura 1</b> – Tipos de autofagia _____	16
<b>Figura 2</b> – Etapas do mecanismo de macroautofagia _____	17
<b>Figura 3</b> – Mecanismo molecular da autofagia _____	20
<b>Figura 4</b> – Regulação da autofagia pela via AMPK-ULK1 _____	25
<b>Figura 5</b> – Mecanismos moleculares que conectam o dano ao DNA à autofagia _____	26
<b>Figura 6</b> – Papel da autofagia durante as diferentes etapas da carcinogênese _____	28
<b>Figura 7</b> – Caracterização geral da senescência _____	31
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática do Objetivo Geral 2 da presente tese _____	43
<b>Figura 9</b> – Mecanismo de ação da TMZ testado para a hipótese oxidativa: ROS exerce papel na autofagia e senescência induzidas por TMZ _____	127
<b>Figura 10</b> – Alvos regulados por ROS em autofagia _____	129
<b>Figura 11</b> – Mecanismo de ação da TMZ explicado pela hipótese mitocondrial _____	132
<b>Figura 12</b> – Efeito da TMZ na população mitocondrial de células de glioma _____	133
<b>Figura 13</b> – Tratamento com TMZ é acompanhado por alterações na massa mitocondrial celular _____	135
<b>Figura 14</b> – Mecanismo de ação da TMZ explicado pela hipótese da proteína Atg5 _____	138
<b>Figura 15</b> – Indução crônica transitória de autofagia e senescência a longo prazo em células de câncer de mama tratadas com Doxorubicina _____	140
<b>Figura 16</b> – Indução crônica transitória de autofagia e senescência a longo prazo por Vincristina de modo dose-dependente em células de glioma U87 _____	141
<b>Figura 17</b> - Efeito da inibição da autofagia em diferentes etapas do mecanismo _____	143
<b>Figura 18</b> - Índice da razão da área celular pela área de GFP-LC3 em células tratadas com TMZ _____	148

### FIGURAS SUPLEMENTARES

<b>Figura Suplementar 1</b> – Via da PI3K/Akt/mTOR _____	151
<b>Figura Suplementar 2</b> – Complexos mTOR _____	152
<b>Figura Suplementar 3</b> – Ponto de Checagem de G2/M _____	153

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Funções das principais proteínas Atg no processo autofágico _____	21
<b>Tabela 2</b> - Principais funções das fosforilações envolvendo a via Akt/mTORC1 _____	24

## RESUMO

Autofagia é o processo de degradação de componentes próprios celulares e parece modular senescência e apoptose induzidas por diferentes tipos de injúria, incluindo dano ao DNA. Populacionalmente, autofagia ocorre logo após o dano ao genoma, enquanto senescência é a resposta crônica das células que resistem à morte celular. Até o momento, nenhum trabalho demonstrou o papel da autofagia na senescência de fato, principalmente considerando uma análise integrada com morte celular e a ocorrência destes mecanismos a nível de células únicas. Inicialmente, desenvolvemos uma metodologia para avaliação do tamanho e forma de núcleos de células eucarióticas em cultura, a Análise Morfométrica Nuclear, a qual foi validada para análise de apoptose, senescência e irregularidades nucleares. O segundo objetivo foi avaliar o papel da autofagia na senescência e morte celular induzidas por dano ao DNA em células de glioblastoma, e os mecanismos moleculares por trás desta relação. Para isso, células expressando estavelmente o marcador de autofagia GFP-LC3 foram tratadas com o indutor de dano ao DNA Temozolomida (TMZ), droga de escolha contra glioblastomas, por 3h seguido do replaqueamento em meio livre de droga. TMZ induziu autofagia transiente e ativação de AMPK-ULK1 e p38 MAPK, acompanhado da supressão crônica da via PI3K/Akt/mTOR. O tratamento com TMZ induziu aumento de vários marcadores de senescência celular a longo prazo, cuja cinética foi analisada de maneira integrada e correlativa, bem como aumentou níveis de ROS, os quais mediarão, ao menos parcialmente, a indução de autofagia e senescência. Considerando a relação entre autofagia e senescência, observamos uma correlação negativa forte entre os mecanismos a nível populacional. Por outro lado, a nível de células únicas esta correlação não foi observada. Através do acompanhamento de células únicas nós observamos também uma redução orquestrada da autofagia independente da aquisição de fenótipo senescente. Esta redução ocorreu antes, durante ou após o aumento da área celular que caracteriza senescência celular, mostrando que a redução da autofagia não é necessária para aquisição do fenótipo senescente. Finalmente, a ativação da autofagia aumentou o efeito pró-senescente da TMZ, enquanto a supressão da autofagia induziu apoptose e reduziu a senescência, sugerindo que a autofagia protege as células da morte celular e permite a entrada das células em estado senescente após tratamento com TMZ. Neste sentido, também discutimos aqui a importância da análise completa e integrada das alterações em mecanismos de proliferação e morte celular induzidas pela inibição da autofagia. Em conclusão, autofagia e senescência parecem ser repostas induzidas por um mesmo sinal mas com cinéticas diferentes nas células expostas a dano ao DNA, estabelecendo uma correlação negativa a nível populacional que não se confirma a nível de células únicas.

## ABSTRACT

Autophagy is the process of degradation of own cellular components and appears to modulate senescence and apoptosis induced by different types of injury, including DNA damage. At a population level, autophagy occurs soon after the damage to the genome, while senescence is chronic response of cells that resist to cell death. To date, no study has demonstrated the role of autophagy in senescence indeed, especially considering an integrated analysis with cell death and the occurrence of these mechanisms at the level of single cells. This thesis consists of two main objectives. Initially, we developed a method to evaluate the shape and size of nuclei of eukaryotic cells in culture, called Morphometric Analysis Nuclear, which was validated for the analysis of apoptosis, senescence and nuclear irregularities. The second objective was to evaluate the role of autophagy in senescence and cell death induced by DNA damage in glioblastoma cells, and the molecular mechanisms behind this relationship. For this, cells stably expressing the autophagy marker GFP- LC3 were treated for 3h with the DNA alkylating agent Temozolomide (TMZ), the drug of choice against glioblastomas, followed by replating in drug-free medium. TMZ induced autophagy and transient activation of AMPK-ULK1 axis and p38 MAPK, accompanied by chronic suppression of the PI3K/Akt/mTOR pathway. The treatment with TMZ induced an increase of several markers of cellular senescence at long term, whose kinetics was analyzed and integrated correlative manner. TMZ also increased ROS levels which mediated, at least in part, the induction of senescence and autophagy. Considering the relationship between autophagy and senescence, we observed a strong negative correlation between the mechanisms at the population level. On the other hand, at a single cell level this correlation was not observed. Through the monitoring of single cells we also observed an orchestrated reduction of autophagy, independently of the senescent phenotype acquisition. This reduction occurred before, during or after increasing the cell area featuring cellular senescence, showing that the reduction of autophagy is not required for the acquisition of the senescent phenotype. Finally, activation of the autophagy increased pro-senescent effect of TMZ, while autophagy inhibition triggered apoptosis and reduced senescence, suggesting that autophagy protects cells from cell death and allows senescence entry after treatment with TMZ. In this sense, we also discuss here the importance of comprehensive and integrated analysis of changes in mechanisms of proliferation and cell death induced by autophagy inhibition. In conclusion, autophagy and senescence responses appear to be induced by the same signal but with different kinetics after DNA damage, establishing a negative correlation at a population level that is not confirmed at the level of single cells.

## APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese de doutorado é composta de: uma **Introdução** apresentando os principais conceitos envolvidos na parte experimental, que são Autofagia (seção 1), Senescência (seção 2) e a relação de autofagia com senescência e apoptose (seção 3). Na sequência, são apresentados os seguintes Capítulos:

**CAPÍTULOS I - Artigo original (*PlosOne*) - *Morphometric Nuclear Analysis*.** Ferramenta/metodologia desenvolvida para análise morfométrica nuclear como técnica complementar aos métodos utilizados em senescência, apoptose e catástrofe mitótica. Além do artigo, foi depositada um patente de propriedade intelectual de proteção à descrição e uso do método, a qual consta como Anexo 2.

**CAPÍTULO II - Artigo de Revisão (*Cell Death and Differentiation*) - *Autophagy and Genomic Integrity*.** Artigo de revisão sobre o papel da autofagia na manutenção da integridade genômica, descrevendo as principais vias ligando Resposta de Dano ao DNA à autofagia, e o papel deste mecanismo no desfecho celular.

**CAPÍTULO III - Artigo Original (submetido ao periódico *Autophagy*) - *Single cell analysis changes the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage*.** Artigo original descrevendo a interação entre autofagia, senescência e morte celular em um contexto de dano ao DNA, tanto a nível populacional quanto a nível de células únicas (*single cell*). São descritos os mecanismos moleculares e celulares disparados ao longo do tempo de maneira integrada.

**CAPÍTULO IV - Comentário (a ser submetido ao periódico *Autophagy*) - *Sleep or let die: two sides of the same coin in the inhibition of autophagy*.** Comentário acerca da importância do planejamento de estudos envolvendo modulação da autofagia e interação desta com outros mecanismos de morte e proliferação celular.

**CAPÍTULO V - *Short take* (a ser submetido ao periódico *AgingCell*) - *Kinetic Analysis Of Morphological Alterations In DNA Damage-Induced Senescence In vitro*.** Descrição da cinética de aparecimento de diferentes marcadores morfológicos, moleculares e metabólicos em senescência induzida por dano ao DNA *In vitro*.

Ao final, é apresentada uma **Discussão Integrada** dos dados obtidos no trabalho, a qual apresenta as principais **hipóteses** geradas a partir dos resultados bem como as **perspectivas** geradas a partir destas hipóteses.

## INTRODUÇÃO

As células eucarióticas são sistemas complexos, expostos continuamente a estressores tanto exógenos quanto endógenos. Alguns sinais são inertes às células, enquanto outros disparam respostas celulares específicas, tais como a proliferação, morte, alterações metabólicas, diferenciação ou transformação celular. Alguns destas respostas são terminais e irreversíveis, tais como a morte celular ou a senescência. Por outro lado, alterações metabólicas e no mecanismo de autofagia, por exemplo, usualmente ocorrem precocemente após um estresse celular, e passam a modular outras respostas celulares. De fato, cada vez mais tem se observado que o estudo de mecanismos de proliferação e morte celular requer uma análise integrada entre os mesmos, de modo a entender o efeito de um determinado contexto sobre as células bem como comportamentos celulares patológicos.

O controle específico destes mecanismos bem como da interação entre eles é muito fino, desde o desenvolvimento embrionário até a manutenção da homeostase do organismo adulto e seu envelhecimento. De fato, alterações em mecanismos de proliferação e morte celular parecem estar envolvidas na patogênese de inúmeras doenças. Neste aspecto, quando esta análise é ampliada ao processo carcinogênico, a complexidade é ainda maior. Isto porque alterações nestes mecanismos e nas interações entre eles são fundamentais tanto para a formação, quanto para manutenção, crescimento e resistência de tumores (Hanahan & Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos nas áreas básica e clínica da oncologia, nos Estados Unidos as mortes por câncer seguem sendo a segunda causa mais frequente (585.720 mortes estimadas para 2014 - <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>, acessado em 02/05/2014), atrás apenas de doenças cardiovasculares. Neste contexto estão os gliomas, tumores do Sistema Nervoso Central que acometem aproximadamente 22.500 pessoas por ano apenas nos Estados Unidos, dentre os quais 70% são malignos (Ostrom *et al.*, 2013). Entre os gliomas malignos, o tipo mais comum (60-70%) e agressivo é o glioblastoma. Aproximadamente 25% dos pacientes sobrevivem 2 anos e menos de 10% dos pacientes sobrevivem 2 anos livre de doença (Stupp *et al.*, 2005; Darefsky *et al.*, 2012), mesmo após cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ), a qual aumenta a sobrevida em apenas 2 meses comparado à cirurgia+radioterapia sozinha (Stupp *et al.*, 2005). Desde os ensaios clínicos iniciais com TMZ em glioblastomas, em 1999 (Stupp *et al.*, 2005), e aprovação da mesma pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2005 (Cohen *et al.*, 2005), nenhum avanço terapêutico foi obtido contra glioblastomas (Darefsky *et al.*, 2012), nem mesmo terapias utilizando anticorpos monoclonais (Chinot *et al.*, 2014; Gilbert *et al.*, 2014). Nos últimos anos, na tentativa de entender a natureza agressiva destes tumores bem como desenvolver novas abordagens terapêuticas, tem aumentado substancialmente o estudo dos mecanismos celulares envolvidos na formação e resistência dos mesmos. Uma vez que estes tumores são caracterizados por alta taxa de recorrência, bem como devido ao fato de glioblastomas usualmente apresentarem mutações que conferem resistência à apoptose, outros mecanismos tem sido bastante estudados nestes tumores, tais como autofagia, catástrofe mitótica e senescência (Lefranc *et al.*, 2009; Gdynia *et al.*, 2010; Cerniglia *et al.*, 2012; Chiao *et al.*, 2013; Filippi-Chiela *et al.*, 2013a). Neste sentido, o estudo da conexão existente entre estes mecanismos é fundamental para o entendimento da formação destes tumores e desenvolvimento racional de novas terapias.

Na presente tese, discutiremos os principais aspectos da interação entre autofagia e senescência, dois mecanismos envolvidos em proliferação e morte celular para os quais tem sido atribuído cada vez mais um papel central na carcinogênese. As seções introdutórias abaixo descrevem as principais características destes dois mecanismos, seguido de uma seção onde a integração da autofagia com senescência e morte celular é apresentada.

## 1. AUTOFAGIA

### 1.1 Conceitos básicos

Autofagia (*auto* - próprio; *fagia* - alimentar-se de) é o processo catabólico pelo qual células degradam componentes próprios através da via lisossomal. Autofagia se mantém em níveis basais nas células e é induzida por estressores de diferentes naturezas, principalmente privação de nutrientes exógenos e dano a componentes celulares como proteínas e organelas. Dessa forma, autofagia exerce um papel fisiológico fundamental na manutenção do metabolismo energético e controle de qualidade de componentes celulares, tais como organelas, proteínas e complexos proteicos (Yang & Klionsky, 2010; Mathew & White, 2011). A importância da autofagia é corroborada pela observação de que o mecanismo é evolutivamente conservado, ocorrendo em *C. elegans* (Kang *et al.*, 2007), *D. melanogaster* (McPhee & Baehrecke, 2009), plantas (Liu & Bassham, 2012) e mamíferos (Yang & Klionsky, 2010). Neste sentido, é importante destacar desde já a natureza citoprotetora da autofagia e a diferença entre os termos autofagia e morte autofágica: autofagia é um mecanismo de proteção celular, enquanto morte autofágica, na verdade, parece ser um conceito incorreto para o qual nunca se obteve comprovação da ocorrência. Na verdade células em processo de morte celular podem apresentar marcadores autofágicos, como a presença de autofagossomos, mas nunca houve a comprovação de que a autofagia seja a causa primária da morte celular, apesar de alguns autores utilizarem este conceito (Levine & Yuan, 2005; Kroemer & Levine, 2008).

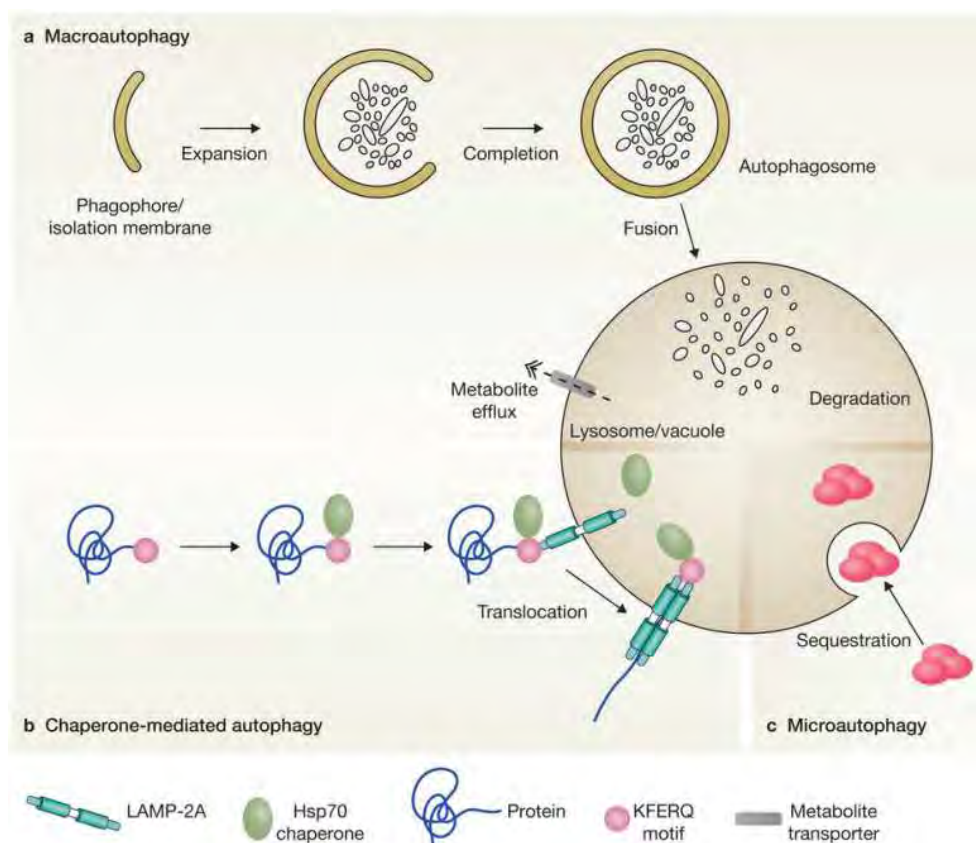
Autofagia exerce papel fundamental durante o desenvolvimento. Após a fecundação do zigoto, ocorre ativação da autofagia, a qual se mantém elevada até a nidação do embrião no fundo do útero. A inibição da autofagia neste contexto suprime a divisão celular e impede o desenvolvimento embrionário (Tsukamoto *et al.*, 2008). Da mesma forma, autofagia é ativada em inúmeros tecidos logo após o nascimento, e é fundamental para o funcionamento correto de órgãos como o coração durante período de privação de nutrientes neonatal (Kuma *et al.*, 2004). Em *C. elegans* a autofagia ativada pela fertilização é responsável pela degradação de mitocôndrias paternas no embrião (Sato & Sato, 2011).

No organismo adulto e em células em cultura expostas a condições ideais de nutrientes, temperatura, pH, atmosfera e adesão, os níveis basais de autofagia se mantêm reduzidos (entre 5 e 10% das células apresentam marcação positiva para o ensaio de agregação da proteína de fusão GFP-LC3, marcadora de autofagossomos muito utilizada e discutida posteriormente). Por outro lado, alterações em quaisquer destas variáveis induzem o aumento da autofagia, como uma resposta celular adaptativa ao estresse. As condições de estresse celular mais bem descritas e caracterizadas como indutoras de autofagia celular são a privação de nutrientes, como glicose e aminoácidos (Russell *et al.*, 2014), e fatores de crescimento (Lum *et al.*, 2005). Neste contexto, as células disparam vias de sinalização que levam à parada da proliferação celular e ativação de mecanismos de adaptação, entre os quais destaca-se a autofagia, com o intuito de prover substratos energéticos e estruturais à célula. *In vivo*, Mizushima e col observaram a rápida ativação de autofagia em células musculares, pulmonares, pancreáticas, hepáticas, entre outras após exposição de murinos à privação de nutrientes (Mizushima *et al.*, 2004). Além das alterações ambientais citadas acima, também



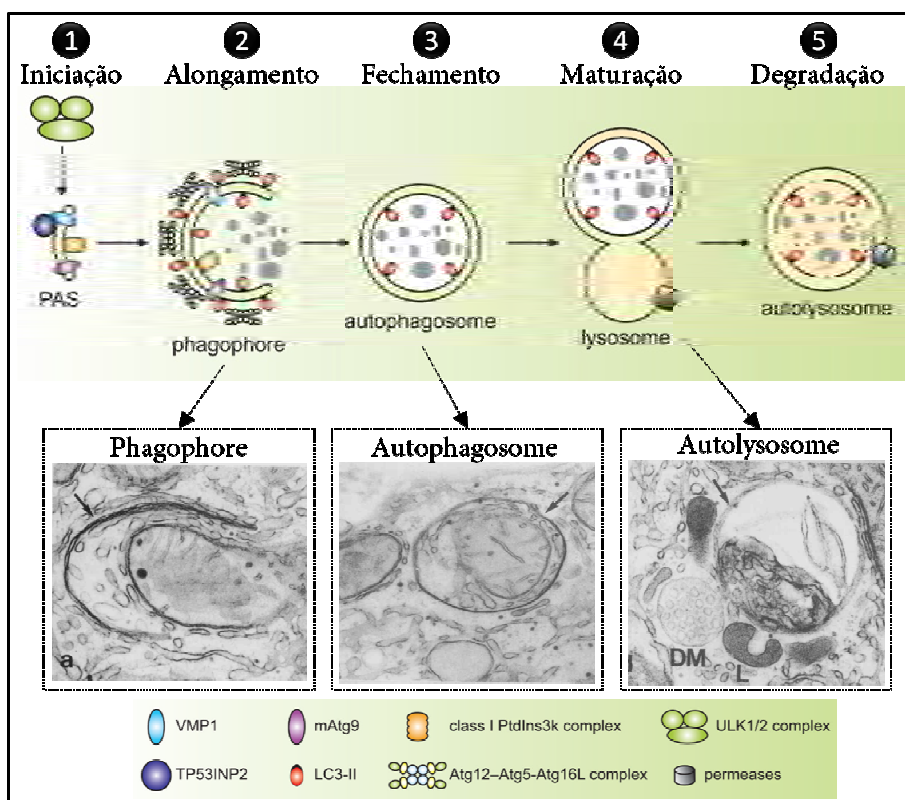
induzem autofagia a presença de toxinas, microorganismos, sinalizadores parácrinos e drogas citotóxicas que afetam diferentes componentes celulares, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, DNA, microtúbulos e proteínas (Meijer & Codogno, 2004).

Existem 3 tipos de autofagia (**Figura 1**) (Boya *et al.*, 2013): **(a)** Macroautofagia, **(b)** Autofagia mediada por chaperonas (CMA) e **(c)** Microautofagia. Na CMA, proteínas ou complexos proteicos com conformação incorreta e que permanecem com proteínas chaperonas ainda ligadas a sua estrutura no citoplasma são direcionados ao lisossomo para degradação e reaproveitamento de aminoácidos ou pequenos peptídeos. O reconhecimento da chaperona ligada à proteína ou complexo a ser degradado se dá pela proteína lisossomal de membrana LAMP-2A (*Lysosomal-associated Membrane Protein 2A*), a qual faz o translocamento para o meio intralisossomal, onde hidrolases ácidas realizam a quebra do material. Na microautofagia, componentes celulares pequenos são entregues diretamente ao lisossomo, onde acontece a degradação dos mesmos. Estes dois tipos de autofagia são pouco caracterizados, e parecem representar apenas uma pequena parte de toda autofagia celular (Boya *et al.*, 2013).



**Figura 1 - Tipos de autofagia.** Existem 3 tipos de autofagia em células eucarióticas, os quais diferem na maneira como o material celular próprio é entregue para degradação nos lisossomos. O principal mecanismo e que representa mais de 90% da autofagia celular corresponde à **(a) macroautofagia**, que resumidamente ocorre com a formação de uma organela de membrana dupla que engloba componentes celulares próprios (o autossomo), entregando-os para os lisossomos. Macroautofagia será descrita com mais detalhes na Figura 2. O segundo mecanismo é a **(b) Autofagia mediada por chaperonas (CMA)**, que se baseia no reconhecimento, por proteínas lisossomais, de chaperonas ligadas a proteínas citosólicas através do motivo KFERQ. Chaperonas são proteínas presentes principalmente no retículo endoplasmático e contribuem para o dobramento correto da proteína. Proteínas funcionais citoplasmáticas não apresentam chaperonas ligadas à sua estrutura. O complexo formado pela proteína contendo o motivo KFERQ e a chaperona ligada a este é reconhecido pela proteína lisossomal LAMP-2A, levando ao englobamento e degradação dos componentes celulares. O terceiro tipo é a **(c) Microautofagia**, a qual envolve a entrega direta e não-seletiva de componentes celulares pequenos ao lisossomo. Obtido de: Boya et al (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15, 713-720

A macroautofagia é comumente referida apenas como autofagia, e será assim na presente tese. Este mecanismo envolve 5 principais etapas: 1. Iniciação e nucleação do pré-fagóforo; 2. Alongamento da membrana; 3. Fechamento do autofagossomo; 4. Maturação do mesmo por fusão ao lisossomo; e 5. Degradação dos componentes autofagocitados (**Figura 2**). Autofagia inicia com a formação do pré-fagóforo (Estrutura Pré-Fagossomal, PAS), o qual consiste de uma membrana dupla alongada em forma de meia-lua (PAS também é chamado de omegassomo, em função da morfologia típica que lembra a letra grega ômega -  $\Omega$ ). Sinais de ativação de autofagia levam à ligação de proteínas específicas à membrana do pré-fagóforo, causando o alongamento e fechamento da estrutura de membrana dupla, formando o autofagossomo. É importante notar que, até esta etapa, ocorre apenas o sequestro do conteúdo próprio celular, sem degradação do mesmo. A etapa seguinte envolve a fusão do autofagossomo com lisossomos, mediada por proteínas de membrana de ambas as organelas e que requer que o lisossomo esteja com pH ácido, uma vez que inibidores da acidificação lisossomal suprimem esta fusão. Após a fusão do autofagossomo com o lisossomo, forma-se o autofagolisossomo, a estrutura funcional do mecanismo autofágico. No autofagolisossomo, os componentes celulares são degradados pelas hidrolases ácidas lisossomais, as quais são capazes de degradar proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos. Os produtos de degradação gerados a partir da autofagia são liberados para o meio intracelular através do efluxo por transportadores da membrana lisossomal (permeases transportadoras de metabólitos) (Yang & Klionsky, 2010).



**Figura 2 - Etapas do mecanismo de macroautofagia.** A autofagia compreende as etapas de: (1) Iniciação, na qual ocorre o recrutamento de proteínas para a membrana dupla da estrutura pré-autofagossomal (PAS); (2) alongamento do fagóforo, mediado pela interação de outros complexos proteicos específicos, seguido do (3) fechamento do mesmo para formação do autofagossomo; (4) maturação do autofagossomo, e ocorre através da fusão deste com lisossomos, levando à formação do autofagolisossomo, onde ocorre a (5) degradação dos componentes celulares através da atividade das hidrolases lisossomais. Modificado de: Yang Z & Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131.

A origem da dupla-membrana pré-autofagossomal (PAS), a qual inicia o sequestro dos componentes celulares a serem degradados e, posteriormente, forma o autofagossomo ainda é incerta. Na verdade, os dados existentes até o momento sugerem que diferentes compartimentos membranares intracelulares dão origem ao PAS e, subsequentemente, ao autofagossomo (Tooze & Yoshimori, 2010). O que determina a formação da PAS, na verdade, é a interação de proteínas específicas, as quais serão apresentadas na próxima seção, com a membrana que irá originar o autofagossomo. Entre as estruturas celulares que fornecem esta membrana inicial estão a rede mitocondrial (Cook *et al.*, 2014), complexo de Golgi, principalmente na porção *trans* do complexo (van der Vaart & Reggiori, 2010), a própria membrana plasmática, a partir de regiões de fossas de clatrina (Cuervo, 2010) e retículo endoplasmático (Axe *et al.*, 2008).

Considerando a especificidade de alvos a serem degradados, a autofagia pode ser classificada em seletiva - quando o componente a ser degradado é marcado de alguma forma, levando ao seu direcionamento ao autofagossomo - ou não-seletiva, que corresponde ao englobamento de conteúdos citoplasmáticos e/ou organelas aleatoriamente, de componentes presentes na região onde o pré-autofagossomo se forma. Em células de mamíferos já estão descritos mecanismos de degradação autofágica específicos de mitocôndrias (mitofagia), peroxissomos (pexofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia) e fragmentos nucleares (nucleofagia) (Kraft *et al.*, 2009). A principal proteína descrita como marcadora de 'lixo' celular a ser degradado pela célula é a proteína p62 (ou sequestrossomo 1 - SQSTM1) (Pankiv *et al.*, 2007; Komatsu & Ichimura, 2010). P62 possui inúmeros sítios de interação com outras proteínas, entre os quais um sítio de interação com ubiquitina, pequena proteína que marca proteínas e complexos proteicos a serem degradados pela via proteossomal, e outro sítio que interage com uma proteína específica da membrana do PAS e do autofagossomo em formação, chamada LC3 (ou Atg8), a qual será apresentada posteriormente (Moscat & Diaz-Meco, 2009). Dessa forma, p62 interage e marca componentes celulares, incluindo proteínas, complexos e agregados proteicos e organelas que devem ser envoltos por autofagossomos e degradados por autofagia, e desempenha um papel central no *turn over* e, conseqüentemente, no controle de qualidade de componentes celulares. Como consequência, tem sido atribuído um papel central à p62 no equilíbrio entre autofagia, apoptose e estado oxidativo celular no contexto da formação tumoral (Pankiv *et al.*, 2007; Puissant *et al.*, 2012).

Outra questão importante diz respeito à coordenação temporal de degradação de componentes celulares através da autofagia. Pelo fato de ser um mecanismo fisiológico essencial envolvido na manutenção da homeostase celular, as células eucariotas desenvolveram um controle específico para degradação dos componentes próprios durante um período de exposição a uma condição de estresse celular. Neste sentido, em contexto de privação de aminoácidos células eucariotas direcionam seus componentes para degradação autofágica de maneira tempo-dependente. Inicialmente, são degradadas proteínas citosólicas e proteassomos, seguido da degradação de ribossomos e, somente após 24h do início da privação, mitocôndrias são direcionadas aos autofagossomos. Este controle é fundamental para manutenção da homeostase energética celular - a eliminação precoce de mitocôndrias levaria a um colapso energético celular que dificultaria enormemente o funcionamento de maquinarias celulares e a sobrevivência celular adaptativa à condição de estresse (Kristensen *et al.*, 2008). Entre estas condições estão a restrição de nutrientes e oxigênio a que células tumorais são expostas durante a formação inicial de tumores sólidos, como discutido abaixo.

Entretanto, se por um lado autofagia contribui para manutenção do metabolismo e estrutura celulares em um contexto adequado (ou seja, em intensidade, duração e alvos adequados), por outro lado o mecanismo pode desempenhar um papel citotóxico quando disparado em contexto inadequado (Shintani & Klionsky, 2004; Baehrecke, 2005). Isto inclui tanto autofagia em baixos níveis, a qual leva ao acúmulo de proteínas envelhecidas e organelas danificadas, quanto autofagia em excesso ou com duração prolongada, a qual pode levar a um desbalanço energético e estrutural e ao colapso celular (Nishida *et al.*, 2008). Inicialmente, acreditava-se que a auto-degradação de componentes celulares induzidas por tratamentos exógenos contribuía quase exclusivamente para redução da viabilidade celular (Kondo & Kondo, 2006). Dessa forma, os termos 'autofagia' e 'morte autofágica' foram utilizados sem distinção durante anos. Esta quebra de conceito ocorreu entre os anos 2007 e 2009, principalmente a partir da descrição dos mecanismos moleculares envolvidos no controle da autofagia, bem com o advento de compostos moduladores do mecanismo. Outro ponto importante foi o surgimento da revista *Autophagy*, em 2007, a qual centralizou e contribuiu enormemente para a padronização metodológica e conceitual em autofagia. De fato, a partir dos anos 2007/2008 o quadro da razão entre 'autofagia citotóxica' e 'autofagia citoprotetora' inverteu, e atualmente sabe-se que a autofagia exerce papel citoprotetor em aproximadamente 70% dos contextos em que é induzida, tanto em células normais quanto tumorais (Maes *et al.*, 2013).

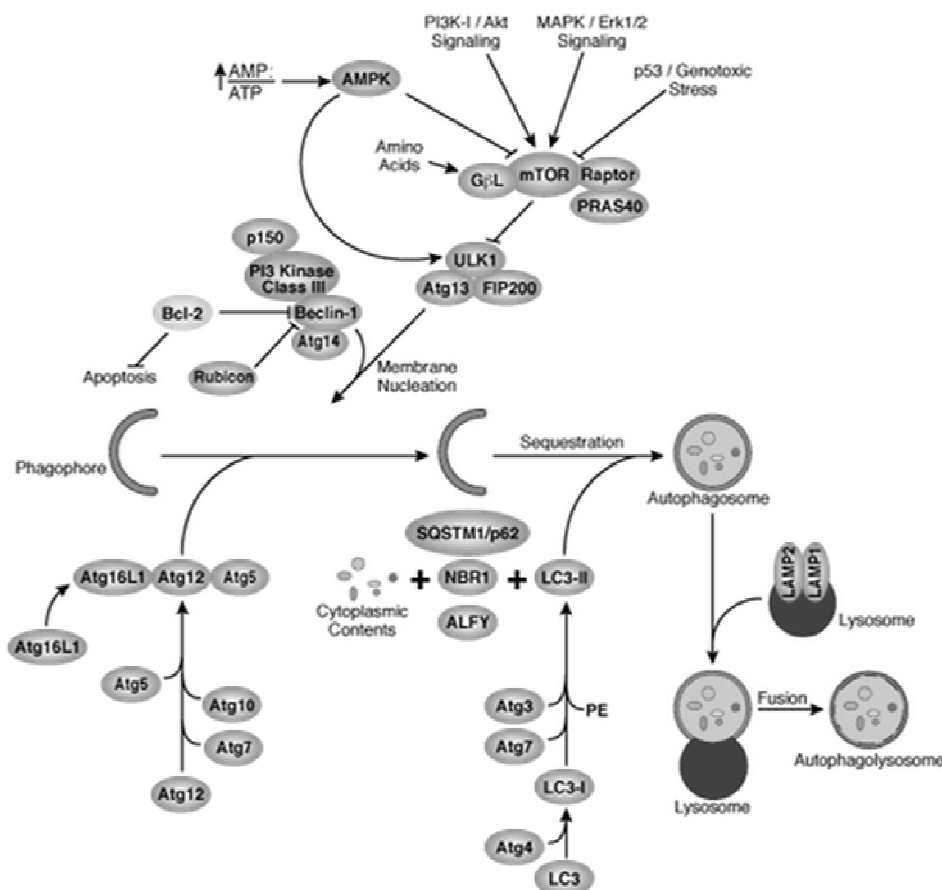
## 1.2 Mecanismos Moleculares em Autofagia

### a. Proteínas Atg: os controladores diretos da autofagia

O controle molecular do mecanismo autofágico propriamente dito é realizado pelas proteínas da família *Atg* (*Autophagy-related proteins*) (**Figura 3**). Estas proteínas controlam diretamente a formação do fagóforo e o fechamento do autofagossomo (Yang & Klionsky, 2010) através de funções específicas sumarizadas na **Tabela 1**. Muitas das proteínas *Atg* apresenta uma propriedade semelhante à ubiquitina ligases, transferindo pequenas moléculas entre proteínas. O processo inicia com a formação de um complexo inicial, o Complexo ULK, formado pelas proteínas Ulk1 (ortólogo de Atg1, de leveduras), Atg13 e FIP200 (ortólogo de Atg17, de leveduras). Este complexo sinaliza a iniciação do mecanismo e a ativação de um segundo complexo, o Complexo PI3K. Este por sua vez é formado pelas proteínas Beclina-1/Atg6 + PI3K classe III + Atg14 + p150 + Ambra-1, e é recrutado para a membrana do profagóforo para início da nucleação (também mostrado na Figura 2). Outras proteínas transmembrana também colocalizam com marcadores de autofagossomos e parecem ter papel importante no alongamento do mesmo, tais VMP1 e mAtg9, mostradas na Figura 2.

Após a iniciação e nucleação do PAS, o processo de alongamento do fagóforo inicia. Neste sentido, além do Complexo PI3K, o Complexo ULK sinaliza para ativação da proteína Atg7, a qual catalisa a conjugação das proteínas Atg5 e Atg12. Ao complexo conjugado Atg5-Atg12 liga-se, então, à proteína Atg16L e, através deste complexo completo, ocorre o alongamento do profagóforo. O fechamento do fagóforo em autofagossomo ocorre através da conjugação de uma fosfatidiletanolamida (PE) à proteína LC3 II (ortólogo de Atg8 de

leveduras) pelas proteínas Atg7 e Atg3. LC3 (*Microtubule-associated protein - Light Chain 3*) é uma proteína citosólica, clivada pela proteína Atg4 assim que expressa, gerando a forma I (LC3-I) da proteína LC3, a qual permanece dispersa no citoplasma. A lipidação de LC3-I pelas proteínas Atg7 e Atg3 leva à formação da LC3-II, a qual dirige o fechamento do autofagossomo. A proteína LC3-II também interage diretamente com a proteína p62, a qual marca componentes celulares específicos que devem ser destinados à degradação autofágica.



**Figura 3 - Mecanismo molecular da autofagia.** As etapas do processo autofágico são guiadas pelas proteínas Atg. O primeiro complexo na via da autofagia é o Complexo ULK (ULK1 + Atg13 + FIP200), o qual atua em conjunto com o Complexo PI3K (p150 + PI3K classe III + beclina + Atg14). Estes complexos iniciam a nucleação da membrana do fagóforo. Na sequência, a formação do Complexo Atg5-Atg12-Atg16L1 dirige o alongamento desta membrana, que é fechada com a participação da proteína LC3 na sua forma lipida (LC3 II), a qual acopla-se à membrana do fagóforo e dirige tanto o fechamento quanto o recrutamento específico de parte do material a ser autofagocitado. Na sequência, o autofagossomo funde-se com o lisossomo, formando o autolisossomo. *Obtido de: www.cellsignal.com* (em abril, 2014).

Apesar dos dados acima que descrevem o papel específico de proteínas Atg na autofagia, os mecanismos moleculares que controlam o processo autofágico estão longe de serem totalmente elucidados. Por exemplo, RNA de interferência para diferentes Atgs, muitos dos quais exercem um papel aparentemente fundamental à autofagia, reduzem mas não suprimem completamente a autofagia (Scarlati *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012; Basit *et al.*, 2013). Dessa forma parece existir, entre as proteínas Atg, mecanismos de compensação e proteínas capazes de exercer mais de uma atividade durante as etapas da autofagia, à semelhança do que ocorre em outros mecanismos fundamentais para a célula.

**Tabela 1 - Funções das principais proteínas Atg no processo de formação dos autofagossomos.**

Proteína	Ortólogo (levedura)	Posição na via autofágica	Função na autofagia	Ref
ULK1 e ULK2	Atg1	Complexo ULK	Medeia a sinalização de mTOR e ATG9	(Chan <i>et al.</i> , 2007)
ATG13		Complexo ULK	Substrato de ULK1 e ULK2 que também modula a atividade do complexo ULK	(Chan <i>et al.</i> , 2009)
FIP200	Atg17	Complexo ULK	Substrato de ULK1 e ULK2 que também modula a atividade do complexo ULK	(Hara <i>et al.</i> , 2008)
ATG101		Complexo ULK	Interage com ULK1 e ATG13	(Hosokawa <i>et al.</i> , 2009; Mercer <i>et al.</i> , 2009)
Beclin 1	Atg6	Complexo PI3K	Componente do complexo PI3K e também com papel na autofagia durante iniciação, formação e maturação	(Liang <i>et al.</i> , 1999)
VPS34		Complexo PI3K	Subunidade catalítica do complexo PI3K	(Stoyanov <i>et al.</i> , 1995)
p150	Vps15	Complexo PI3K	Recruta o complexo PI3K para membranas	(Volinia <i>et al.</i> , 1995)
ATG14L	Atg14	Complexo PI3K	Dirige o complexo PI3K para o omegassomo; também chamada de Barkor	(Matsuura <i>et al.</i> , 2008; Sun <i>et al.</i> , 2008)
Ambra-1		Complexo PI3K	Recruta Beclina-1 para a membrana do retículo endoplasmático	(Di Bartolomeo <i>et al.</i> , 2010)
ATG3		Conjugação de LC3-PE e ATG12	Similar ao sistema enzimático de conjugação de ubiquitina E2; conjuga fosfatidiletanolamina à LC3	(Tanida <i>et al.</i> , 2002)
ATG4		Conjugação de LC3-PE e ATG12	Protease que cliva LC3 para formar LC3 I; também realiza a delipidação de LC3 II para reciclagem da proteína LC3 a partir da membrana do autofagossomo	(Kabeya <i>et al.</i> , 2004)
ATG7		Conjugação de LC3-PE e ATG12	Similar ao sistema enzimático de conjugação de ubiquitina E1; ativa homólogos de LC3 e ATG12	(Mizushima <i>et al.</i> , 1998)
LC3-A/B/C, GABARAP L1/2/3	Atg8	Conjugação de LC3-PE e ATG12	Proteínas semelhantes à ubiquitina que recrutam material para os autofagossomos e contribuem para o fechamento da membrana	(Kabeya <i>et al.</i> , 2000; Kabeya <i>et al.</i> , 2004)
ATG5		Conjugação de ATG5-ATG12	Conjugada à ATG12, para dirigir o alongamento e curvatura do profagóforo à autofagossomo	(Mizushima <i>et al.</i> , 1998)

(continuação da Tabela 1)

Proteína	Ortólogo (levedura)	Posição na via autofágica	Função na autofagia	Ref
ATG10		Conjugação de ATG5-ATG12	Similar ao sistema enzimático de conjugação de ubiquitina E2, liga ATG12 a um resíduo interno de lisina na ATG5	(Mizushima <i>et al.</i> , 1998)
ATG12		Conjugação de ATG5-ATG12	Conjugada à ATG5, para dirigir o alongamento e curvatura do profagóforo à autofagossomo; também ativa ATG3	(Mizushima <i>et al.</i> , 1998; Sakoh-Nakatogawa <i>et al.</i> , 2013)
ATG16L1		Complexo ATG5-ATG12	Liga-se ao complexo ATG5-ATG12 e dirige a conjugação de LC3 à membrana da estrutura pré-fagossomal	(Qu <i>et al.</i> , 2003)
ATG9A and ATG9B	Atg9	Proteína integral de membrana	Necessária para a formação do autofagossomo	(Young <i>et al.</i> , 2006)
ATG2A and ATG2B	Atg2	Localiza no omegassomo	Necessária para o fechamento do autofagossomo	(Velikkakath <i>et al.</i> , 2012)

Adaptado de: Yue e col (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Autophagy*, **62**, 112-114.

Além disso, cada vez mais tem sido demonstrado que proteínas Atg exercem outras funções celulares, tais como modulação do transporte intracelular, secreção celular, sinalização celular em geral, transcrição/tradução, modulação da morte celular independente de autofagia e reorganização de membranas celulares (Subramani & Malhotra, 2013). Estes dados complicam ainda mais as análises envolvendo silenciamento ou deleção destes genes.

### **b. Vias de sinalização moduladoras indiretas da autofagia:**

Como demonstrado na Figura 3 acima, as proteínas Atgs e os complexos que dirigem o mecanismo autofágico são modulados pelas principais vias de controle da proliferação, morte e metabolismo celular, reforçando o papel fundamental da autofagia na homeostase celular. A modulação indireta da autofagia pode ser dividida entre as vias que regulam negativamente o mecanismo, entre as quais destacam-se as vias de proliferação celular PI3K e MAPK, e as vias que regulam positivamente o mecanismo, entre as quais destacam-se as vias da AMPK e p53/dano ao DNA (Yang & Klionsky, 2010). Estas vias atuam principalmente sobre o Complexo mTOR1 (mTORC1), o qual atua como o mais importante repressor da autofagia celular por reprimir o Complexo ULK. A exceção ocorre para a via da AMPK, a qual é capaz de ativar autofagia independente de mTORC1, fosforilando e ativando diretamente o Complexo ULK (Akers *et al.*, 2012). Abaixo são descritos alguns detalhes importantes das principais vias moduladoras do processo autofágico.

### PI3K/Akt/mTOR

A via PI3K/Akt é uma das mais importantes mediadoras da sobrevivência celular (**Figura Suplementar 1 – Via da PI3K/Akt/mTOR**). A partir da ligação de sinais a receptores de membrana plasmática tais como fatores de crescimento, insulina, citocinas e integrinas, bem como por intermédio da ativação da via oncogênica Ras, ocorre a ativação da proteína PI3K e a formação de mediadores fosfolipídicos intracelulares, como Fosfatidilinositol 3,4,5-Trifosfato (PIP3), próximo à monocamada interna da membrana plasmática. Como consequência, ocorre o recrutamento e ativação da proteína Akt (PKB), a qual sinaliza para diferentes desfechos relacionados à proliferação e sobrevivência celular: inibição de vias pro-apoptóticas, repressão de sinais de parada no ciclo celular, incremento do metabolismo glicolítico e ativação da síntese proteica (Jimenez *et al.*, 2002; Manning & Cantley, 2007). A principal proteína inibidora da ativação da via da Akt é a proteína PTEN (Cantley & Neel, 1999; Salmena *et al.*, 2008), fosfatase que remove grupamentos fosfato do PIP3. Dessa forma, PTEN atua como importante supressor tumoral, uma das vias mais comumente alteradas em células tumorais (Cheung & Testa, 2013).

Entre os alvos ativados pela proteína Akt está a proteína mTOR (Hahn-Windgassen *et al.*, 2005), a qual está presente em dois complexos distintos na célula, mTORC1 e mTORC2 (Bhaskar & Hay, 2007) (**Figura Suplementar 2 – Complexos mTOR**). O primeiro, Complexo 1 da mTOR (mTORC1) é formado pelas proteínas mTOR + Raptor + GβL, e é modulado positivamente pela proteína Akt e inibido pelo composto rapamicina (RAPA, que atua sobre a proteína Raptor – *Regulatory Associated Protein of mTOR*). O complexo quinásico mTORC1 tem como alvos de fosforilação as proteínas p70 S6k e 4E-BP1 (*eIF4E-Binding Protein 1*). A primeira é uma proteína mitogênica, requerida para proliferação celular e progressão pela fase G1 do ciclo celular, sendo responsável pela fosforilação do componente S6 da subunidade ribossomal 40S, fundamental à tradução proteica (Kawasome *et al.*, 1998). A proteína 4E-BP1, por sua vez, atua inibindo a tradução dependente de CAP por se ligar ao fator de iniciação da tradução eIF4E. Quando fosforilada pela proteína mTOR, 4E-BP1 libera o fator eIF4E, permitindo o início da tradução (Pause *et al.*, 1994a; Pause *et al.*, 1994b). Além disso, a ativação da via da Akt leva à inativação a proteína TSC2, repressora de mTORC1. Como consequência, mTORC1 é ativada e autofagia é reprimida por supressão do Complexo ULK. (Inoki *et al.*, 2002). Dessa forma, o complexo mTORC1 integra múltiplos sinais sensores da disponibilidade de fatores de crescimento, nutrientes e energia, modulando o crescimento celular (Reiter *et al.*, 2004; Zoncu *et al.*, 2011).

O segundo complexo que envolve a proteína mTOR, muito menos conhecido do que mTORC1, é o mTORC2, formado pelas proteínas mTOR + Rictor + GβL. Este complexo é insensível à rapamicina (Rictor = *Rapamycin-insensitive companion of mTOR*) e atua ativando proteína Akt, dessa forma reprimindo a autofagia e favorecendo a proliferação celular (Zoncu *et al.*, 2011) (**Figura Suplementar 2**).

### AMPK-ULK1

A proteína AMPK (*AMP-activated Protein Kinase*) desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase energética, de leveduras a plantas e animais. A proteína AMPK é composta de uma subunidade catalítica (alfa) e duas subunidades



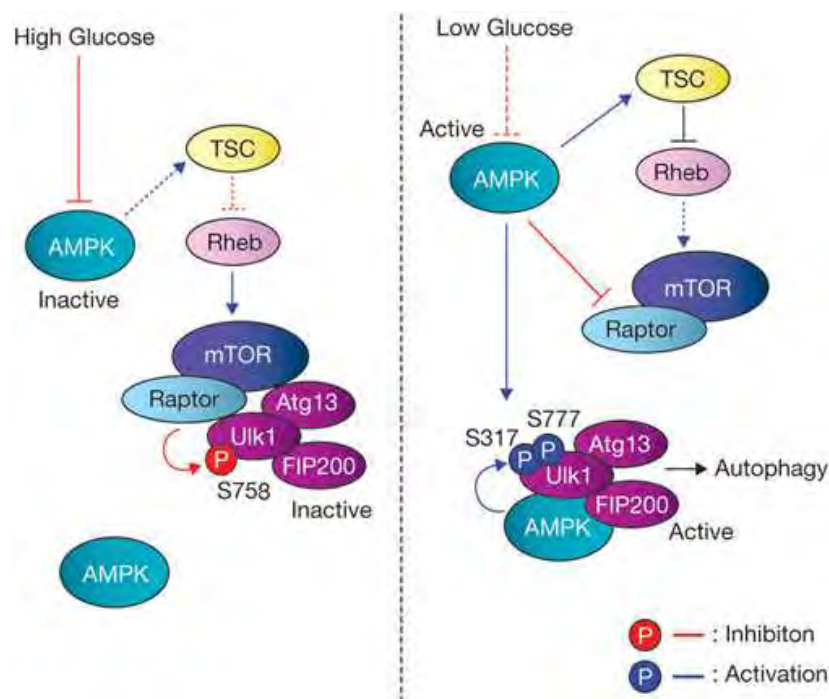
regulatórias (beta e gama), sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP. Neste contexto tem importância a proteína adenilato cinase (ADK), a qual exerce papel central na homeostase energética celular através do controle dos níveis de nucleotídeos adenina (ATP, ADP e AMP) na célula. ADK combina duas moléculas de ADP gerando 1ATP e uma molécula de ADP, e através desta atividade os níveis de ATP se mantêm de 7-10 vezes maiores do que ADP e mais de 100 vezes maiores que AMP (Beis & Newsholme, 1975). O aumento da razão AMP/ATP é causado por privação de nutrientes, bem como por estresse celular, alterações ambientais, hipóxia e isquemia. Neste sentido, AMPK é fundamental à adaptação celular frente a condições energeticamente desfavoráveis, e a autofagia exerce papel fundamental nestes contextos (Mihaylova & Shaw, 2011). A proteína AMPK ativa autofagia tanto indiretamente, através da inibição do complexo mTORC1 por meio da fosforilação inibitória de Raptor e ativação de TSC2, levando à ativação do Complexo ULK, bem como através da ativação direta do Complexo ULK (Egan *et al.*, 2011a; Kim *et al.*, 2011; Shang & Wang, 2011), como mostrado na **Figura 4**. Todos estes mecanismos de ativação/repressão são controlados por meio de fosforilações em sítios específicos, sendo os principais deles sumarizados na **Tabela 2**. De fato, a via AMPK-Ulk1-mTOR é central no controle da autofagia celular (Ganley *et al.*, 2009), tanto induzida por privação de nutrientes (Shang *et al.*, 2011) quanto induzida por dano ao DNA (Singh *et al.*, 2012) e ativação de p53 (Gao *et al.*, 2011).

**Tabela 2 - Principais funções das fosforilações envolvendo as vias Akt/mTORC1 e AMPK/ULK1.**

Proteína e Sítio de Fosforilação	Principal Quinase	Função	Ref
p70S6K T389	mTORC1 (aparentemente indiretamente, por redução da defosforilação)	Necessária para atividade da proteína	(Rosner <i>et al.</i> , 2009)
p70S6K S371	GSK3b	Necessária para a fosforilação T389 e atividade de p70S6K	(Shin <i>et al.</i> , 2011)
Raptor S792	AMPK	Mecanismo importante de inibição de mTORC1	(Gwinn <i>et al.</i> , 2008)
mTOR S2448	Proteína Quinase B / Akt	Correlaciona com a atividade de mTORC1	(Nave <i>et al.</i> , 1999)
mTOR S2481	Auto-fosforilação	Fundamental à formação e atividade quinase de mTORC1	(Peterson <i>et al.</i> , 2000)
ULK1 S555	AMPK (direto)	Ligação à ATG13 e autofagia	(Egan <i>et al.</i> , 2011b)
ULK1 S317, S467, S555, S574 e S777	AMPK (direto)	Necessárias para a atividade cinásica de ULK1	(Egan <i>et al.</i> , 2011b; Kim <i>et al.</i> , 2011)
ULK1 S575	mTORC1	Desfaz a interação entre AMPK e ULK1	(Kim <i>et al.</i> , 2011)

Proteína Sítio de Fosforilação	Principal Quinase	Função	Ref
ULK1 S758	mTORC1	Desfaz a interação entre AMPK e ULK1	(Kim <i>et al.</i> , 2011; Shang & Wang, 2011)
ULK1 S638	mTORC1 e AMPK	Desfaz a interação de AMPK e ULK1	(Egan <i>et al.</i> , 2011b; Shang & Wang, 2011)
pULK1 (sítio incerto – entre os resíduos 278 e 351)	Autofosforilação	Modula a conformação da cauda C-terminal e impede sua interação com Atg13	(Hara <i>et al.</i> , 2008; Chan <i>et al.</i> , 2009)

É importante destacar que a ativação da proteína AMPK pode ocorrer devido ao aumento de ROS e  $Ca^{2+}$  intracelular, de maneira independente razão de AMP/ATP, levando à ativação da autofagia (Emerling *et al.*, 2009; Mungai *et al.*, 2011). Neste contexto oxidativo, autofagia exerce um papel importante na manutenção da qualidade dos componentes celulares através da eliminação de estruturas celulares danificadas pelas espécies reativas de oxigênio, como mitocôndrias e outros complexos proteicos (Scherz-Shouval & Elazar, 2011).

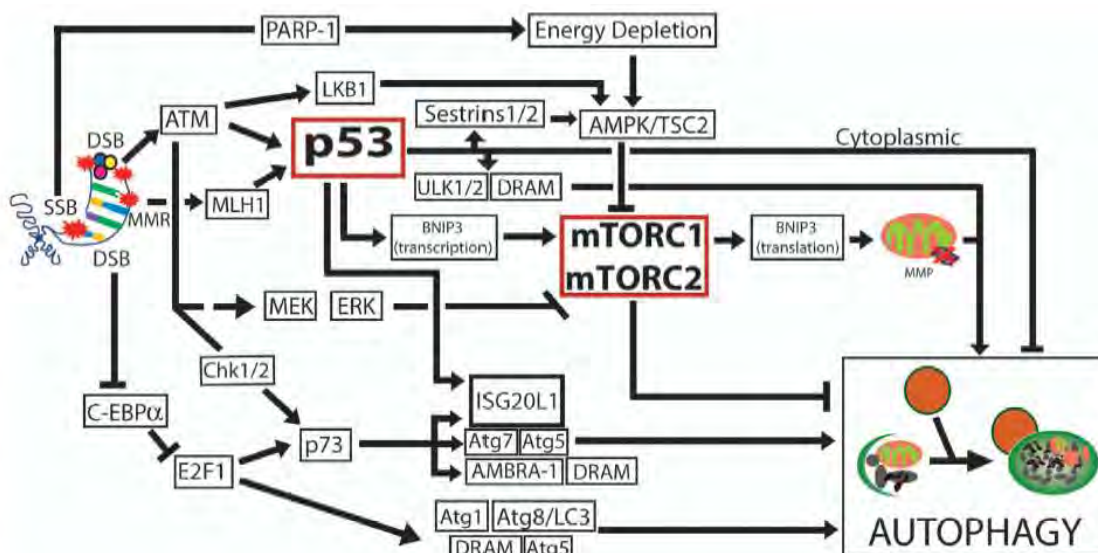


**Figura 4 - Regulação da autofagia pela via AMPK-ULK1.** À esquerda é mostrado o contexto em que a célula se encontra em ambiente com altos níveis de glicose. Neste caso a proteína AMPK está inativa, uma vez que a razão AMP/ATP é baixa. Neste contexto, o complexo mTORC1 está ativo e fosforila Ulk1 de modo a inibir o Complexo ULK1, iniciador da autofagia. Em paralelo, há síntese proteica. Quando há redução da glicose (à direita), ocorre o aumento da razão AMP/ATP e ativação de AMPK, com o objetivo de induzir autofagia e manter a homeostase energética celular. Isto ocorre via fosforilação de Ulk1 pela AMPK. AMPK também ativa TSC, inibindo indiretamente mTORC1, e reprime Raptor, inibindo diretamente mTORC1. Dessa forma, AMPK ativa autofagia tanto diretamente (ativando ULK1) quanto indiretamente (inibindo mTORC1 por duas vias). Obtido de: Kim et al (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132-141

### P53/dano ao DNA

Os sinais que disparam autofagia a partir de dano ao DNA são múltiplos e dependem tanto do tipo de resposta de dano ao DNA disparada (do inglês, DDR – *DNA Damage Response*) quanto do mecanismo de reparo disparados (**Figura 5**). Os sinais que partem das proteínas sensores do dano genômico têm como alvos, entre outros, proteínas que modulam a autofagia especificamente em resposta a dano ao DNA, tais como os alvos de p53 DRAM (*Damage-Regulated Autophagy Modulator*) (Crighton *et al.*, 2006) e ISG20L1 (Eby *et al.*, 2010). Outras proteínas envolvidas direta ou indiretamente na autofagia, tais como AMPK e MAPK, também são ativadas e contribuem na ativação do mecanismo em resposta ao estresse genotóxico. Muitas destas vias convergem para a proteína mTOR, inibindo-a e levando à ativação da autofagia celular (Filippi-Chiela *et al.*, 2013c).

O controle da autofagia pela proteína p53 é complexo e não apenas ligado à resposta a dano ao DNA (Maiuri *et al.*, 2010). Em células com a proteína p53 normal a autofagia é disparada pelos alvos de p53 DRAM e ISG20L1, concomitante à inibição de mTORC1 (Feng *et al.*, 2005; Crighton *et al.*, 2006). A proteína p53 selvagem também ativa autofagia por outros mecanismos ainda incertos e que parecem não envolver o papel de fator de transcrição desta proteína (Maiuri *et al.*, 2010). Por outro lado, a proteína p53 mutada e incapaz de translocar para o núcleo acumula-se no citoplasma e, nesse caso, exerce um papel inibitório dominante sobre a autofagia (Tasdemir *et al.*, 2008). É importante destacar que, em células mutadas para p53 a proteína p73, outro membro da família de proteínas p53, medeia a sinalização que conecta o dano ao DNA ao disparo da autofagia (Crighton *et al.*, 2007). Esta manutenção da autofagia por um mecanismo compensatório reforça a importância da autofagia para a sobrevivência celular em presença de dano genômico, principalmente considerando que a maioria das outras funções exercidas por p53 não é realizada por p73.



**Figura 5 – Mecanismos moleculares que conectam o dano ao DNA à autofagia.** Múltiplos mecanismos moleculares conectam dano ao DNA à autofagia. A partir do dano é ativada a Resposta de Dano ao DNA (DDR), através de sinalização por quebra simples de DNA (SSB - *Single Strand Break*) ou quebras duplas de DNA (DSB - *Double Strand Break*), além dos mecanismos de reparo como o mal pareamento (MMR - *Mismatch Repair*). Estas vias convergem, através de intermediários, principalmente para as proteínas p53 e mTOR. Porém, mecanismos independentes destas proteínas também são descritos. Estes mecanismos serão discutidos com detalhes no Capítulo II. Obtido de *Autophagy and Genome Integrity* (Filippi-Chiela *et al.*, 2013b)

### 1.3 Autofagia e câncer

Alterações do processo autofágico estão descritas em inúmeros quadros patológicos humanos, incluindo doenças neurodegenerativas, autoimunes, cardiovasculares e câncer, como recentemente revisado (Jiang & Mizushima, 2014). De fato, genes autofágicos estão alterados em diversos tipos tumorais, tais como melanoma, câncer de mama, próstata, leucemias e gliomas (Wu *et al.*, 2012). A sessão a seguir descreverá o papel da autofagia durante o processo carcinogênico bem como na resposta a terapias antitumorais.

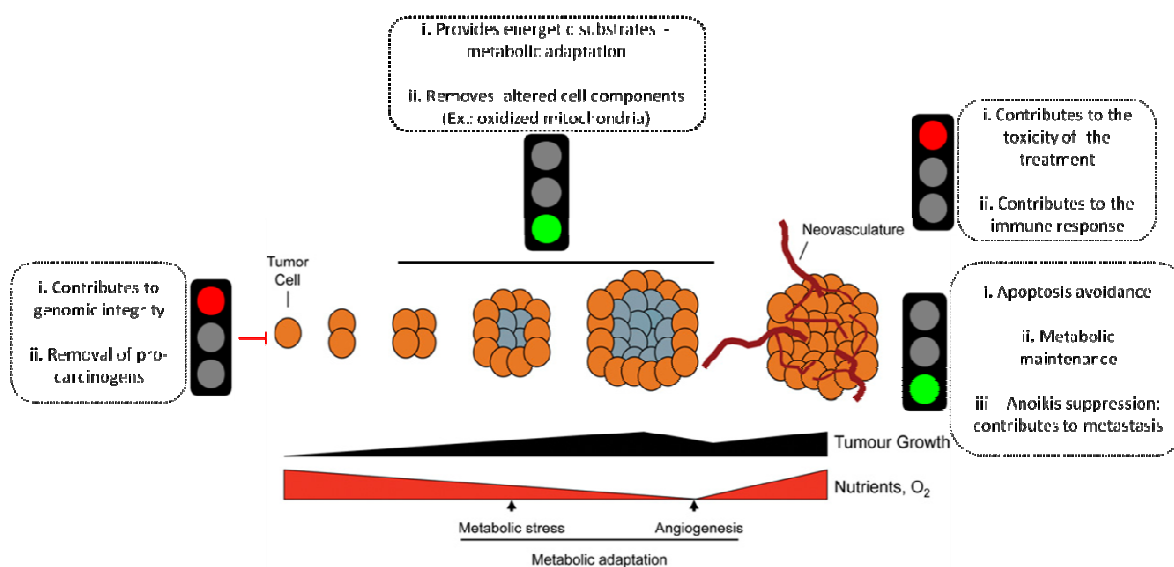
O papel da autofagia durante o processo de formação dos cânceres é complexo e variável, dependendo da etapa da carcinogênese em questão (**Figura 6**). Durante a iniciação, a qual invariavelmente envolve uma ou mais mutações que favorecem a proliferação celular e/ou suprimem a morte celular, autofagia contribui para manutenção da estabilidade genômica, dessa forma reduzindo a incidência de transformações genéticas potencialmente tumorais (Mathew *et al.*, 2007). O papel quimiopreventivo da autofagia é corroborado pela observação de que animais heterozigotos mutados para o gene autofágico beclina-1 apresentam maior incidência tumoral (Qu *et al.*, 2003), enquanto a perda de um alelo de beclina-1 é observada em mais de 50% dos cânceres humanos de próstata, mama e ovário (Aita *et al.*, 1999). Entre os animais  $bec^{+/+}$  apenas 14% desenvolveram tumores espontaneamente em 2 anos, enquanto 59% dos animais  $bec^{+/-}$  desenvolveram tumores, do tipo linfomas, carcinomas e adenocarcinomas (Yue *et al.*, 2003). Da mesma forma, animais deletados para Atg4 são mais suscetíveis a fibrosarcomas induzidos quimicamente (Marino *et al.*, 2007), enquanto a deleção de Atg5 ou Atg7 no fígado resulta em aumento da incidência de adenomas hepatocelulares (Inami *et al.*, 2011; Takamura *et al.*, 2011). Autofagia também contribui para evitar tumorigênese através da eliminação de p62. O acúmulo desta proteína em células deficientes para autofagia leva ao aumento de ROS e alterações em vias importantes no controle da proliferação celular, como a via do NF- $\kappa$ B, consequentemente contribuindo para a tumorigênese. Este mecanismo poderia explicar a tumorigênese aumentada em animais deficientes em autofagia (Mathew *et al.*, 2009). Além disso, autofagia parece contribuir para o reparo de lesões de DNA. Uma vez ocorrendo o dano ao DNA, a DDR sinaliza para ativação da autofagia através de múltiplas vias de sinalização, como descrito brevemente acima. Neste sentido, a autofagia disparada por dano ao DNA desempenha um papel duplo e variável, ou auxiliando na sobrevivência celular ou como parte da toxicidade do tratamento genotóxico, como recentemente revisado por nós (Filippi-Chiela, 2013b - referente ao artigo de revisão que compõe o Capítulo II da presente tese).

Por outro lado, a transformação maligna de células epiteliais intestinais por superexpressão do oncogene Ras requer a supressão do gene autofágico beclina-1 (Yoo *et al.*). De fato, a autofagia induzida em modelo de carcinogênese oncogênica contribui para suprimir a proliferação celular *in vitro* e tumorigênese *in vivo* durante as primeiras 48h de superexpressão do oncogene, demonstrando o papel quimiopreventivo do mecanismo autofágico. Entretanto, a partir de 48h da superexpressão, autofagia passa a proteger as células e contribuir para a sobrevivência das mesmas. Neste ponto, as células já estão com fenótipo proliferativo e os tumores *in vivo* em processo de promoção (Wu *et al.*, 2011).

De fato, durante a etapa de promoção de tumores sólidos usualmente ocorre um período de estresse durante o qual o crescimento da massa tumoral não é acompanhado por

um aumento suficiente do aporte de vasos sanguíneos, tornando o ambiente tumoral pobre em nutrientes e oxigênio. Durante este período crítico, autofagia parece exercer um papel fundamental na adaptação das células tumorais à situação de estresse ambiental, provendo substratos energéticos que são utilizados para manutenção de níveis basais de ATP. A inibição da autofagia nesse momento contribui para a eliminação das células tumorais. O exemplo mais claro deste mecanismo ocorre na formação de tumores por superexpressão oncogênica, onde autofagia é fundamental pra manter o metabolismo oxidativo e a tumorigênese. A superexpressão do oncogene Ras<sup>V12</sup> ativa autofagia, a qual é fundamental para a sobrevivência celular e, conseqüentemente, para a tumorigênese a partir destas células. Este papel se dá principalmente pela degradação por autofagia de mitocôndrias injuriadas pela alta produção de ROS produzida por células que superexpressam Ras<sup>V12</sup>. Dessa forma, a autofagia contribui para manutenção de um pool funcional de mitocôndrias, o qual é fundamental para suportar, energeticamente, a formação do tumor (Guo *et al.*, 2011).

Finalmente, durante a progressão tumoral a autofagia exerce um papel que depende do contexto da indução, podendo ou contribuir para a sobrevivência celular ou exercendo papel citotóxico (Wu *et al.*, 2012). Entre os mecanismos pelos quais a autofagia atua como supressora tumoral estão: **(i)** a contribuição no controle da instabilidade genômica que contribui para o aumento da malignidade tumoral; **(ii)** a contribuição direta ou indireta na toxicidade de alguns quimioterápicos; e **(iii)** modulando a resposta imune e inflamatória. Por outro lado, autofagia favorece a manutenção tumoral através de: **(i)** favorecimento à adaptação e sobrevivência de células tumorais a condições de baixa disponibilidade de oxigênio e nutrientes através provimento de substratos estruturais e energéticos e manutenção do metabolismo celular basal; **(ii)** controle de qualidade de componentes celulares e supressão da morte celular apoptótica por eliminação de sinais pró-apoptóticos intracelulares (Chen & Debnath, 2010; Zhou *et al.*, 2012). Além disso, autofagia também favorece a sobrevivência celular em situações de despreendimento das células tumorais do estroma tumoral, evitando *anoikis* e permitindo o estabelecimento de metástases (Debnath, 2008; Fung *et al.*, 2008).



**Figura 6 – Papel da autofagia durante as diferentes etapas da carcinogênese.** Os sinais vermelhos e verdes indicam, respectivamente, etapas da carcinogênese onde a autofagia exerce papel supressor tumoral ou oncogênico. Autofagia contribui para a integridade genômica e remoção de pró-carcinógenos, assim evitando a iniciação tumoral. Durante o estresse metabólico da promoção tumoral, a autofagia é fundamental para a adaptação metabólica e remoção de componentes alterados, como organelas, membranas e proteínas oxidadas pelo aumento de ROS. Após o estabelecimento tumoral, na fase de progressão, autofagia segue sendo importante

(continuação legenda Fig. 6)

na manutenção do metabolismo, porém, pode ser modulada através de terapias no sentido de levar as células tumorais à morte celular. Neste ponto, autofagia exerce um papel dual, podendo tanto proteger as células de um determinado tratamento quanto ser parte do mecanismo de toxicidade do mesmo. Além disso, autofagia contribui para evitar *anoikis*, facilitando o estabelecimento de metástases.

Além do papel da autofagia nestas 3 fases distintas da carcinogênese, é importante destacar que autofagia interfere com a biologia de células iniciadoras tumorais de glioblastomas, as quais apresentam características típicas de células tronco (Vessoni *et al.*, 2012; Filippi-Chiela *et al.*, 2013b). Às células tronco tumorais tem sido atribuídas funções desde a participação na origem destes tumores (Singh *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2004), até o provimento de fatores antiapoptóticos e antiinflamatórios (Todaro *et al.*, 2007; Kruyt & Schuringa, 2010), bem como de novas células tumorais e endoteliais para o ambiente tumoral (Oswald *et al.*, 2004; Vescovi *et al.*, 2006). A autofagia parece contribuir de forma significativa para a manutenção do estado tronco destas células (Pan *et al.*; Vessoni *et al.*, 2012), e a inibição da autofagia suprime marcadores de células-tronco em cultura de células U87 tratadas com Resveratrol (Filippi-Chiela *et al.*, 2011). Além disso, a autofagia exerce papel importante na sobrevivência destas células em condições de hipóxia e privação de nutrientes, características típicas de tumores sólidos (Song *et al.*, 2013). Porém, enquanto alguns trabalhos mostram que células com características tronco apresentam melhor capacidade de reparo e resistência a terapias (Fu *et al.*, 2009; Lomonaco *et al.*, 2009), outros trabalhos apontam que células tronco são preferencialmente eliminadas por quimioterápicos como a Temozolomida em gliomas (Beier *et al.*, 2008; Zhuang *et al.*, 2011). De qualquer forma, afetar o funcionamento das mesmas tem sido alvo de inúmeros estudos pensando em novas abordagens terapêuticas contra glioblastomas (Clarke *et al.*, 2006).

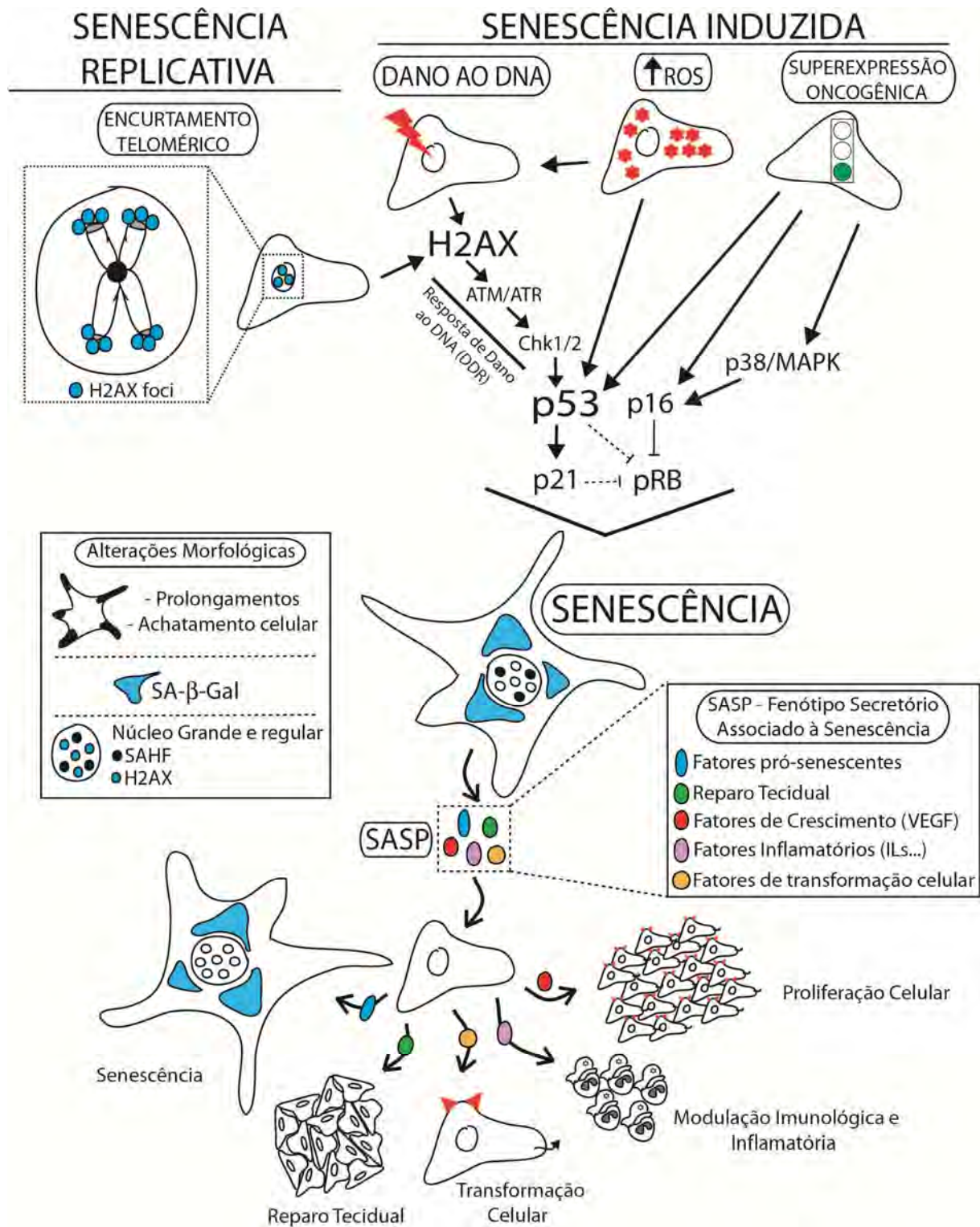
Com relação ao papel da autofagia no prognóstico em câncer, na maioria dos casos pacientes com tumores apresentando alta expressão do gene autofágico beclina-1 tem sobrevida maior quando comparados à pacientes com tumores apresentando baixos níveis de expressão (Pirtoli *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2013). Porém, apesar de dados escassos, para o gene Atg5 a resposta parece ser oposta, e esta variação deve-se provavelmente ao tipo de desenvolvimento e microambiente de cada tipo tumoral ou às funções não autofágicas do gene (Cho *et al.*, 2012; Subramani & Malhotra, 2013; Tang *et al.*, 2013). Atualmente, inúmeros testes clínicos utilizando terapias moduladoras de autofagia estão em andamento. A principal estratégia utilizada nestes estudos se baseia na utilização de um agente indutor de autofagia (normalmente através de dano ao DNA) combinado a um agente bloqueador da etapa tardia da autofagia (na fusão do autofagossomos com o autolisossomo). Neste contexto, ocorre a formação de autofagossomos, os quais se acumulam na célula, gerando um contexto oxidativo exacerbado e reduzindo componentes celulares sem a geração dos produtos benéficos que seriam gerados pela autofagia consumada. (Sui *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a inibição da autofagia em tumores sólidos já formados pode acabar afetando outros mecanismos de proliferação e morte celular que são modulados pelo processo autofágico, tais como apoptose, ciclo celular e senescência. A interação entre autofagia e estes mecanismos citados acima será descrita na **Seção 3**.

## 2. SENESCÊNCIA

### 2.1 Conceitos básicos

Senescência celular é o processo de parada irreversível na proliferação que ocorre em células expostas a situações de estresse, seja ele disparado por sinais endógenos ou induzido exogenamente (Kuilman *et al.*, 2010). A senescência celular tem papel importante no envelhecimento celular e perda de função tecidual nos organismos eucariotos ao longo da vida. Além disso, a indução de senescência após um estresse celular evita a proliferação de células potencialmente tumorais, o que torna este mecanismo um dos principais supressores tumorais endógenos (Michaloglou *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2012). Por outro lado, mesmo não proliferativas, as células senescentes seguem metabolicamente ativas e liberando inúmeras moléculas de sinalização parácrina e autócrina, o chamado Fenótipo Secretório Associado à Senescência (SASP - *Senescence-Associated Secretory Phenotype*). As moléculas liberadas pelas células senescentes vêm sendo descritas nos últimos anos e incluem desde interleucinas moduladoras imunológicas e inflamatórias até fatores de crescimento e fatores que induzem a transformação de células vizinhas normais (Coppe *et al.*, 2010). Além disso, através do SASP as células senescentes podem induzir senescência nas células vizinhas por mecanismo parácrino (Hoare & Narita, 2013).

O processo de proliferação limitada de células humanas diploides em cultura foi descrito há mais de 40 anos, por Hayflick e Moorhead (Hayflick & Moorhead, 1961). De lá para cá, cada vez mais tem se demonstrado que o mecanismo de senescência está envolvido em processos biológicos complexos, tanto fisiológicos (como envelhecimento e reparo tecidual), quanto em contextos patológicos, como em neurodegeneração, doenças cardiovasculares e câncer (Burton, 2009). De fato, a presença de células senescentes marcadas positivamente para marcadores de senescência já foi demonstrada em mamíferos *in vivo* em células da pele ou da retina, bem como em quadros patológicos como em hepatócitos de fígado cirrótico e células endoteliais em contexto aterosclerótico e diabético (Erusalimsky & Kurz, 2005). A **Figura 7** resume os principais conceitos do processo senescente: tipos, mecanismos moleculares, alterações morfológicas e as principais consequências da senescência no organismo. As seções a seguir descrevem os principais pontos destes aspectos.



**Figura 7 – Caracterização geral da senescência.** Tipos, mecanismos moleculares, alterações morfológicas e consequências da indução de senescência no organismo. Senescência pode ocorrer pelo envelhecimento celular fisiológico (senescência por estresse replicativa) ou pode ser induzida através da exposição das células a diferentes estressores (dano ao DNA, ROS ou superexpressão oncogênica). A partir destes sinais estressores, há a ativação de diferentes vias de sinalização que convergem em proteínas-chave efetoras da parada irreversível na proliferação, tais como p53-p21 e p16-pRb. Células senescentes, as quais apresentam inúmeras alterações morfológicas, passam a secretar inúmeras moléculas sinalizadoras parácrinas. SAHF – *Senescent-associated Heterochromatin Foci*; SA-β-gal – *Senescence-associated-beta-galactosidase*. SASP - *Senescence-Associated Secretory Phenotype*.



## 2.2 Tipos de Senescência

A senescência é induzida por situações de estresse celular, podendo ser ou **(i) replicativa**, a qual é induzida pelo encurtamento telomérico e acúmulo de dano ao DNA que ocorre ao longo do envelhecimento celular; ou **(ii) induzida**, por estressores como superexpressão oncogênica (OIS - *Oncogene-induced Senescence*), dano ao DNA, ROS, entre outros estresses a componentes celulares (Rodier & Campisi, 2011; Vargas *et al.*, 2012).

### a. Senescência Replicativa

As extremidades dos cromossomos eucariotos possuem sequências repetitivas de DNA não codificantes, os telômeros. A presença dos telômeros garante que DNA codificante não seja perdido durante a replicação do DNA, a qual é ineficiente nas extremidades cromossômicas. A manutenção das sequências teloméricas é realizada pela atividade da enzima telomerase, polimerase que possui em sua estrutura uma fita de RNA que serve como molde para a síntese de novos telômeros (Harley *et al.*, 1990; Harley, 1997). A atividade da telomerase é elevada em células germinativas e em células do início do desenvolvimento embrionário, porém, reduz gradualmente ao longo do tempo de vida da célula. Como consequência, ocorre o encurtamento dos telômeros e, quando estes perdem sua função de proteção à extremidade cromossômica, a sinalização para entrada em senescência é ativada (Shay & Wright, 2007). A manutenção elevada da atividade da telomerase, em consequência, evita a senescência celular e confere um perfil imortal às células em cultura (Bodnar *et al.*, 1998). Neste sentido, o mecanismo de senescência contribui para a renovação celular e manutenção da homeostase no organismo multicelular, uma vez que o envelhecimento celular é acompanhado por perda de funcionalidade e danos que se acumulam em componentes importantes da célula, como o DNA (Dimri & Campisi, 1994; Campisi, 1997).

Todas as células eucariotas somáticas apresentam um limite do número de divisões no organismo adulto, o chamado Limite de Hayflick (Hayflick & Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Na década de 60, Hayflick & Moorhead observaram que fibroblastos diplóides em cultura celular dividiam-se de maneira limitada, entre 30 e 40 vezes, após as quais deixavam de proliferar de maneira irreversível. Concomitante à parada irreversível na proliferação, estas células apresentavam 3 alterações importantes, as quais são descritas como os Fatores de Hayflick (Shay & Wright, 2000): (i) encurtamento telomérico com ativação da proteína histona H2A.X, sensor inicial do dano ao DNA; (ii) acúmulo de dano ao DNA com formação de foci intranucleares, formados pela proteína H2A.X; (iii) ativação do(s) promotor(es) de genes que codificam proteínas efetoras da parada irreversível da proliferação celular.

Molecularmente, a sinalização celular que dispara a senescência induzida por encurtamento telomérico envolve a ativação da proteína sensor de dano ao DNA histona H2A.X. A partir desta proteína, são ativadas vias de DDR, especialmente envolvendo o eixo ATM/ATR-Chk1/2-p53. Como consequência, ocorre o aumento dos níveis de p21 e p16, proteínas inibitórias de complexos ciclina-CDK, levando à parada irreversível da proliferação celular. De fato, células em cultura que conseguem superar a senescência replicativa

comumente apresentam redução ou perda de proteínas como p53, 16 e/ou p21 (Noble *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997).

## **b. Senescência Induzida**

Por outro lado, a parada irreversível na proliferação pode ser induzida em células eucariotas não senis de maneira exógena, por meio da exposição a contextos pró-senescente. Entre os indutores exógenos de senescência destacam-se a superexpressão oncogênica, indução de dano ao DNA, aumento de ROS, bem como danos a outros componentes celulares como microtúbulos e mitocôndrias (Rodier & Campisi, 2011; Vargas *et al.*, 2012).

Os mecanismos que dirigem os principais tipos de senescência induzida são semelhantes. Tanto a senescência induzida por dano ao DNA, quanto a induzida por ROS ou superexpressão oncogênica ativam a proteína H2A.X, levando a alterações na cromatina, ativação de DDR, parada do ciclo celular e, subsequentemente, senescência (Di Micco *et al.*, 2006; d'Adda di Fagagna, 2008). A ativação de senescência frente a estes estressores funciona como uma importante barreira à proliferação de células pré-tumorais, uma vez que modelos animais deficientes no processo senescente apresentam maior incidência tumoral quando comparados à animais proficientes em senescência (Campisi, 2001; Christov *et al.*, 2003). Algumas características importantes de cada um dos principais indutores de senescência são descritas a seguir.

*OIS (Oncogene-induced Senescence)*: o mecanismo mais estudado de OIS é através da superexpressão do oncogene Ras<sup>V12</sup>, descrita inicialmente por Serrano e col (Serrano *et al.*, 1997). À primeira vista, parece contraditório que a superexpressão de um gene envolvido em promover a proliferação celular leve à parada irreversível da proliferação celular. O que ocorre é que, apesar de uma sinalização aguda pró-proliferativa após a superexpressão oncogênica, o aumento abrupto e exacerbado da sinalização oncogênica acaba gerando um estresse devido à hiper-replicação, levando à ativação de DDR (Di Micco *et al.*, 2006). Como consequência, ocorre a repressão de vias de proliferação celular (tais como a via da Akt/PI3K) e ativação de vias de resposta à estresse celular e bloqueio da proliferação, tais como a via MAPK (Bardeesy & Sharpless, 2006; Bartkova *et al.*, 2006). Finalmente, as células aumentam a expressão de p53, p21 e p16, reprimindo pRb e levando à senescência (Serrano *et al.*, 1997; Haferkamp *et al.*, 2009). Além da DDR, o aumento de ROS após a ativação oncogênica também tem papel no feedback negativo sobre estas vias de proliferação (Ogrunc *et al.*, 2014). O processo de OIS é um mecanismo antitumoral endógeno fundamental para a supressão da formação tumoral (Braig *et al.*, 2005).

*Dano ao DNA*: A resposta celular ao dano genômico pode envolver o disparo de diferentes mecanismos, como parada no ciclo celular, apoptose, necrose, autofagia, catástrofe mitótica e senescência (Jackson & Bartek, 2009). A lista de agentes indutores de dano ao DNA que levam à senescência celular é longa e envolve múltiplas vias de DDR (Alcorta *et al.*, 1996; Robles & Adami, 1998), entre as quais destaca-se a via ATM-Chk1/2-p53. Esta via é ativada pela proteína histona H2A.X, a qual sinaliza para a formação do complexo MRN (Mre11+Rad51+Nbs1). Como consequência, ocorre a ativação de ATM e Chk1/2, levando à

ativação e estabilização de p53, a qual atua como fator de transcrição de p21, levando ao bloqueio do ciclo celular. O dano ao DNA também pode levar ao aumento de outros inibidores da progressão do ciclo celular, como p16 e p27 (descritos na próxima seção). Dessa forma, células tumorais deficientes em componentes destas vias são resistentes à entrada em senescência (Mathon & Lloyd, 2001). Em contextos nos quais o dano celular é irreparável e intenso, mesmo que seja agudo, as células entram em processo de quiescência, senescência ou morte celular, dependendo da via e da intensidade de sinalização disparada (von Zglinicki *et al.*, 2005; d'Adda di Fagagna, 2008; Lupertz *et al.*, 2010). Finalmente, inúmeros compostos indutores de dano ao DNA, também elevam os níveis de ROS intracelular, de modo que a senescência induzida por estes compostos deve ter um mecanismo cooperativo entre ROS e DDR (Katayama *et al.*, 2007; Koul *et al.*, 2012; Marullo *et al.*, 2013).

*ROS*: A indução de senescência mediada por ROS também tem como mediador, assim como a senescência induzida por dano ao DNA, a proteína p53 (Muller, 2009). Neste sentido, tem sido atribuído um papel de supressão tumoral às espécies reativas devido à indução de senescência (Ramsey *et al.*, 1999). A ativação de p53 pode ocorrer por modulação de outras vias moduladoras da senescência, tais como ativação da proteína sensor de estresse celular p38 MAPK. Como consequência, ocorre ativação de INK4<sup>Arf</sup> (lócus que codifica para diferentes repressores do ciclo celular, explicados abaixo) e p21, levando à senescência (Toussaint *et al.*, 2000; Macip *et al.*, 2002). Além destes efeitos, as espécies reativas podem acabar causando dano ao DNA e, conseqüentemente, DDR, levando à senescência por ambas as vias, como demonstrado após superexpressão do oncogene c-Myc (Vafa *et al.*, 2002).

Na verdade, como exemplificado por este último mecanismo que descreve OIS induzida por c-Myc, os três principais mecanismos de indução de senescência estão intimamente conectados e compartilham efetores moleculares semelhantes. Inúmeros compostos indutores de dano ao DNA, assim como a ativação oncogênica, induzem também ROS. Em todos os casos, ambos os sinais (DDR e ROS) devem contribuir para a parada irreversível na proliferação celular. Neste sentido, molecularmente a maioria dos sinais indutores de senescência, seja estresse replicativo, dano ao DNA, ROS ou ativação oncogênica podem partir de iniciadores de resposta comuns, como a histona H2A.X, e convergir para a proteína p53, um dos mais importantes reguladores da sobrevivência celular em resposta a estresses celulares. P53 atua, entre outras funções, como fator de transcrição de p21, um dos principais efetores da senescência celular, e pode ainda levar a um ciclo de retroalimentação positiva de produção de ROS que converge para a indução de senescência (Itahana *et al.*, 2001). Finalmente, o estresse replicativo também parece ser uma característica típica de OIS, já que as células são estimuladas fortemente a proliferarem em função da sinalização oncogênica exacerbada (Bartkova *et al.*, 2006) e muitos estudos sugerem que OIS é uma resposta de dano ao DNA disparada por hiper-replicação (Di Micco *et al.*, 2006).

### **2.3 Mecanismos moleculares em senescência**

Como descrito parcialmente acima, os principais mecanismos moleculares que dirigem a senescência tanto replicativa quanto induzida envolvem proteínas mediadoras e proteínas

efetoras. As moléculas mediadoras são responsáveis pelo carregamento do sinal desde a origem do estresse celular até as proteínas efetoras na parada da proliferação. Entre as proteínas mediadoras destacam-se a ativação de vias de DDR envolvendo, principalmente, a proteína p53, e a modulação das vias de proliferação e morte celular, como a via da PI3K/Akt (Lorenzini *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2003) e a via da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), especialmente envolvendo a proteína p38 MAPK (Iwasa *et al.*, 2003). Estas proteínas sinalizam para as proteínas efetoras da parada na proliferação, que correspondem a inibidores da progressão do ciclo celular e estão dispostas em duas famílias gênicas – Família Cdkn2A (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) e Família Cdkn1 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*). A Família Cdkn2A é codificada pelo locus gênico INK4<sup>Arf</sup>, o qual compreende os genes Cdkn2a e Cdkn2b. Estes genes codificam as proteínas supressoras tumorais p16(Ink4a) e p15(Ink4b) as quais se ligam à proteínas CDKs e, assim, impedem a atividade dos complexo ciclina-CDK e a progressão do ciclo celular (Collins & Sedivy, 2003; Sharpless, 2005). A família Cdkn1, por sua vez, também chamada de CIP/KIP (*CDK Interacting Protein / Kinase-Inhibitory Proteins*), inclui os supressores tumorais p21, p27 e p57. Estas proteínas ligam-se tanto à ciclina quanto à CDK dos complexos formados, reprimindo a atividade dos mesmos (Cheng *et al.*, 1999; Nagahama *et al.*, 2001).

Como alvo final comum, muitas destas proteínas modulam indiretamente a função da proteína do Retinoblastoma (Rb), incluindo p53, p27 e p16, o que leva à ativação do ponto de checagem e parada no ciclo celular (Lukas *et al.*, 1995; Flatt *et al.*, 2000; Alexander & Hinds, 2001). A proteína Rb é, se não a principal, uma das principais controladoras da passagem pelos pontos de checagem do ciclo celular, uma vez que sua principal função é se ligar e inibir os fatores de transcrição E2F, os quais são fundamentais à transcrição de genes essenciais para replicação e, conseqüentemente, proliferação. Quando hipofosforilada, pRb se mantém ligada a E2F, reprimindo-o. As proteínas CDKs ativas (no contexto do complexo com as ciclinas correspondentes) são as quinases que fosforilam sequencialmente sítios de pRb e liberam E2F, permitindo o prosseguimento do ciclo celular (Weinberg, 1995; Talluri *et al.*, 2010). Dessa forma, importantes repressores do ciclo celular e indutores de senescência, como p16 e p21, mantêm pRB hipofosforilada por inibirem os complexos ciclina-CDK. A proteína pRb é um mecanismo de segurança de parada da proliferação celular (Weintraub *et al.*, 1995). Este aspecto é corroborado pela observação de que inúmeros tumores humanos apresentam deleção desta proteína (Nevins, 2001), bem como pelo fato de o silenciamento de pRB aumentar a quantidade de quebras duplas de DNA e sensibilizar células de glioblastoma ao dano ao DNA induzido por etoposídeo, de maneira p53-independente (Biasoli *et al.*, 2013).

## 2.4 O estudo da senescência

O estudo do mecanismo de senescência envolve tanto a análise de alterações fenotípicas quanto moleculares (Lawless *et al.*, 2010). A parada na proliferação celular é observada através de curvas de crescimento, como *Population Doubling*, porém este pode mascarar uma resposta diferencial de supopulações celulares frente a um determinado tratamento e, em função disso, análises adicionais são necessárias. Neste sentido, o número de células por si só é apenas um indicativo da indução de senescência celular, e é fundamental a

análise da morfologia e outros marcadores. As células senescentes apresentam aumento do tamanho *in vitro*, acompanhado do surgimento e extensão de prolongamentos. As células tornam-se mais aderidas ao substrato e sofrem um achatamento típico. As membranas celular e nuclear permanecem intactas e não ocorre fragmentação nuclear ou celular (Lawless *et al.*, 2010).

O núcleo de células senescentes apresentam foci formados pela proteína histona H2A.X, bem como Foci de Heterocromatina Associados à Senescência (SAHF - *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*) *in vitro*. Além disso, as células senescentes apresentam um aumento da área nuclear (Mitsui & Schneider, 1976; Zhang *et al.*, 2005; Funayama & Ishikawa, 2007). O capítulo I da presente discussão descreve uma ferramenta para Análise Morfométrica Nuclear (NMA) que desenvolvemos com o intuito de reduzir a subjetividade de análises de forma e tamanho nuclear, e prover assim um método adicional para a análise nuclear em senescência (Filippi-Chiela *et al.*, 2012).

Metabolicamente, as células senescentes apresentam aumento da atividade da enzima ácida lisossomal beta galactosidase (*Senescence-Associated Beta Galactosidase* - SA- $\beta$ -gal), a qual é detectada através da conversão de um substrato acromático em um produto azul insolúvel, que se acumula dentro das células e pode ser mensurado (Dimri *et al.*, 1995). Além disso, é importante a análise dos níveis de proteínas efetoras da parada irreversível da proliferação, tais como p21, p27 e p16, bem como o estado fosforilativo da proteína Rb (Collado & Serrano, 2006). Na verdade a análise da indução de senescência *in vitro* requer uma análise combinatória de dois ou mais parâmetros entre os citados acima (Lawless *et al.*, 2010). Neste sentido, no Capítulo V da presente tese nós apresentamos um *short take* (em preparação) acerca da cinética de alterações que ocorrem em células induzidas à senescência, correlacionando as alterações que ocorrem ao longo do tempo.

## 2.5 Senescência e câncer

A senescência celular é um dos mais importantes mecanismos endógenos antitumorais, levando inúmeras células pré-tumorais à parada irreversível da proliferação, suprimindo a carcinogênese. Neste sentido, a formação de tumores malignos requer que alguma célula pré-tumoral ou de um tumor benigno ultrapasse a chamada barreira senescente e passe a apresentar potencial proliferativo ilimitado. Este ponto é central à formação de tumores malignos, fato evidenciado pela observação de que células senescentes são prevalentes em tumores pré-malignos, enquanto tumores malignos apresentam poucas células senescentes (Collado & Serrano, 2010). Um exemplo típico deste aspecto é observado em células de nevi (pré-maligno e senescente) em comparação com células de melanomas (maligno e não senescente) (Bennett, 2003). De fato, inúmeros modelos animais deficientes no processo de senescência celular tem uma incidência maior de formação de tumores, enquanto agentes quimiopreventivos induzem senescência como mecanismo que bloqueia o aparecimento de tumores (Bartkova *et al.*, 2006).

A capacidade de evadir a senescência e adquirir potencial replicativo ilimitado é adquirida através de alterações nos principais componentes de ativação da senescência

celular, como por exemplo, aumento da atividade da telomerase ou mutação dos genes efetores da senescência celular, tais como p53, o locus INK4<sup>Arf</sup> ou o gene p21 (Mathon & Lloyd, 2001; Collado & Serrano, 2006). Em alguns tipos tumorais, a superexpressão de telomerase ultrapassa 70% dos tumores avaliados, tais como carcinoma de próstata (90%), neuroblastoma (94%), oligodendroglioma (100%), glioblastoma (75%), carcinoma de mama in situ (75%), carcinoma pancreático (95%) e melanoma (86%) (Mathon & Lloyd, 2001). De fato, a superexpressão de telomerase é um fator prognóstico ruim, e terapias indutoras de senescência celular falham em reduzir estes tipos tumorais (Granger *et al.*, 2002). Neste sentido, abordagens que reativem ou redirecionem as células tumorais para senescência - através da inibição da telomerase ou indução de proteínas efetoras da senescência celular - são promissoras no combate a tumores resistentes a outros mecanismos de morte celular (Harley, 2008; Nardella *et al.*, 2011).

O papel da senescência celular como mecanismo antitumoral endógeno é bastante claro. Porém, nos últimos anos inúmeros trabalhos têm mostrado que células senescentes são, na verdade, um risco para o desenvolvimento de novos tumores bem como para a transformação de células normais em células pré-malignas. Isso porque, como descrito acima, células senescentes se mantêm metabolicamente ativas e, com isso, seguem secretando moléculas para o meio extracelular (Kuilman & Peeper, 2009; Coppe *et al.*, 2010). Entre as moléculas liberadas para o meio extracelular estão fatores que induzem a transformação pré-maligna de células vizinhas (Krtolica *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006), citocinas pró-proliferativas e pró-inflamatórias (Davalos *et al.*, 2010) e fatores de crescimento, entre eles o VEGF (Coppe *et al.*, 2006). Neste sentido, alguns autores consideram células senescentes como células resistentes à terapia antitumoral, uma vez que estas células, mesmo expostas a um estressor, resistiram à morte celular e, além disso, favorecem a proliferação e sobrevivência tumorais (Sasaki *et al.*, 2001; Hampel *et al.*, 2005; Gordon & Nelson, 2012). A remoção de células senescentes se dá por células do sistema imune, dessa forma reduzindo os efeitos pró-tumorais do secretoma senescente (Xue *et al.*, 2007; Serrano, 2011). Apesar de estes mecanismos apresentados serem bem descritos *in vitro* e em alguns modelos animais, muitos deles permanecem pouco conhecidos *in vivo*. Da mesma forma, pouco se sabe a respeito da indução de senescência em tumores de pacientes, e a consequência desta indução no comportamento tumoral.

### 3. CROSSTALK ENTRE AUTOFAGIA, SENESCÊNCIA E MORTE CELULAR

Além do papel na manutenção energética e estrutural celular, autofagia exerce um papel fundamental às células também por modular outros mecanismos de proliferação e morte celular, tais como o ciclo celular, a senescência e a morte celular. Cada vez mais tem sido mostrado que autofagia modula estes mecanismos em condições de estresse celular, contribuindo para a adaptação e sobrevivência celular (seja por hipóxia, privação de nutrientes ou presença de agentes citotóxicos). De fato, mecanismos como os citados acima, somados ao metabolismo celular basal, atuam em constante *crossstalk* em uma célula eucariótica, e alterações do funcionamento de um deles pode acabar afetando outros e, por vezes, a própria sobrevivência celular.

Neste sentido, entender a ligação entre estes mecanismos é fundamental para entender comportamentos celulares fisiológicos e em quadros patológicos. De fato, cada vez mais se tem mostrado que, nestes contextos, um ou mais mecanismos podem estar alterados, e entender a conexão entre eles pode ser importante para o entendimento da patogênese e desenvolvimento de terapias. As seções abaixo descrevem as interações mais importantes para o presente trabalho: **(3.1) Autofagia e Senescência Celular** e **(3.2) Autofagia e Apoptose**.

#### 3.1 Autofagia e Senescência Celular

Autofagia e senescência são dois mecanismos fisiológicos conservados evolutivamente e induzidos por condições de estresse celular. Apesar da importância crescente destes mecanismos em condições fisiológicas e patológicas como envelhecimento, doenças neurodegenerativas e câncer, o papel da autofagia na entrada em senescência é complexo e longe de estar esclarecido (Gewirtz, 2013; Gewirtz, 2014).

Autofagia parece interferir com diferentes mecanismos de indução de senescência, como envelhecimento (Pospelova *et al.*, 2012), ativação oncogênica e dano ao DNA (Young *et al.*, 2009) e superexpressão de p21 (Demidenko *et al.*, 2009). O atual estado da arte aponta para autofagia antecedendo a entrada em senescência e contribuindo para a parada irreversível da proliferação celular na maioria dos modelos (Patschan *et al.*, 2008). Em se tratando de envelhecimento de organismos eucariotos, inúmeros trabalhos sugerem que autofagia exerce papel na determinação do tempo de vida de diferentes organismos. Autofagia é requerida para o aumento do tempo de vida induzido por restrição calórica em *C. elegans* (Jia & Levine, 2007) e *A. thaliana* (Minina *et al.*, 2013). Além disso, murinos superexpressando a proteína Atg5 apresentam um aumento do tempo médio de vida de 17.2%, além de apresentarem maior sensibilidade à insulina e melhora da função motora (Pyo *et al.*, 2013).

Já em modelos de senescência induzida, autofagia regula positivamente a senescência induzida por ROS através do aumento de p21 mediado por Atg5 em fibroblastos humanos (Luo *et al.*, 2011), em uma cinética correlacionada com o *feedback* negativo da via Akt/mTOR (Young *et al.*, 2009). Em células epiteliais biliares, a expressão de LC3 colocaliza com os marcadores de senescência celular p16 e p15, enquanto a inibição da autofagia utilizando 3-metiladenina (3-MA), inibidor do Complexo PI3K, reduziu significativamente a senescência induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposídeo e privação de soro (Sasaki *et al.*, 2010). Em

modelo de senescência induzida por dano ao DNA, células de câncer de mama MCF7 expostas à adriomicina (doxorubicina) e camptotecina dispararam autofagia, seguido de senescência, com uma dependência parcial de p21. Nestas células, antioxidantes (NAC e GSH) e inibidores de ATM (cafeína, KU-55933 e shRNA) reduziram a autofagia e senescência, sugerindo que ROS e DDR cooperam para a indução de senescência. Além disso, shRNA para Atg5 e Atg7, 3MA e cloroquina parcialmente reduziram senescência (Goehe *et al.*, 2012), assim como demonstrado por Luo em um modelo senescência induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fibroblastos normais (Luo *et al.*, 2011).

Considerando o uso de ativadores da autofagia, o inibidor de mTOR Rapamicina (RAPA) reduz a ocorrência de senescência induzida por diferentes mecanismos, como replicação em células embrionárias murinas (Pospelova *et al.*, 2012), dano ao DNA e ROS em células de uma linhagem celular imortalizada de epitélio retinal humano e tratamento com Butirato de Sódio em células de fibrosarcoma humano HT1080. Porém, nestes trabalhos com RAPA não é possível atribuir o efeito em senescência à autofagia. Isto porque mTOR é uma proteína central que modula metabolismo, síntese proteica e inúmeras outras funções celulares incluindo a passagem de quiescência a senescência e reparo de DNA, de modo que não é possível atribuir à autofagia o efeito da RAPA na senescência (Galluzzi *et al.*, 2010; Leontieva & Blagosklonny, 2010; Menendez *et al.*, 2011).

Os resultados dos modelos acima mostram que, de fato, autofagia e senescência podem ser induzidas pelo mesmo tratamento. Porém, considerando a interação entre estes mecanismos, nenhuma interdependência ou conexão direta foi demonstrada até o momento. Esta observação é corroborada pelo fato de o silenciamento de Atgs através de shRNA, por exemplo, embora reduza autofagia a níveis semelhantes aos do controle, reduz muito pouco a porcentagem de senescência nas células silenciadas (Luo *et al.*, 2011; Goehe *et al.*, 2012). Isto sugere que estes mecanismos possam estar sendo induzidos pelo mesmo estressor, sim, mas em paralelo e com cinéticas diferentes como sugerido recentemente (Gewirtz, 2014). Em função deste quadro complexo e da falta de dados completos sobre a interação entre estes mecanismos, um dos objetivos centrais da presente tese será estudar o papel da autofagia na senescência induzida por dano ao DNA, como apresentado no Capítulo III desta tese.

Um dos motivos pelos quais alguns resultados sobre interação entre autofagia e senescência parecem contraditórios e/ou inconclusivos se deve ao fato de a maioria dos trabalhos citados aqui apresentarem uma análise incompleta da resposta a determinado tratamento. Isto porque, para avaliação do papel da autofagia na senescência, estes trabalhos utilizam inibidores farmacológicos ou genéticos de autofagia, seguido da análise de senescência, mas sem levar em conta que a inibição da autofagia pode levar à morte celular e/ou redução do número de células. Porém, a análise completa envolvendo autofagia, morte celular e senescência, somada à avaliação do número de células não foi feita em nenhum trabalho (Gewirtz, 2014). O Capítulo IV corresponde a um comentário, a ser submetido ao periódico *Autophagy*, sobre este aspecto da importância do planejamento de experimentos que incluam a inibição da autofagia e a observação em paralelo de diferentes mecanismos celulares.



### 3.2. Autofagia e apoptose

Se, por um lado, a ligação entre autofagia e senescência é pouco conhecida, a interação entre os mecanismos de autofagia e apoptose já foi bastante estudada. Atualmente, a relação entre estes mecanismos é bastante clara: a grande maioria dos estudos aponta para autofagia como parte do processo de adaptação e sobrevivência celular que evita ou retarda a morte celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Marino *et al.*, 2014).

Autofagia atua protegendo as células da morte celular através de 3 principais mecanismos (Maiuri *et al.*, 2007b): (i) provendo precursores energéticos para suportar requerimentos energéticos em condições de estresse; (ii) eliminando sinais intracelulares pró-apoptóticos, como por exemplo através da eliminação de mitocôndrias danificadas; e (iii) contribuindo para o *turnover* de componentes celulares. De fato, a inibição da autofagia em contexto de privação de nutrientes ou tratamentos citotóxicos, tanto na etapa de formação de autofagossomos (com 3-MA) quanto na etapa de formação dos autolisossomos (com bafilomicina ou cloroquina), dispara apoptose em diferentes tipos celulares (Boya *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013).

Molecularmente, cada vez mais tem sido demonstrado que vias de sinalização similares exercem alguma função tanto na autofagia quanto na apoptose, conectando estes mecanismos. A sobreposição molecular mais conhecida refere-se à família de proteínas Bcl2 (revisado por diversos autores) (Patingre & Levine, 2006; Kang *et al.*, 2011b; Marquez & Xu, 2012). As proteínas Bcl2, em sua grande maioria associadas à membrana mitocondrial, são as principais controladoras do mecanismo apoptótico, dividindo-se em membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos, os quais interagem fisicamente por meio de domínios chamados BH3 (*Bcl-2 Homologous Domain*). O balanço entre estes dois tipos de proteínas Bcl2 é fundamental no controle da permeabilidade da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, do processo apoptótico (Martinou & Youle, 2011). Em 2005 Patingre e col descreveram a primeira interação molecular entre os mecanismos de autofagia e apoptose envolvendo a proteína antiapoptótica Bcl2. A proteína Bcl2 interage com a proteína beclina-1 (Atg6), a qual também possui um domínio BH3, 'sequestrando-a' e inibindo sua atividade na autofagia. Posteriormente, mecanismo semelhante foi descrito para outra proteína antiapoptótica da família Bcl2, a proteína Bcl-x<sub>L</sub>. Dessa forma, estas proteínas antiapoptóticas também atuam inibindo a autofagia. O tratamento com BH3-miméticos, que se ligam às proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, libera beclina-1 dos complexos com estas proteínas antiapoptóticas. A proteína beclina-1 "livre" forma o Complexo PI3K e há o disparo de autofagia nas células (Maiuri *et al.*, 2007a). Por outro lado, as proteínas Bcl2 não perdem sua função antiapoptótica mesmo quando complexadas à beclina-1, sugerindo que esta interação tenha evoluído propriamente para o controle do disparo da autofagia. Além disso, Wirawan e col mostraram, em um modelo celular onde o processo autofágico precede o disparo da apoptose, que a clivagem das proteínas beclina-1 e PI3K-classe III por caspases inativa a autofagia e dispara apoptose, através de um mecanismo de translocação subcelular do fragmento C-terminal de beclina-1 à mitocôndria (via seu domínio BH3) e liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais. Assim, é gerado um sistema de retroalimentação positiva de apoptose a partir da clivagem de beclina-1 (Wirawan, 2010).

Posteriormente, outros mecanismos moleculares foram descritos. A superexpressão de Atg5 em eosinófilos e basófilos sensibiliza à morte celular induzida por agentes citotóxicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Yousefi *et al.*, 2006). Porém, neste caso a proteína Atg5 participa da apoptose nestas células. A proteína Atg5 é clivada pela enzima calpaína e a forma clivada se desloca para a mitocôndria, onde se associa como antiapoptótico Bcl-x<sub>L</sub>, liberando o pró-apoptótico Bax, formando poros na membrana mitocondrial e levando à liberação de citocromo c e ativação de caspases com consequente apoptose (Yousefi *et al.*, 2006). Além disso, como Bcl-x<sub>L</sub> interage com beclina-1 na mitocôndria, esta interação de Atg5 clivado com Bcl-x<sub>L</sub> poderia acabar induzindo ainda mais autofagia por liberar competitivamente beclina-1.

Finalmente, um terceiro mecanismo na interação entre autofagia e apoptose envolve a proteína caspase-8, a qual é a principal mediadora da apoptose induzida pela via exógena (de receptores de morte celular). Em células resistentes à morte apoptótica induzida por TRAIL (*TNF-related Apoptosis Inducer Ligand*), autofagia induzida pelo tratamento levou à degradação de caspase 8 (Hou *et al.*, 2010), explicando ao menos parcialmente o efeito citoprotetor da autofagia no contexto do tratamento com TRAIL (Han *et al.*, 2008). Efeito semelhante foi observado em células de glioma tratadas com ROS, nas quais autofagia também media a degradação de caspase-8 e protege as células da morte celular (Zhang *et al.*, 2013). Mas, mais do que isso, esta interação parece bidirecional, uma vez que caspase-8 ativada pela via extrínseca (TNF-alfa) pode clivar diretamente Atg3, suprimindo a autofagia. Neste sentido, a expressão endógena de Atg3 mutada para o não reconhecimento por caspase 3 reestabeleceu os níveis de autofagia celular, reduzindo a sensibilidade ao TNF-alfa (Oral *et al.*, 2012).

O processo de disparo de apoptose após inibição da autofagia foi demonstrado *in vivo* em um modelo de linfoma resistente à apoptose induzido por superexpressão do oncogene c-Myc. Inibição de Atg5 e, conseqüentemente, da autofagia nas células tumorais sensibilizou as células à morte induzida por agentes alquilantes de DNA. Neste sentido, assim como na maioria dos modelos *in vitro* no modelo tumoral *in vivo* a autofagia induzida pelas intervenções citotóxicas também atua como um mecanismo citoprotetor (Amaravadi *et al.*, 2007).

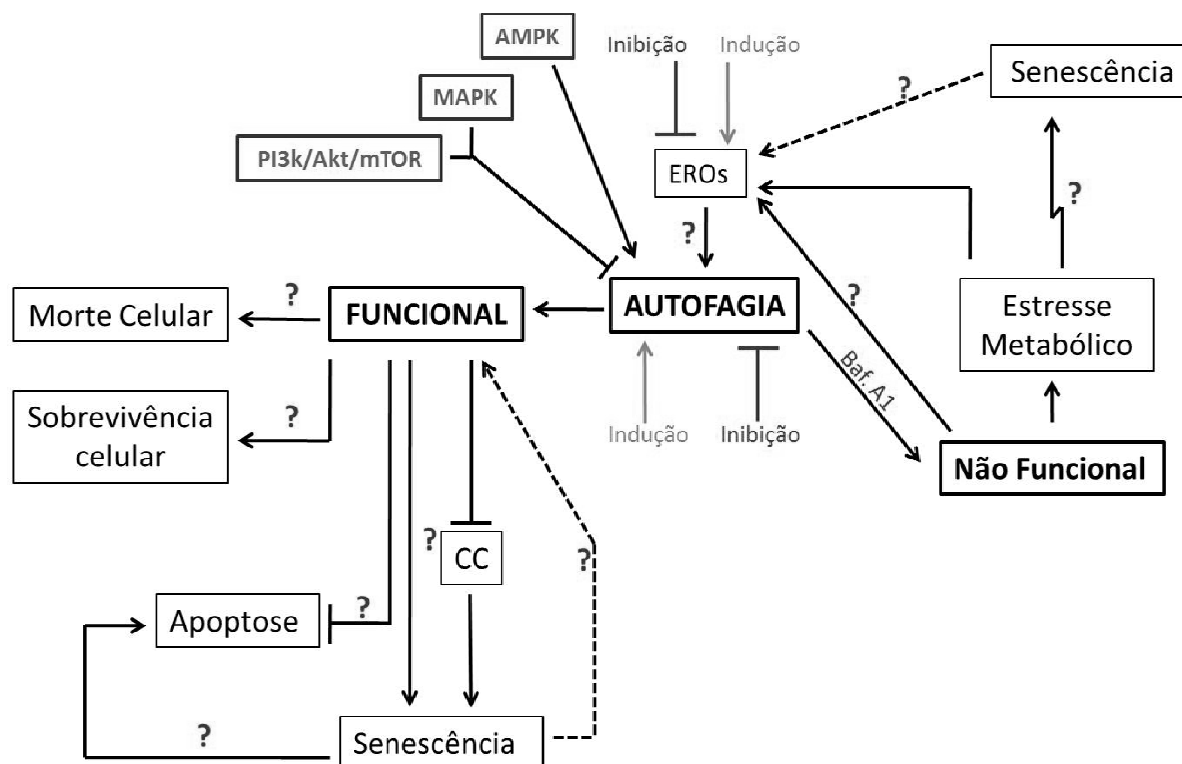
## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

**Investigar** o papel da autofagia na senescência celular induzidas por dano ao DNA.

### Objetivos Específicos

- i. Desenvolver uma metodologia de análise de morfometria nuclear (NMA) para complementar a análise da senescência celular bem como para avaliar alterações nucleares típicas de apoptose e catástrofe mitótica
- ii. Avaliar a cinética de autofagia e senescência.
- iii. Investigar os mecanismos moleculares mediadores na senescência e autofagia
- iv. Avaliar a cinética de indução e correlação de autofagia e senescência através do acompanhamento de células únicas.
- v. Avaliar as consequências da modulação da autofagia na senescência e morte celular.



**Figura 8 - Representação esquemática dos objetivos específicos ii - v da presente tese.** O objetivo geral 2 visa avaliar o papel da autofagia no desfecho induzido por dano ao DNA, focando na interação de autofagia com senescência e morte celular. Ainda como parte central deste objetivo, esperamos descrever os mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta, bem como o papel de ROS e o estado energético celular ao longo da resposta ao tratamento. Além disso, para responder as principais perguntas do nosso objetivo (assinaladas pelos pontos de interrogação), autofagia será inibida ou ativada.

## CAPÍTULO I

### *Nuclear Morphometric Analysis: Screening Of Senescence, Apoptosis And Nuclear Irregularities*

#### APRESENTAÇÃO

Durante o mestrado em biologia celular e molecular, investiguei o papel do composto natural Resveratrol (Rsv), polifenol presente em inúmeras plantas e que apresenta inúmeras propriedades em saúde humana, em células de glioma. Além disso, avaliei o efeito da combinação de Rsv com o quimioterápico de escolha para gliomas, Temozolomida (TMZ) (Filippi-Chiela et al, 2013a).

Ao longo do desenvolvimento do trabalho, a indução de diferentes mecanismos pelo cotratamento Rsv+TMZ foi testada, tais como autofagia, apoptose, modulação de ciclo celular e senescência. Após uma ampla investigação, observamos que os núcleos de células cotratadas apresentavam irregularidades, projeções, protrusões e aumento de área. Todos estes sinais são típicos do mecanismo de catástrofe mitótica. De fato, a análise da sinalização celular disparada pelo cotratamento mostrou um conflito entre sinalização de presença de dano ao DNA e parada em fase G2/M do ciclo concomitante à presença de sinais de passagem por este ponto de checagem.

À época, a quantificação de catástrofe mitótica era realizada de maneira subjetiva, através da contagem direta da porcentagem de núcleos que apresentavam irregularidades, através da marcação com uma molécula fluorescente (usualmente DAPI). Neste sentido, observamos a oportunidade de desenvolver um novo método e ferramenta para mensuração da morfometria nuclear de células eucarióticas em cultura. Foi assim que desenvolvemos a Análise Morfométrica Nuclear (NMA - *Nuclear Morphometric Analysis*). O método foi validado para os mecanismos de senescência e apoptose, além da análise de irregularidades nucleares típicas da catástrofe mitótica, e publicado no periódico *PlosOne*. O presente capítulo descreve as etapas de desenvolvimento e validação do NMA. O Anexo I da presente tese corresponde ao Material Suplementar do Capítulo I.

Além disso, nós depositamos uma patente metodológica descrevendo as principais características e potenciais aplicações do NMA, a qual é apresentada no capítulo subsequente (Anexo 2). Em função disso, fomos convidados pelo periódico *Recent Patents on Medical Imaging* para escrever uma revisão acerca das patentes mais recentes descrevendo métodos de observação e análise de células eucarióticas, o qual foi publicado sob o título de *Recent Patents on Morphometric Analysis of Eukaryotic Cells* (Filippi-Chiela et al, 2013c).

# Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities

Eduardo C. Filippi-Chiela<sup>1</sup>, Manuel M. Oliveira<sup>3</sup>, Bruno Jurkovski<sup>3</sup>, Sidia Maria Callegari-Jacques<sup>4</sup>, Vinicius Duval da Silva<sup>5</sup>, Guido Lenz<sup>1,2\*</sup>

**1** Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Institute of Informatics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **4** Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Statistics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **5** Sao Lucas Hospital – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

## Abstract

Several cellular mechanisms affect nuclear morphology which can therefore be used to assess certain processes. Here, we present an analytic tool to quantify the number of cells in a population that present characteristics of senescence, apoptosis or nuclear irregularities through nuclear morphometric analysis. The tool presented here is based on nuclear image analysis and evaluation of size and regularity of adhered cells in culture. From 46 measurements of nuclear morphometry, principal component analysis filtered four measurements that best separated regular from irregular nuclei. These measurements, namely aspect, area box, radius ratio and roundness were combined into a single nuclear irregularity index (NII). Normal nuclei are used to set the parameters for a given cell type, and different nuclear phenotypes are separated in an area versus NII plot. The tool was validated with  $\beta$ -gal staining for senescence and annexin or caspases inhibitor for apoptosis as well as several treatments that induce different cellular phenotypes. This method provides a direct and objective way of screening normal, senescent, apoptotic and nuclear irregularities which may occur during failed mitosis or mitotic catastrophe, which may be very useful in basic and clinical research.

**Citation:** Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, Silva VDD, et al. (2012) Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. PLoS ONE 7(8): e42522. doi:10.1371/journal.pone.0042522

**Editor:** Irina V. Lebedeva, Enzo Life Sciences, Inc., United States of America

**Received:** December 22, 2011; **Accepted:** July 10, 2012; **Published:** August 8, 2012

**Copyright:** © 2012 Filippi-Chiela et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), grant numbers 476491/2008-8 and 472512/2011-0, Pronex-Fapergs/CNPq n°: 10/0044-3 and Pronem/FAPERGS 11/2072-2. ECFC, MMO, BJ, VDS and GL are recipients of CNPq fellowships. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lenz@ufrgs.br

## Introduction

The nucleus corresponds to approximately 10% of the cellular volume and, due to its nuclear envelope, presents a round shape and a well-defined and regular surface under normal conditions *in vitro*. Alteration in nuclear morphology occurs in physiologic situations, like during mitosis, and in several processes associated to cell death. These modifications include nuclear condensation and fragmentation observed in apoptosis, increase in nuclear size observed in senescence, and increase in nuclear irregularity observed in several conditions, such as chemical or physical stresses, defective activation or inactivation of cell cycle checkpoint signaling processes, or exogenous agents that affect microtubule dynamics or chromatin remodeling [1,2].

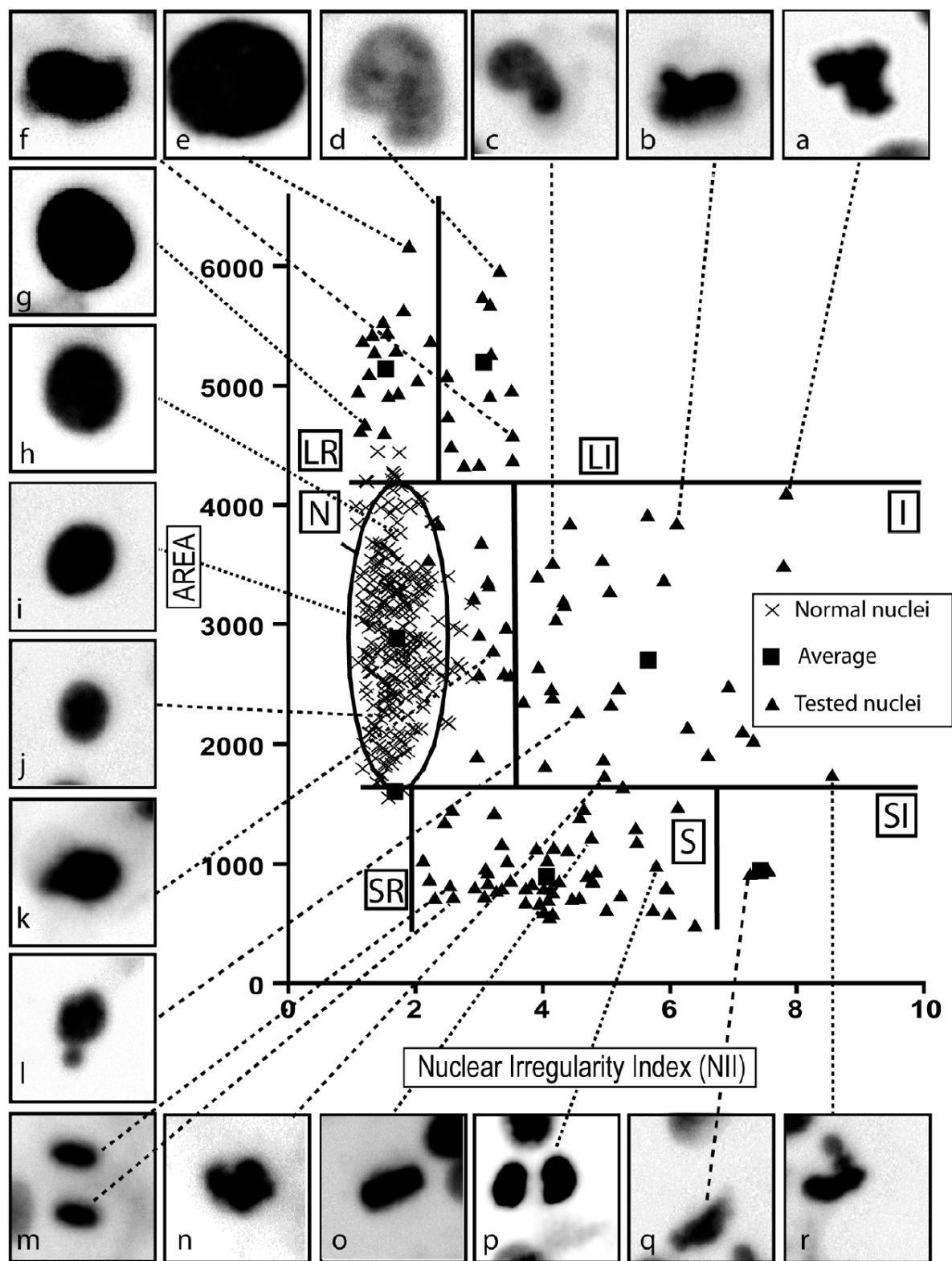
Analysis of nuclear irregularities, such as mitotic catastrophe (MC), is limited almost exclusively to visualization of nuclei stained with DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole), followed by subjective counting of nuclei with signs of MC. Recently, a tool was proposed for the detection of MC based on videomicroscopy of cells expressing markers of chromatin and centrosomes [3]. However, this tool requires specific equipment and is rather difficult to set up and analyze.

Both replicative senescence and oncogene-induced senescence are important anti-cancer mechanisms and reactivation of senescence by therapy may represent a good anticancer strategy

[4,5]. Senescence is analyzed by the level of  $\beta$ -galactosidase activity measured at pH 6.0 (known as senescent-associated  $\beta$ -galactosidase – SABG) [6], the formation of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and the increase in the expression of proteins associated with senescence induction such as p21, p27, INK4A and Arf [7]. Senescence in culture cells produces a drastic increase in cellular and nuclear size, therefore a measure of nuclear size, associated with the reduction in mitotic cells, maybe a good indicator of the senescent state at a given cell culture population.

Induction of MC by small molecules or specific inhibition of DNA damage-activated signaling may increase cytotoxicity in cancer cells [8,9]. In these cases, co-occurrence of senescence, MC and apoptosis is clinically desirable when compared to the occurrence of only one of these processes [10]. Therefore, a tool to easily evaluate morphological signs of apoptosis, MC and senescence is an important part in anti-cancer therapeutic studies.

Several cellular processes can be inferred by the analysis of nuclear morphometric features and a method without bias that evaluates nuclear phenotypes would widely improve our understanding concerning the dynamics of cell growth and death. Here, we developed an objective tool named Nuclear Morphometric Analysis (NMA) which is able to indicate the proportion of cells in senescence, apoptosis or with nuclear



**Figure 1. Distribution of nuclei in a plot of area versus NII.** N: Normal nuclei (crosses represent nuclei used to establish the reference population and the ellipse that represents the conjoint distribution for area and NII for normal nuclei); I: irregular, LR: Large Regular; LI: Large Irregular; SR: Small and Regular; S: Small; SI: Small and Irregular. Squares denote the averages of the different populations. Pictures (a–r) show examples of nuclei and their localization in the graph.  
doi:10.1371/journal.pone.0042522.g001

irregularities in a cell population *in vitro* based on nuclear morphology.

## Results

### 1. NMA Tool Development

In order to develop the tool we used nuclei from the glioblastoma cell line U87 treated with temozolomide (TMZ), which causes DNA damage and G<sub>2</sub> cell cycle arrest, in combination with resveratrol, which blocks this arrest. This combination induced cells to undergo mitosis with increased expression of cyclin B1 and decreased pCDC2(Y15) levels, despite wide DNA damage, as indicated by  $\gamma$ H2AX and comet assay (data not shown), thus generating a multitude of nuclear morphology. Nuclei were stained with DAPI and pictures were taken on a fluorescent inverted microscope. Images were analyzed with the Image Pro Plus 6.0 (IPP6) software and 46 parameters of nuclear size, shape and marking were produced for a large population of cells. These parameters were analyzed with principal component analysis (PCA) and the features Aspect (Asp), Area box (Arbx), Radius ratio (Rr) and Roundness (Rou) were combined in an index called Nuclear Irregularity Index ( $NII = Asp - Arbx + Rr + Rou$ ). Details on the development of the tool are given in the **Text S1** file.

In order to permit a wider use of the NMA tool, we developed an Image J plugin (for Image J 1.45 free version) that allows the quantification of the five measurements required for NMA (*i.e.* those for calculation of NII plus area measurement). A detailed explanation of the plugin features and its use is provided in the **Text S2** file. A comparative analysis of data generated with the IPP6 software and the Image J plugin that accompanies the NMA tool showed very similar percentages of nuclei for each population (**Text S1**), validating the plugin developed for the NMA analysis.

Data generated with the IPP6 or Image J software were then analyzed in a spreadsheet (NMA.xls or NMA.ods). Data from normal, untreated cells (in which small, large and irregular nuclei are excluded) are used to set the parameters of the normal

population. The user can define the number of standard deviations (SD) from the mean that will be considered an acceptable deviation. Next, a large set of data from different treatments are used to set the thresholds of the different populations. These settings (number of SD and the thresholds) are used to analyze the nuclei from different treatments. After entering the data from the nuclei in the data analysis sheets, a plot of area versus NII will be automatically produced (**Figure 1**), showing the ellipse representing the normal nuclei and the different populations whose thresholds were set in the “Normal Nuclei and Settings” sheet. Detailed use of the spreadsheets is given in the **Text S2** file. The Image J plugin, Microsoft Excel<sup>®</sup> and Open Office Calc files are available at <http://www.ufirgs.br/labsinal/nma/>.

### 2. Biological Significance of the different Populations in the NMA Plot

Analyzing the data produced with the nuclear population used to set up the tool we noticed a distribution in four separate populations: normal, large, irregular and small (**Text S2**). Analysis of a larger set of conditions, including cells treated with classical inducers of senescence, apoptosis and nuclear irregularities, lead to the suggestion of seven different categories of nuclei based on size and NII (**Figure 1**, **Table 1** and **Text S1**).

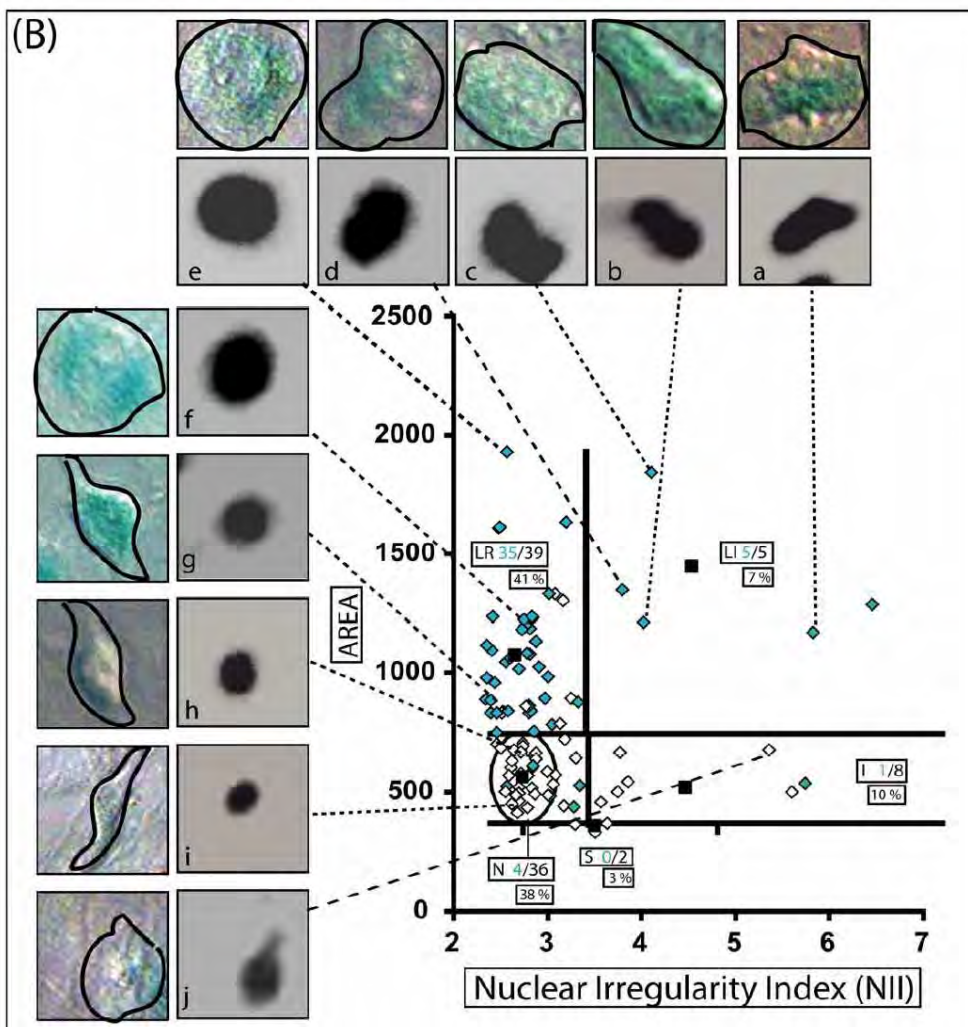
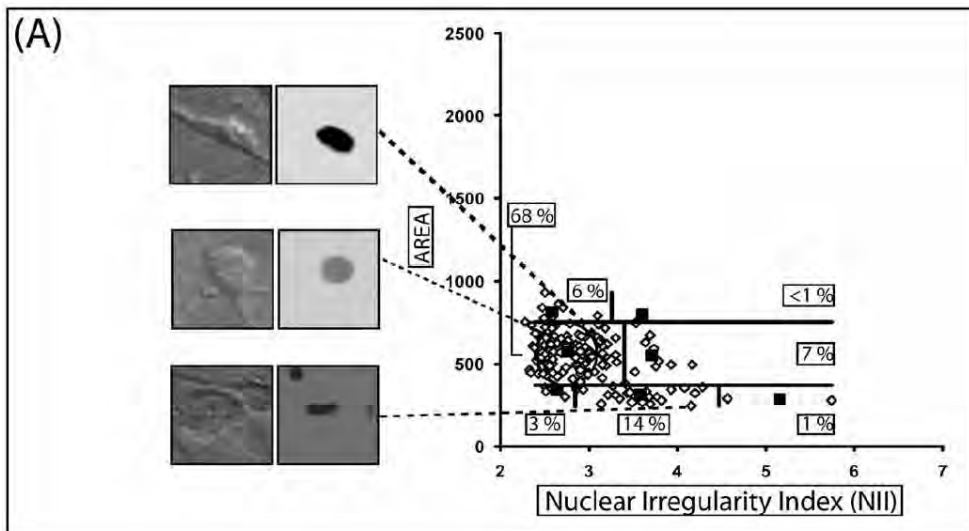
Normal nuclei of adhered cells in culture vary in size, but have a very regular shape (**Figure 1.h,i,j**), with some located at the borderline between N and I (**Figure 1.k**) and analysis of these nuclei are important for the precise setting of the threshold that separates these populations. Nuclei classified as I, (**Figure 1.a,b,c,l,n,r**) present high irregularity. Among the large nuclei, we found a clear separation between two groups in three experimental settings (**Figure 2**, **Figure 3** and **Figure S1 and S2**). On the lower NII range are the well-defined and regular nuclear shapes (**Figure 1.e,g**), whereas at higher NII range are the nuclei presenting morphological alterations (**Figure 1.d,f**), which may be undergoing MC.

Nuclei undergoing mitosis have higher values of NII than normal nuclei because of their elliptic shapes, and a broader range

**Table 1.** Morphological appearances and putative biological meanings of the different NMA populations presented in Figure 1.

Symbol	Name	Location in the graph	Morphological Appearance	Biological Meaning
N	Normal	Nuclei inside or close to the normal ellipse defined from a population of normal/regular nuclei	Normal shape and size	Interphase without damage that affects nuclear morphology
I	Irregular	Nuclei with area similar to N nuclei, but with high NII	Normal size and high irregularity	Mitotic catastrophe or other nuclear damaging event
SR	Small Regular	Nuclei with area below the normal ellipse with low NII	Very condensed and regular	Apoptosis in an early or intermediary stage
S	Small	Nuclei with area lower than the normal ellipse, but with intermediate NII	Small, but not spherical	Mitosis
SI	Small Irregular	Nuclei with area lower than the normal ellipse, but with high NII	Condensed small and irregular	Mitosis with damage or nuclear fragments
LR	Large Regular	Nuclei with area above the normal ellipse, but with NII similar to N	Large and regular	Senescence
LI	Large Irregular	Nuclei with area above the 'normal ellipse', but with NII higher than that of N nuclei	Significant nuclear damage in large nuclei or large multi-nucleated cells	Mitotic catastrophe or other nuclear damaging event

doi:10.1371/journal.pone.0042522.t001





**Figure 2. NMA of senescent glioma cells.** C6 glioma cells were treated with DMSO as vehicle control (A) or resveratrol (Rsv) and quercetin (Quer) for 12 days (B) for senescence induction [6]. Light blue diamonds are nuclei from  $\beta$ -galactosidase positive cells. Numbers denote  $\beta$ -gal positive and total nuclei in the different categories and the percentage of nuclei in each category. Inserts show examples of nuclear and  $\beta$ -gal staining (a–g positive and h–j negative). doi:10.1371/journal.pone.0042522.g002

of NII due to the variations in the shapes of the mitotic plate (Figure 1.m,p). However, some small nuclei also present very high irregularity (Figure 1.q), being thus classified as small and irregular (SI). It is also important to stress that in the NMA tool, each mitotic cell will be counted as one before anaphase (Figure 1.o), while after the anaphase the NMA tool will count two nuclei, which are normally located close to each other in the graph (Figure 1.m). Therefore, the NMA is not a good tool for counting mitotic cells, since at anaphase the two nuclei counted will still be part of a single cell, and will be evaluated as two nuclei. Notwithstanding, it provides a broad assessment of mitotic proportion in a cell population, as illustrated by the almost complete absence of mitotic nuclei in the senescent population analyzed in Figure 2.

### 3. Senescent Nuclear Enlargement in the NMA Plot

For the validation of senescence, we used the rat glioma cell line C6 treated with the combination of resveratrol and quercetin, which we have previously shown to induce high levels of senescence [5]. About 90% (35 of 39) of the large nuclei(LR+LI) were  $\beta$ -galactosidase positive (blue diamonds and examples of positive cells in inserts a–g), whereas only 4 out of 36 nuclei that localized in the normal population were  $\beta$ -gal positive (Figure 2–bottom graph). Additionally, in this population, only 2 mitosis were found in around 90 cells (around 2.2%), whereas in the control population this ratio was around 14% (Figure 2–top graph). These data support the usefulness of the NMA tool in predicting the senescent status of a cell population, with the advantage of being much less subjective than the current standard method of  $\beta$ -gal staining and visual identification of the positive cells.

### 4. Nuclear Irregularities in the NMA Plot

To test the usefulness of the NMA tool to detect nuclear irregularities, we measured nuclei of a population of U87 glioma cells treated with vincristine (50 nM), which is described to induce several nuclear phenotypes, including MC and/or senescence [11,12], depending on the cell type and treatment. We observed that the treatment induced an increase of irregular nuclei (I and LI), from 7% in control to 41% (12%+29%) (Figure 3). Moreover, no nuclei were observed in the region were normal mitotic nuclei localized in the NMA graph.

In order to test the applicability of the NMA tool in other cell types, we treated the colorectal carcinoma cell line HCT116 with vincristine 50 nM. As expected, vincristine increased the percentage of both LI and LR nuclei. Average values of area of the LI and LR populations also increased, as did the NII of the LI population of nuclei treated with vincristine when compared to control (Figure S1). It is important to note that induction of senescence-like phenotype in cancer cells usually is accompanied by MC [13]. Thus, our tool allows a dynamic analysis of the development of both events over time.

We have also performed an analysis of data from published papers of Shao *et al* [14] and Vakifahmetoglu *et al* [1], which presented enough control nuclei to set the standards for the studied cell line as well as pictures of nuclei undergoing MC that could be measured. Despite the small number of images for control nuclei, NMA provided a well-defined distribution for the control nuclei

and a broad distribution of the catastrophic nuclei, mainly in the LI group. All treated nuclei localized in the I or LI regions of the NMA plot. This is expected, since the illustrative pictures probably were selected to clearly show the catastrophic nature of the nuclei (Figure S2).

### 5. Apoptotic Nuclear Condensation in the NMA Plot

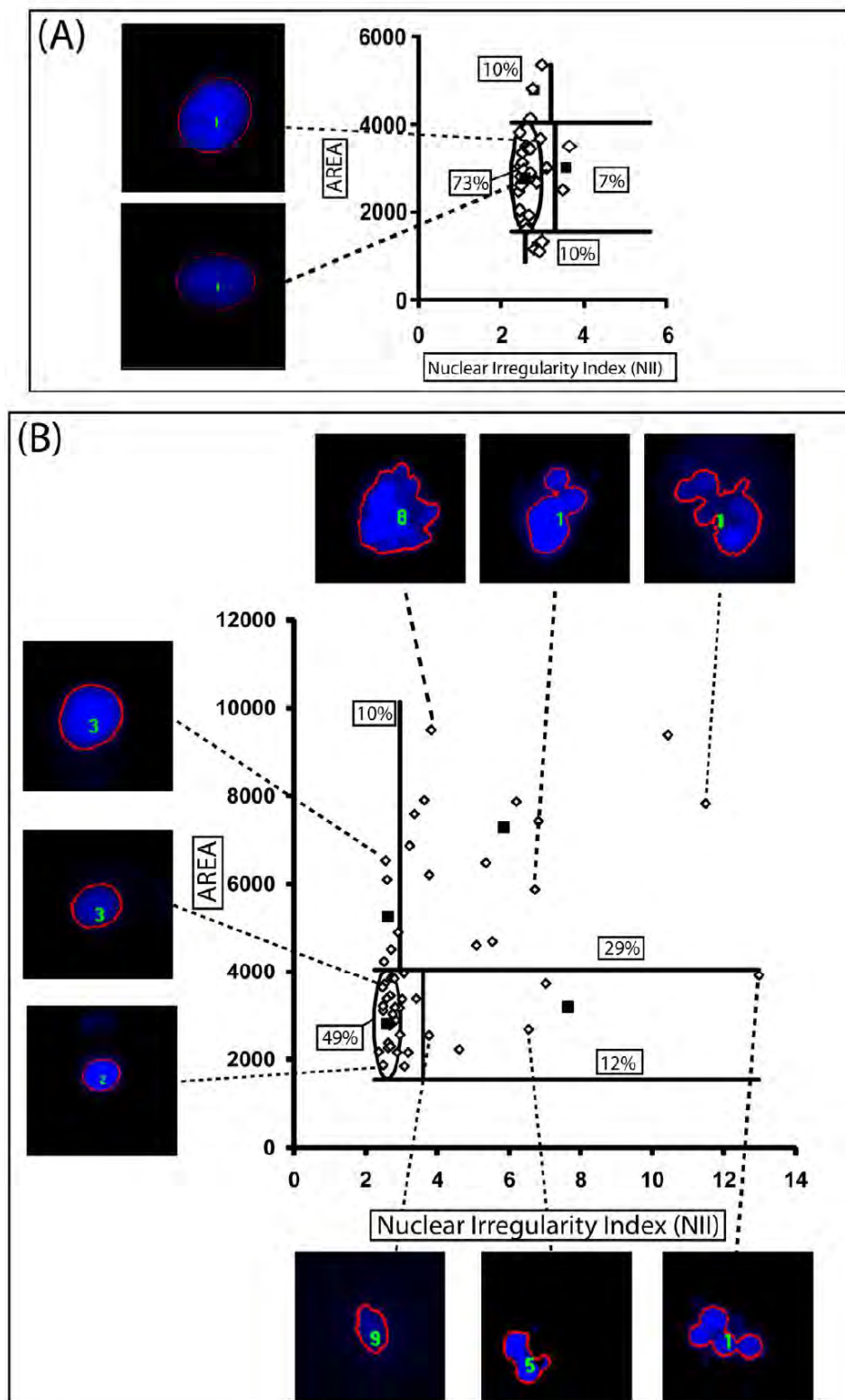
Cells undergoing apoptosis suffer a high and regular condensation of the nucleus [15] which in culture occurs prior to nuclear fragmentation and cell detachment but almost concomitantly with the externalization of phosphatidylserine and formation of blebblings in the cell membrane. Due to this high condensation in a near spherical form, we hypothesized that nuclei of cells undergoing apoptosis may appear as small and regular (SR), *i. e.* on the lower left corner of the NMA plot. In order to validate this hypothesis, we evaluated the induction of apoptosis in U87 cells treated with cisplatin the presence of zAsp, a caspases 3/7 inhibitor. Apoptosis was confirmed by annexin V-FITC staining. Fourteen out of 29 nuclei located in the SR were annexin V positive as visualized with a fluorescence microscope and none of the annexin V-positive cell was located in any region outside SR (Figure 4B), whereas no cell was annexin V-positive in the vehicle-treated (Figure 4A).

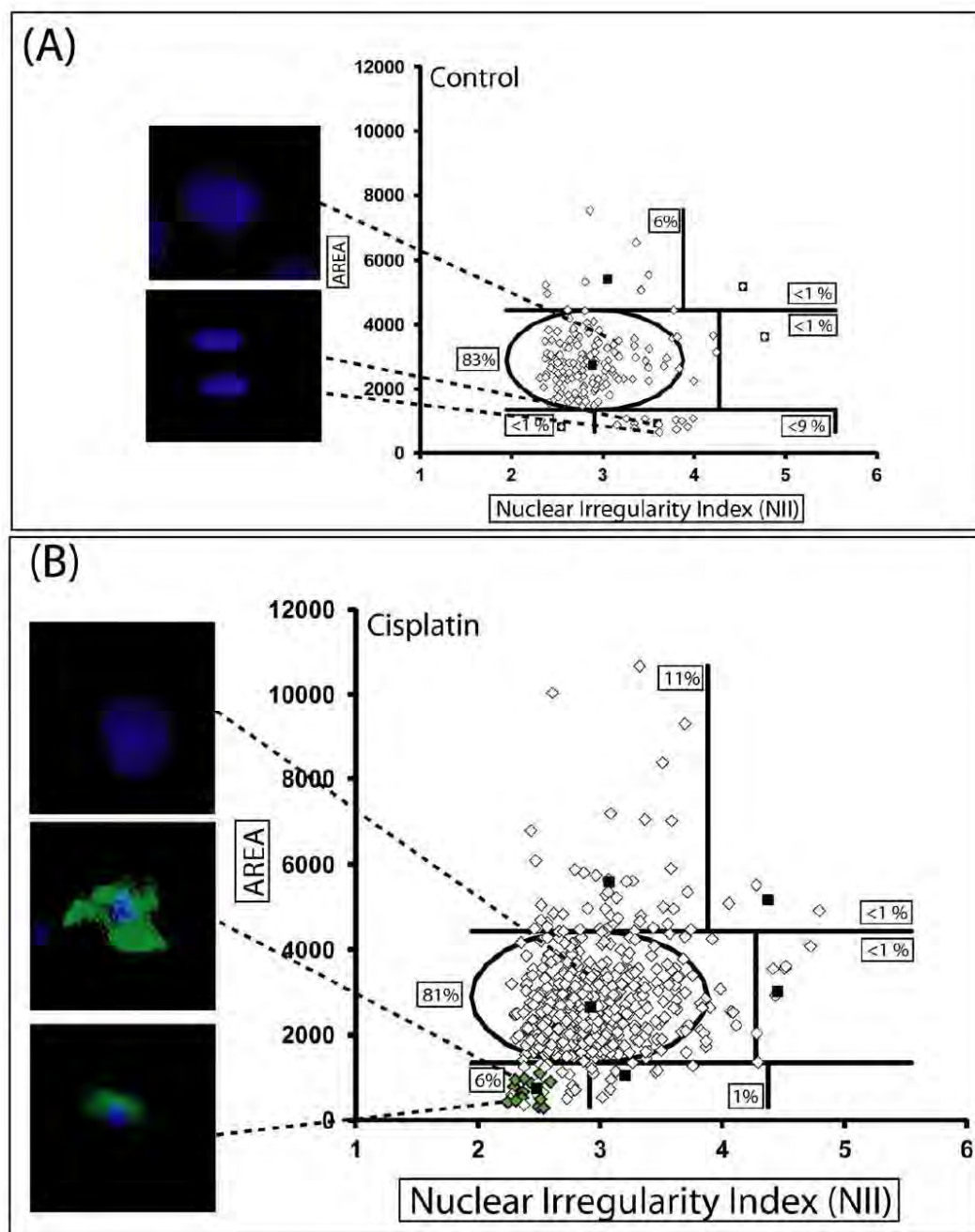
A side by side analysis with NMA and annexin analysis through flow cytometry presented a very good correlation (Figure 5B). Inhibition of apoptosis with a caspases inhibitor reduced the apoptotic population detected with NMA to 7% and annexin to 10% in comparison to 49 and 57%, respectively, in the absence of zAsp (Figure 5A and B).

Additionally, NMA was also able to detect etoposide-induced apoptosis in HeLa cells, as well as differentiate apoptotic and mitotic cells (Figure S3), which normally appear in the S region of the NMA graph. Precise separation of S and SR regions may difficult the quantitative analysis of mitotic cells using NMA and additional methods should be employed to confirm mitotic cells. We also performed a kinetic analysis of Hoechst 3342-stained nuclei of HeLa cells treated with cisplatin. NMA graphs with the dynamics of area and NII, together with visible images of the cells undergoing apoptosis support the notion that nuclei located in the SR region of the NMA graph are apoptotic independent of the size and shape of the nuclei before apoptosis (Figure S4).

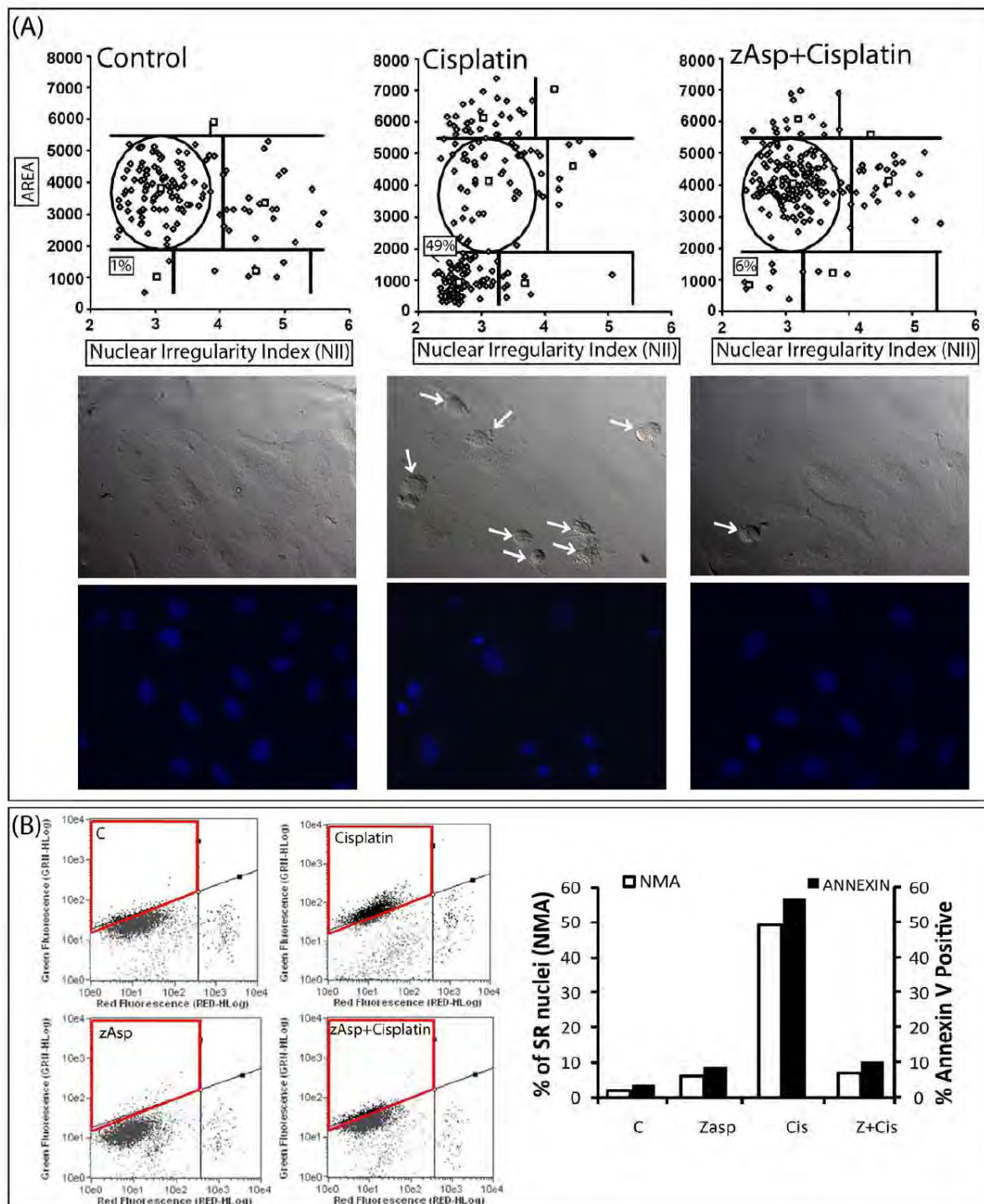
## Discussion

We present a new and objective tool based on measurements of morphometric data that allows the unbiased simultaneous analysis of nuclear features indicative of normal, senescent, apoptotic and irregular nuclei. It is important to stress that a method based solely on nuclear morphology is simplistic for the definitive identification of such complex cellular processes. Final identification of these processes has to be confirmed with standard techniques for each individual process. However, this is in line with the current way of detecting complex cellular states, which require more than one marker for definitive identification. Notwithstanding, the ability to easily identify these processes simultaneously gives this tool the advantage of an overview of the population dynamics related to these processes.





**Figure 4. NMA of cells in apoptosis.** U87 cells were treated with DMSO as vehicle control (A) (two representative overlaid images of nuclei and annexin are shown - both cells are negative for annexin) or Cisplatin (16.6  $\mu$ M) (B) for 24 h, a well-established protocol of apoptosis induction [17] with three overlaid images of nuclei (blue staining) and annexin (green staining). Green diamonds on the graph represent annexin-positive cells. doi:10.1371/journal.pone.0042522.g004



**Figure 5. Comparison of NMA and annexin apoptosis quantification.** (A) HeLa cells were pre-treated (1 h) with the caspases inhibitor zAsp-CH2-DCB (100  $\mu$ M), followed by treatment with Cisplatin (40  $\mu$ M), DAPI staining and NMA analysis. Top: NMA graphs; Middle: phase contrast; Bottom: DAPI fluorescence. Arrows point to cells with apoptotic phenotype. (B) HeLa cells were treated as in B, followed by annexin V-FITC staining and flow cytometry. Left: Flow cytometry plots. Green Fluorescence: annexin V; Red Fluorescence: PI. Region enclosed in red: Annexin V positive cells (*i.e.* apoptotic cells). Right: comparative percentage of apoptotic cells measured through NMA or annexin analysis. doi:10.1371/journal.pone.0042522.g005

There is a need for the development of objective, computer generated, analysis of morphological information of cells and tissues. Recently, a tool to predict the outcome of breast cancer patients based on morphometric analysis of tissues performed by a software developed by a machine learning-based method far outmatched other methods for predicting survival [16], indicating the potential for computer-based morphometric analysis.

It is also important to point out that the NMA tool is an easy to use and objective quantification of senescence and nuclear irregularities of adhered cells in culture, two processes normally assessed by subjective analysis of morphology or intensity of  $\beta$ -galactosidase labeling, respectively. Therefore, we believe that this tool can provide important new insights in the biology of complex cellular populations under normal and, most importantly, stressful conditions both in basic cell biology and, potentially, in pathological analysis.

## Methods

### 1. Software Information

Protocol uses Image Pro Plus 6.0 (IPP6 - Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), Image J 1.4.45 (NHI, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), PASW Statistics 18.0 (formerly known as SPSS - <http://www.spss.com/software/statistics/>), Microsoft Excel 2003 or 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA) and Open Office Calc ([www.openoffice.org](http://www.openoffice.org)). NMA plugin, spreadsheets and sample images are available at <http://www.ufrgs.br/labsinal/nma/>.

### 2. Procedure

Brief instructions for using the NMA procedure (see **Text S2** file for detailed instructions) are:

1. Take DAPI images (with at least 300 dpi; preferentially TIFF format) of at least 100 nuclei in each condition of experiment; do not take images of fields in high confluence;
2. Open an image on IPP6 or Image J (containing the plugin of NMA) and correctly mark the surrounding of nuclei to assess morphometric data to NMA, *i.e.* area, aspect, area box, radius ratio and roundness;
3. After obtaining raw data, choose a group of nuclei from the control condition and exclude nuclei in mitosis or with clear abnormalities. Use the data from these nuclei to set the parameters for the normal population. Paste data from these nuclei in the spreadsheet named “*Normal Nuclei and Settings*”, from NMA file from Excel or Open Office; choose the number of SD that best defines the ‘normal ellipse’; if using Excel, don’t forget to erase the formula in blank cells of the NII column;
4. Paste data from all conditions - control and for each treatment - into the columns named “Treated Nuclei (for setting)”, in the “*Normal Nuclei and Settings*” spreadsheet of NMA file from Excel or Open Office; thereafter, choose the number of SD to define the thresholds that better separate the populations;
5. Create as many spreadsheets as needed (one to each condition) and paste data from analyzed nuclei into them;
6. Analyze the percentage of nuclei in each population as well as the averages of the populations.

### 3. Cell Lines

U87, C6, HeLa and HCT116 cell lines were purchased from ATCC (American Type Cell Collection, ATCC, Rockville, MD)

and were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS in 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C.

### 4. Annexin Staining

Briefly, cells were pre-incubated with zAsp or vehicle for 1 h, followed by cisplatin treatment for 24 h. After this, for flow cytometry analysis, supernatant and cells were harvested, washed once with PBS 1x and once with annexin binding buffer, and incubated with a solution containing 6  $\mu$ M of PI and 0.5  $\mu$ L *per* sample of annexin V-FITC (Sigma Chemical; St. Louis, MO, USA) for 30 min, as indicated by the manufacturer, followed by flow cytometry. For microscopy, cells were washed once with PBS 1x and once with annexin binding buffer, and incubated with a solution containing 6  $\mu$ M of PI and 1  $\mu$ L of annexin *per* sample for 30 min, as indicated by the manufacturer. After, cells were fixed with paraformaldehyde 2% in PBS, stained with DAPI and images were acquired and overlaid.

## Supporting Information

**Figure S1 NMA of colon cancer cells treated with vincristine.** HCT116 colon cancer cells were treated with DMSO as a vehicle control (**A**) or vincristine 50 nM (**B**) for 24 h. Numbers in boxes denote the percentage of nuclei in each category as indicated and averaged area and NII for LR and LI nuclei.  
(TIFF)

**Figure S2 NMA of published MC nuclei.** Images of normal and MC cells from published papers were analyzed using NMA [1,14].  
(TIFF)

**Figure S3 NMA of HeLa cells treated with cisplatin or etoposide.** HeLa cells were treated with DMSO as vehicle control, cisplatin (40  $\mu$ M) or etoposide (100  $\mu$ M) [17], for 24 h, followed by fixation and image acquisition. (**A**) Overlaid images of cells (visible) and DAPI-stained nuclei. SR – small and regular nucleus; S – small nucleus; N – normal nucleus. (**B**) NMA plots of the treatments. Red diamonds represent cells with a mitotic morphology.  
(TIFF)

**Figure S4 Dynamic nuclear condensation measured by NMA.** HeLa cells were treated with cisplatin (40  $\mu$ M) for 18 h. At this time, the same fields were photographed every hour, during 5 hours. (**A**) NMA of three consecutive measurements one hour apart. Left: normal nuclei; right: apoptotic nuclei. Numbers correspond to the nuclei in (B). (**B**) Phase contrast and fluorescent images of live cells stained with Hoechst 33342. Arrows point to nuclei that suffer a strong nuclear condensation.  
(TIFF)

**Text S1 Supporting Results.** This file contains details of the development of the NMA tool and a detailed comparison between Image J and IPP software.  
(DOC)

**Text S2 Supporting Methods.** This file describes the instructions of using Image J, IPP and Spreadsheets to perform the NMA analysis.  
(DOC)

## Acknowledgments

We like to thank José E. Vargas for providing images, Emily S. Villodre for testing NMA on a mac and Pitia F. Ledur for proofreading the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ECFC GL. Performed the experiments: ECFC GL. Analyzed the data: ECFC GL SMCJ.

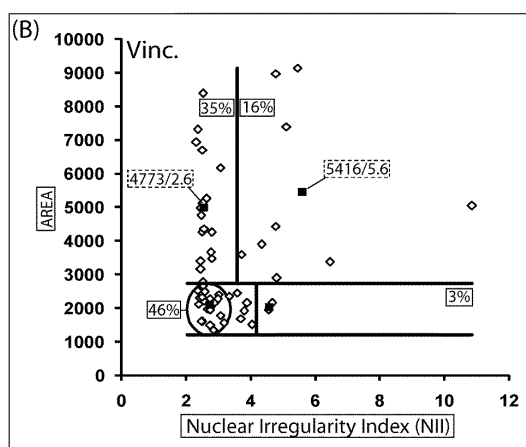
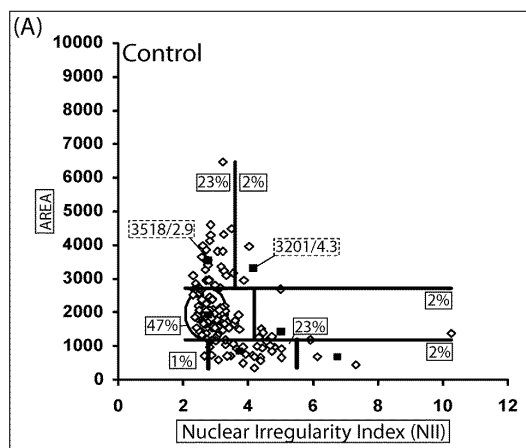
Contributed reagents/materials/analysis tools: VDS. Wrote the paper: ECFC GL. Designed the software used in analysis: MMO BJ.

## References

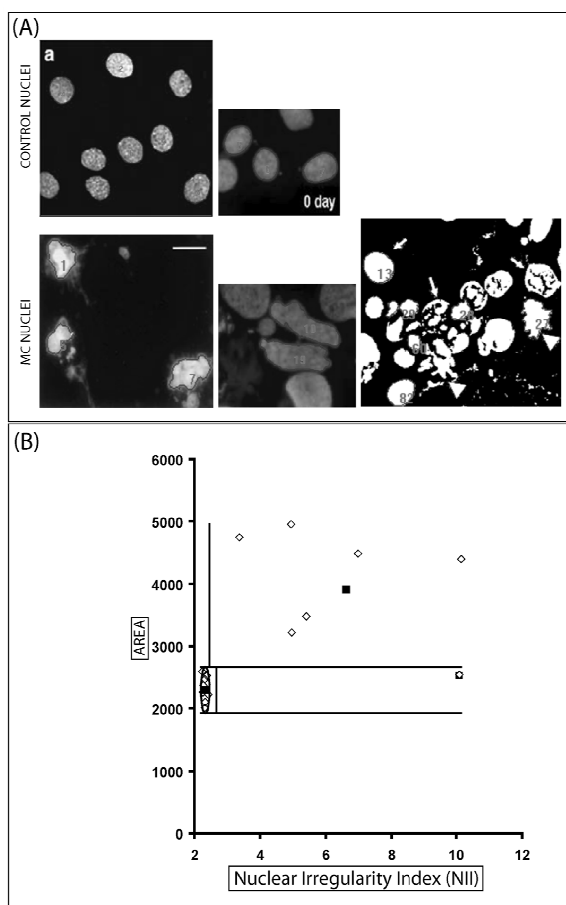
- Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15: 1153–1162.
- Stevens FE, Beamish H, Warrener R, Gabrielli B (2008) Histone deacetylase inhibitors induce mitotic slippage. *Oncogene* 27: 1345–1354.
- Rello-Varona S, Kepp O, Vitale I, Michaud M, Senovilla L, et al. (2010) An automated fluorescence videomicroscopy assay for the detection of mitotic catastrophe. *Cell Death Dis* 1: e25.
- Collado M, Serrano M (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10: 51–57.
- Zamin LL, Filippi-Chiela EC, Dillenburg-Pilla P, Horn F, Salbego C, et al. (2009) Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci* 100: 1655–1662.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363–9367.
- Campisi J, d'Adda di Fagnagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729–740.
- Sekhar KR, Sonar VN, Muthusamy V, Sasi S, Laszlo A, et al. (2007) Novel chemical enhancers of heat shock increase thermal radiosensitization through a mitotic catastrophe pathway. *Cancer Res* 67: 695–701.
- Xia L, Wang XX, Hu XS, Guo XG, Shang YP, et al. (2008) Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol* 155: 387–394.
- Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegman A, Lakhani SR, Brown MP, et al. (2010) Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene*.
- Roninson IB (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 63: 2705–2715.
- Jung H, Sok DE, Kim Y, Min B, Lee J, et al. (2000) Potentiating effect of obacunone from *Dictamnus dasycarpus* on cytotoxicity of microtubule inhibitors, vincristine, vinblastine and taxol. *Planta Med* 66: 74–76.
- Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, et al. (2005) Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 24: 4765–4777.
- Shao RG, Cao CX, Pommier Y (2004) Abrogation of Chk1-mediated S/G2 checkpoint by UCN-01 enhances ara-C-induced cytotoxicity in human colon cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* 25: 756–762.
- Saraste A (1999) Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* 24: 189–195.
- Beck A, Sangoi A, Leung S, Marinelli R, Nielsen T, et al. (2011) Systematic Analysis of Breast Cancer Morphology Uncovers Stromal Features Associated with Survival. *Science Translational Medicine* 3: 108–113.
- Kondo S, Barna BP, Morimura T, Takeuchi J, Yuan J, et al. (1995) Interleukin-1 beta-converting enzyme mediates cisplatin-induced apoptosis in malignant glioma cells. *Cancer Res* 55: 6166–6171.



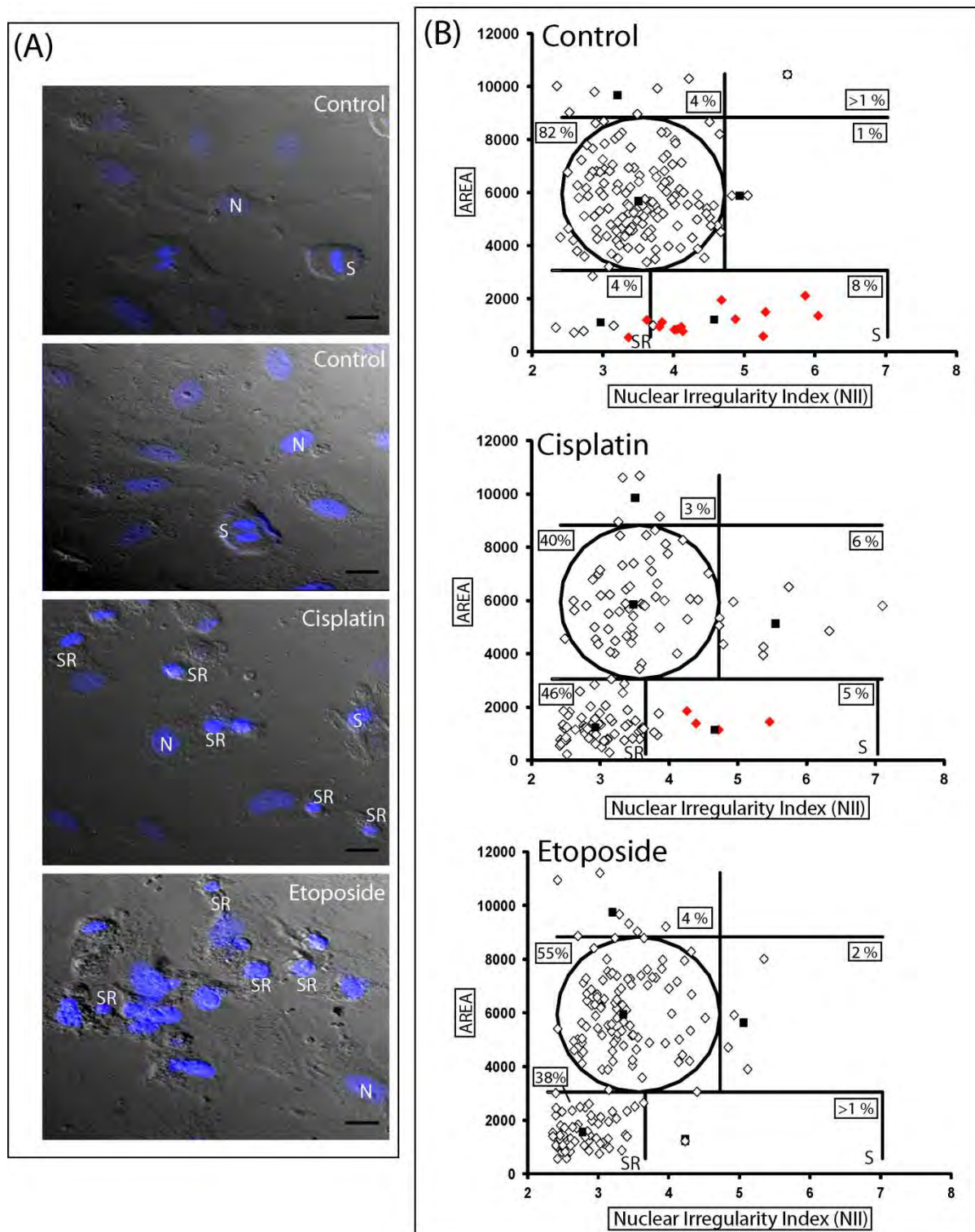
## Supplementary Figures



**Figure S1 - NMA of colon cancer cells treated with vincristine.** HCT116 colon cancer cells were treated with DMSO as a vehicle control (A) or vincristine 50 nM (B) for 24 h. Numbers in boxes denote the percentage of nuclei in each category as indicated and averaged area and NII for LR and LI nuclei.

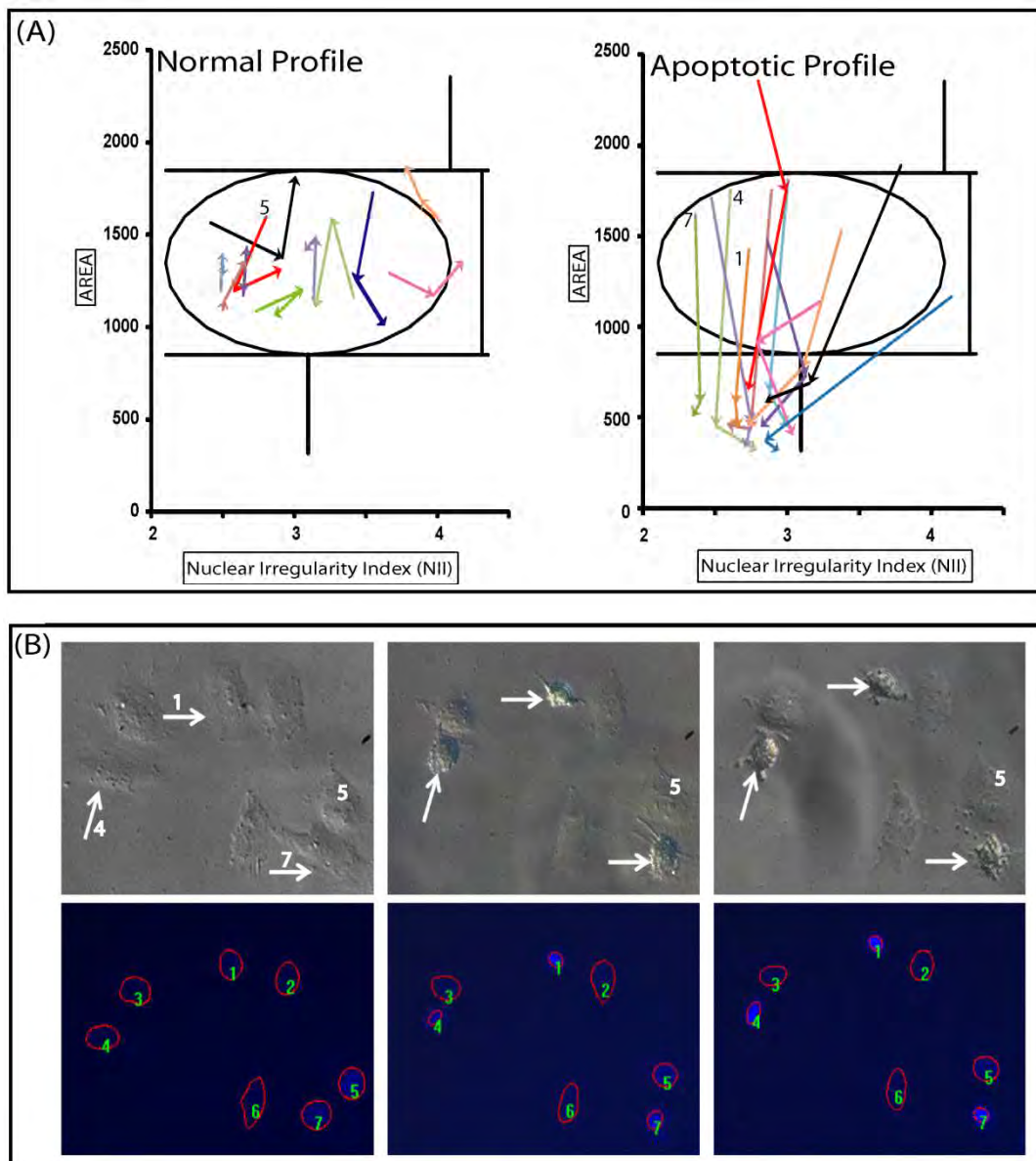


**Figure S2 - NMA of published MC nuclei.** Images of normal and MC cells from published papers were analyzed using NMA.



**Figure S3 - NMA of HeLa cells treated with cisplatin or etoposide.** HeLa cells were treated with DMSO as vehicle control, cisplatin (40  $\mu$ M) or etoposide (100  $\mu$ M) [17], for 24 h, followed by fixation and image acquisition. (A) Overlaid images of cells (visible) and DAPI-stained nuclei. SR – small and regular nucleus; S – small nucleus; N – normal nucleus. (B) NMA plots of the treatments. Red diamonds represent cells with a mitotic morphology.





**Figure S4 - Dynamic nuclear condensation measured by NMA.** HeLa cells were treated with cisplatin (40  $\mu$ M) for 18 h. At this time, the same fields were photographed every hour, during 5 hours. (A) NMA of three consecutive measurements one hour apart. Left: normal nuclei; right: apoptotic nuclei. Numbers correspond to the nuclei in (B). (B) Phase contrast and fluorescent images of live cells stained with Hoechst 33342. Arrows point to nuclei that suffer a strong nuclear condensation.

## **Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of apoptosis, mitosis, senescence and mitotic catastrophe**

Eduardo C. Filippi-Chiela<sup>1</sup>, Manuel M. Oliveira<sup>3</sup>, Bruno Jurkovski<sup>3</sup>, Sidia Maria Callegari-Jacques<sup>4</sup>, Vinicius Duval da Silva<sup>5</sup>; Guido Lenz<sup>1,2,\*</sup>

### **Supporting Results**

---

#### **Principal Component Analysis (PCA) for NMA**

To develop the tool we used a population of nuclei from the glioblastoma cell line U87 treated with Temozolomide (TMZ), which causes DNA damage and G<sub>2</sub> cell cycle arrest, combined with a drug that blocks this arrest and makes the cells undergo mitosis with wide DNA damage, thus generating a multitude of nuclear morphology that is characteristic of mitotic catastrophe (MC).

Nuclei were stained with DAPI and pictures were taken on a fluorescence microscope. Images were analyzed using the IPP6 software (as described in *Supporting Methods file*) and 46 parameters of nuclear size, shape and marking (**Supp. Results Table 1**) were produced for a large number of nuclei. This data was used for the statistical analysis of measurements of main significance for morphometric analysis.

		Component Matrix						
Measurement	Abreviation	Component						
		1	2	3	4	5	6	7
Area	Area	0.988						
Aspect	Asp		0.653					
Area/Box	Arbx		-0.784					
Box x/y	Boxxy							0.721
Centroid X	Cx					-0.704		
Centroid Y	Cy						0.629	
Density	Dens			0.824				
Angle	Ang							
Axis major	Axma	0.925						
Axis minor	Axmi	0.949						
Diameter (max)	Dima	0.933						
Diameter (min)	Dimi	0.925						
Diameter (med)	Dime	0.993						
Radius (max)	Rama	0.887						
Radius (mean)	Rami	0.872						
Perimeter	Per	0.982						
Radius ratio	Rr		0.865					
Roundness	Rou		0.900					
Density green	Dengr							
Density blue	Denbl			0.806				
PerArea	Pa	0.988						
Size lenght	Szl	0.928						
Size width	Szw	0.965						
Perimeter2	Per2	0.979						
Integrated Optical Density	Iod	0.880						
Perimeter convex	Percv	0.986						
Perimeter (ellipse)	Perel	0.995						
Perimeter (ratio)	Perra	0.982	-0.705					
Area (polygon)	Arpol	0.987						
Fractal Dimension	Fd							
Center mass x	Cxmas					-0.704		
Center mass y	Cymas						0.629	
Count (adjusted)	Ctadj	0.988						
Box Width	Bxw	0.900						
Box Height	Bxh	0.895						
Feret (min)	Fermi	0.964						
Feret (max)	Ferma	0.930						
Feret (mean)	Ferme	0.991						
Density (min)	Dstmi			0.888				
Density (max)	Dstma							
Density (stand. dev)	Dstsd				0.614			
Margination	Mrg			0.785				
Heterogeneity	Het				0.659			
Clustering	Clu							
Density (sum)	Dstsu	0.880						
Perimeter3	Per3	0.979						

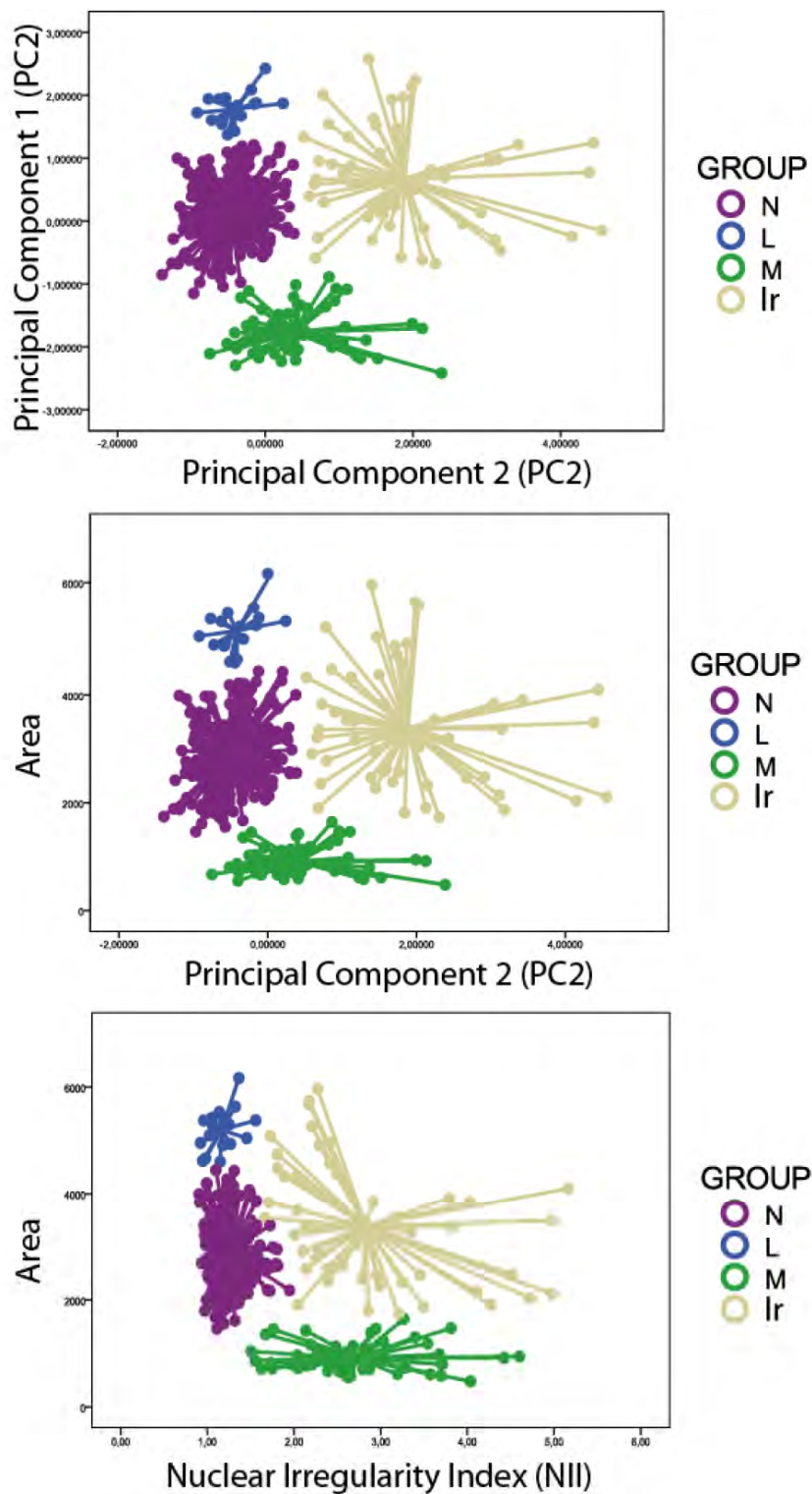
Component	Cumulative % of Variance
1	51%
2	62%
3	71%
4	77%
5	82%
6	85%
7	88%

**Supp. Results Table 1 – Principal component analysis (PCA) of morphometry measurements obtained using Image Pro Plus 6.0 (IPP6).** Values represent the correlation of the variable with the correspondent principal component (PC). In the bottom of the table the cumulative percentage of the total variability of represented by the PC is shown.

### **Statistical method for discovering the measurements that better separate populations based on nuclear morphology**

We initially grouped the nuclei based on typical morphology, as N (Normal), M (Mitotic), L (Large) and Ir (Irregular). The nuclei clearly presented characteristics of these phenotypes (**Supp. Results Fig. 1**). The measurements of the 46 variables underwent Principal Component Analysis (PCA) using the software PASW Statistics 18 (formerly known as SPSS). The first Principal Component (PC1) accounted for 51% of the total variability and presented high ( $> 0.87$ ) correlation values with measurements directly related to size (area, perimeter, diameter and so forth, in a total of 26 major measurements) (**Supp. Results Table 1**).

Measurements of shape and regularity such as aspect, area/box, roundness and radius ratio had absolute correlations higher than 0.65 with PC2, which accounted for additional 11% of total variability. These two components together represented 62% of the variance. A successful separation of N, M, L and Ir nuclei were obtained plotting PC1 versus PC2 values. Confirming the characteristic of size of PC1, a plot of area versus PC2 was as efficient in separating these groups of nuclei as was PC1 versus PC2 (**Supp. Results Fig. 1**). This suggests that area alone is sufficient to represent the variability represented by PC1. Plots of PC3 to PC5 versus area or PC2 did not produce a good separation of the groups (*data not shown*).



**Supp. Results Figure 1 – Separation of nuclei using data from Principal Component Analysis (PCA).** Separation was performed using PC1 and PC2 (top), Area and PC2 (mid), Area and NII (bottom). N=normal; L=Large; M=mitotic; Ir=irregular.

In order to assess the importance of each of the five more influential measurements on PC2, we used a multivariate analysis of variance (MANOVA) with Student-Neuman-Keuls post-hoc test to compared N, L, M and Ir nuclei in relation to these variables. None of the five variables of PC2 (Aspect, Area/Box, Radius Ratio, Roundness, Perimeter Ratio) efficiently separated N and L nuclei, since these populations are distinguished by Area (or PC1) and have similar PC2 values (**Supp. Results Fig. 1**). On the other hand, all measurements alone efficiently discriminated groups N and L from M and Ir, except perimeter ratio, which did not separate N and L from M nuclei (**Supp. Results Fig. 2**). Therefore, Perimeter Ratio was dropped from the analysis.

(A)		Aspect			
GROUP	Number of nuclei	Subset			Sig.
		1	2	3	
Normal	247	1.21			
Large	17	1.17			
Mitotic	59			1.89	
Irregular	54		1.58		
Sig.		0.31	1.0	1.0	

(B)		Area/Box			
GROUP	Number of nuclei	Subset			Sig.
		1	2	3	
Normal	247			0.77	
Large	17			0.77	
Mitotic	59		0.69		
Irregular	54	0.65			
Sig.		1.0	1.0	0.423	

(C)		Radius Ratio			
GROUP	Number of nuclei	Subset			Sig.
		1	2	3	
Normal	247	1.30			
Large	17	1.24			
Mitotic	59		2.20		
Irregular	54			2.36	
Sig.		0.40	1.0	1.0	

(D)		Roundness			
GROUP	Number of nuclei	Subset			Sig.
		1	2	3	
Normal	247	1.05			
Large	17	1.03			
Mitotic	59		1.23		
Irregular	54			1.38	
Sig.		0.49	1.0	1.0	

(E)		Perimeter Ratio			
GROUP	Number of nuclei	Subset			Sig.
		1	2	3	
Normal	247		0.99	0.99	
Mitotic	59		0.99		
Large	17			0.99	
Irregular	54	0.98			
Sig.		1.0	0.10	0.20	

**Figure 2 – Discrimination of variables that compound PC2 in separate groups of nuclei.** Variables were tested for its capacity to separate nuclear population. As shown, only Perimeter Ratio was not able to separate populations of nuclei N and M – as marked in (E), as performed by PC2 (see Supp. Results Figure 1).

Finally, the variables that better described regularity - Aspect (Asp), AreaBox (Arbx),

Radius ratio (Rr) and Roundness (Rou) - were combined in an index called Nuclear Irregularity Index (NII),. In all PCAs, Arbx presented a negative correlation, which is understandable since more complex objects have a lower Arbx value. Therefore, the NII is given by:

$$NII = Asp - Arbx + Rr + Rou$$








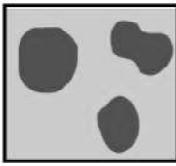
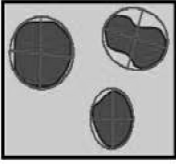
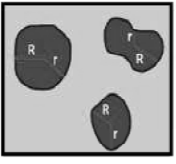
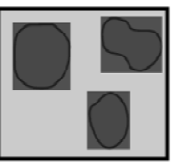

A graph of Area versus NII was very similar to PC1 versus PC2, (**Supp. Results Fig. 1 – bottom**) showing that the variable reduction strategy (from 46 to five measurements) adopted did not significantly reduce the description of the important aspects of nuclear morphology. It is important to notice that these weights were established based on our populations of nuclei and that data from other cell types or treatments may require other weights. Therefore these weights are changeable in the Excel file available to users.

#### **Development and Validation of a Plugin for the Morphometric Analysis using the free Software Image J**

In order to permit a wider use of this tool, we developed an Image J plugin that allows the quantification of the five measurements that are part of the morphometric analysis. Similarly to IPP6, images of nuclei stained with DAPI are necessary to do the nuclear analysis using the Image J, with 300 dpi or more to guarantee the quality of the results (for more details about the Plugin and a user manual, see *Supp. Methods file*).

The mathematics and the objective of the Plugin is very similar to the analysis using IPP6, with some improvements, since it was developed specifically for this task. As soon as the plugin starts to execute, it will outline all the nuclei found for the current parameters set. As for IPP6, new nuclei can appear/disappear if the parameters are changed, or can be manually inserted by the user.

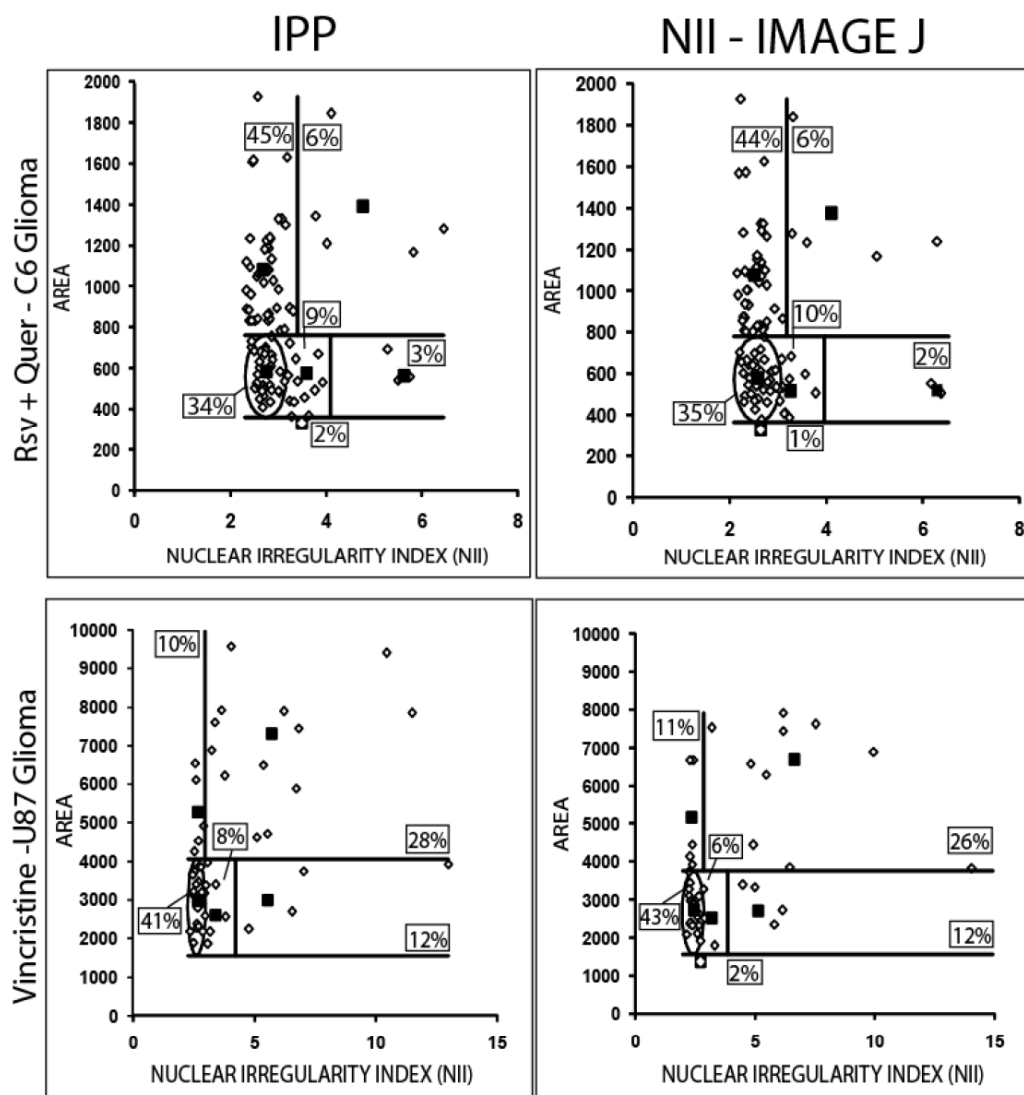
The individual values obtained with IPP6 and Image J for the five measurements as well as for NII are presented for seven examples of representative nuclei (**Supp Results Fig. 3**). A comparison of data generated by IPP6 and our Image J plugin did not differ in more than 85% for all measurements and for NII in a population of more than 50 nuclei.

			N	LR	LI	M	MI	I2	I1
MEASUREMENT	MEANING								
	Area of each object	IPP	2329	4805	5964	1137	1722	2584	1925
		IJ	2333	4709	5914	1141	1775	2507	2004
	Ratio between the major axis and the minor axis of the ellipse equivalent to the object (i.e., an ellipse with the same area, first and second degree moments); aspect is always greater than 1.	IPP	1.20	1.03	1.82	2.10	2.21	1.76	1.33
		IJ	1.41	1.09	2.08	2.12	2.19	2.67	2.04
	Ratio between maximum radius and minimum radius for each object	IPP	1.28	1.13	2.98	2.59	3.08	3.67	6.76
		IJ	1.64	1.14	3.04	2.51	2.87	3.54	6.50
	Ratio between the area of each object, and the area of its imaginary bounding box, as determined by Area of Object / Area of Box	IPP	0.76	0.77	0.61	0.66	0.74	0.53	0.53
		IJ	0.65	0.76	0.73	0.64	0.55	0.61	0.61
	Roundness of each object, as determined by the following formula: $(per^2)/(4*pi*area)$ . Circular objects will have a roundness = 1; other shapes will have a roundness >1.	IPP	1.04	1.03	1.27	1.32	1.03	1.53	1.68
		IJ	0.81	0.96	0.99	1.31	1.41	1.13	1.31
NII Nuclear Irregularity Index	$NII = Asp - Arbx + Rr + Rou$	IPP	2.76	2.42	5.46	5.35	5.58	6.43	9.24
		IJ	3.02	2.43	5.38	5.30	5.92	6.73	9.24

Supp. Results Figure 3 – Illustration and comparison between IPP6 and ImageJ of measurements that best represent the variability observed in nuclear morphology. Graphical representation and meaning of morphometric variables given by IPP6 software as well as measurements from seven representative nuclei that belong to the features used to evaluate the separation between groups using IPP6 and Image J (IJ).



Further, comparisons of the percentage of nuclei in each population using IPP6 and ImageJ confirmed the validation of the ImageJ plugin developed to perform NMA (**Supp. Results Fig. 4**).



**Supp. Results Fig. 4 - Graphs comparing nuclear separation using IPP6 and Image J data.** Numbers in boxes denote the percentage of nuclei in each category. MC – mitotic catastrophe; NII-Image-J – Nuclear Index Irregularity using the plugin to Image J

#### Development of the file to analyze raw data

Next we set up a user friendly Excel file to allow easy analysis of nuclear

morphometric data. The first spreadsheet (named 'Normal nuclei and Settings') is where normal nuclei data (area, aspect, area box, radius ratio and roundness from nuclei with a regular/normal shape) are inserted. NII is automatically calculated based on the relative weights applied to each measurement. The averaged area and NII of these measurements are calculated, followed by generating an elliptic plot, here named 'normal ellipse', obtained considering the number of Standard Deviations (SD) from the mean. The number of SD to define the 'normal ellipse' must be changed by the user, so that the line circulates the population of nuclei (to see examples, see *Supporting Methods file*). The 'normal ellipse' will be the reference data for the other spreadsheets.

Still in the first spreadsheet, a place to define the "settings" of the analysis is available to the user. User must paste all data obtained in the yellow box indicated and set the number of standard deviations to separate the populations of nuclei, similarly to a flow cytometric analysis. Examples of this procedure can be observed in the *Supporting Methods file*. Many spreadsheets (named as "Test") may be include that will contain control and treated nuclei. The user may increase the number of spreadsheets, dragging any 'Test' spreadsheet to the right while pressing the *Ctrl* key (in windows). Inserting the data from the tests will produce a plot of area versus NII to each condition. Furthermore, averaged area and NII of each population of nuclei, beyond SD of these variables, are calculated to the experiments. The average of each population is plotted in the graphs (**Supp. Results Fig. 4**).

## CAPÍTULO II

### *Autophagy and Genome Integrity*

Nos últimos anos tem crescido enormemente o número de trabalhos investigando o papel da autofagia em outros mecanismos envolvidos em proliferação e morte celular. Entretanto, nenhum trabalho havia sido realizado revisando a literatura que descrevia o papel da autofagia na manutenção da integridade genômica e na resposta de dano ao DNA gerada a partir de injúrias no genoma.

Neste sentido, juntamente com o aluno de doutorado do Laboratório de Reparo do DNA Alexandre Teixeira Vessoni, orientado pelo Prof. Dr. Carlos Frederico Menck, da Universidade de São Paulo, analisamos os principais trabalhos relacionando autofagia e integridade genômica. O artigo de revisão a seguir foi publicado no periódico *Cell Death and Differentiation*, e descreve os seguintes itens:

- Autofagia, metabolismo mitocondrial e tumorigênese
- O papel da autofagia no reparo de DNA
- Nucleofagia como uma maneira de eliminar DNA injuriado
- Vias de sinalização conectando a resposta de dano ao DNA à autofagia
- O papel dual da autofagia no contexto do dano ao DNA
- O *crosstalk* entre autofagia e dano ao DNA em neurodegeneração, câncer e envelhecimento



## Review

# Autophagy and genomic integrity

AT Vessoni<sup>\*1,3</sup>, EC Filippi-Chiela<sup>2,3</sup>, CFM Menck<sup>1</sup> and G Lenz<sup>2</sup>

DNA lesions, constantly produced by endogenous and exogenous sources, activate the DNA damage response (DDR), which involves detection, signaling and repair of the damage. Autophagy, a lysosome-dependent degradation pathway that is activated by stressful situations such as starvation and oxidative stress, regulates cell fate after DNA damage and also has a pivotal role in the maintenance of nuclear and mitochondrial genomic integrity. Here, we review important evidence regarding the role played by autophagy in preventing genomic instability and tumorigenesis, as well as in micronuclei degradation. Several pathways governing autophagy activation after DNA injury and the influence of autophagy upon the processing of genomic lesions are also discussed herein. In this line, the mechanisms by which several proteins participate in both DDR and autophagy, and the importance of this crosstalk in cancer and neurodegeneration will be presented in an integrated fashion. At last, we present a hypothetical model of the role played by autophagy in dictating cell fate after genotoxic stress.

*Cell Death and Differentiation* advance online publication, 9 August 2013; doi:10.1038/cdd.2013.103

### Facts

- Autophagy can be activated by the DNA damage response (DDR) and influences the processing of genomic lesions; in some cases, autophagy may contribute to cell death after genotoxic stress.
- By degrading dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates, autophagy contributes to genomic stability, thereby acting as a tumor suppressor mechanism.
- Genomic stabilizing properties of autophagy can also be achieved through removal of micronuclei and damaged nuclear parts.

- What determines whether autophagy will prevent or contribute to cell death after genotoxic stress?
- Can the interplay between DDR and autophagy be exploited to improve the treatment of cancer or neurodegenerative diseases?

Cells have evolved complex mechanisms to safeguard the genome, which is constantly threatened by environmental and endogenous DNA damage-inducing agents. In the event of genomic assault, the DNA damage response (DDR) takes place, leading to the detection, signaling and repair of lesions. In the case of excessive damage, cells activate apoptosis or senescence, thereby avoiding the proliferation of potentially tumorigenic cells.<sup>1–4</sup>

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a lysosome-dependent degradation pathway that promotes cell homeostasis in response to stress such as nutrient deprivation, oxidative stress or DNA damage. This mechanism is centrally controlled by the autophagy-related (*atg*) family of genes,<sup>5</sup> which is modulated by several kinases

### Open Questions

- How does autophagy influence the processing of DNA lesions?
- Do different types of DNA lesions activate autophagy through specific or shared pathways?

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil and <sup>2</sup>Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: AT Vessoni, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 São Paulo, SP 05508-900, Brazil. Tel: +55 11 3091 7499; Fax: +55 11 3091 7354; E-mail: alexandre.vessoni@usp.br or eduardochiela@gmail.com

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** autophagy; DNA repair; genomic integrity; oxidative stress

**Abbreviations:** Ambra1, activating molecule in Beclin1-regulated autophagy; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATG, autophagy-related; ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related; BER, base excision repair; Bif-1, endophilin-B1; C-EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer-binding protein alpha; Bnip3, Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3; DDR, DNA damage response; DNAPK, DNA-dependent protein kinase; dNTP, deoxyribonucleoside triphosphate; DRAM, damage-regulated autophagy modulator; DSB, double strand break; E2F1, E2F transcription factor 1; ERK, extracellular signal-regulated protein kinase; FIP200, focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa;  $\gamma$ -H2AX, phosphorylated histone H2AX; HDAC, histone deacetylases; HR, homologous recombination; ISG20L1, interferon stimulated gene 20-like 1; LC3, light chain 3; LKB1, liver kinase B1; 3-MA, 3-methyladenine; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MLH, MutL-homolog; MMP, mitochondrial membrane permeabilization; MMR, mismatch repair; MSH, MutS-homolog; mtDNA, mitochondrial DNA; mTOR, mammalian target of rapamycin; NAC, N-acetyl L-cysteine; nDNA, nuclear DNA; NER, nucleotide excision repair; NHEJ, non homologous end joining; OGG1, 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; PALA, N-(phosphonoacetyl)-L-aspartate; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PINK1, PTEN-induced kinase 1; PTEN, phosphatase and tensin homolog; p70S6 kinase, p70 ribosomal protein S6 kinase; ROS, reactive oxygen species; SQSTM1, sequestosome 1; SSB, single strand break; TSC2, tuberous sclerosis complex 2; ULK-1, unc-51-like kinase 1; UVRAG, UV irradiation resistance-associated gene; VPA, valproic acid

Received 28.2.13; revised 07.6.13; accepted 02.7.13; Edited by E White

including mTOR,<sup>6</sup> PI3k/Akt,<sup>6</sup> AMPK<sup>7</sup> and MAPK.<sup>8</sup> The protective functions of autophagy are achieved through the recycling of damaged and/or obsolete cellular components, such as dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates, thereby generating metabolic precursors for vital processes such as ATP production and macromolecular synthesis.<sup>9–11</sup> In addition to its role in cell survival, autophagy also contributes to organism homeostasis by clearing apoptotic cells during embryonic development<sup>12</sup> and after certain types of DNA damage.<sup>13,14</sup>

In this review, we examine the roles proposed for autophagy in preventing genomic instability, as well as the connection of autophagy to DDR and cell fate after DNA damage. We also discuss the roles proposed for autophagy in the development and therapy of cancer and other human diseases.

### Autophagy, Mitochondria Metabolism and Tumorigenesis

One of the first evidences linking autophagy to tumorigenesis was described by Schwarze and Seglen in 1985. They observed that the degradation of long-lived proteins during starvation was reduced in hepatocytes from carcinogen-treated rats because of reduced autophagic activity, contributing to cell survival.<sup>15</sup> A few years later, a surprising number of reports highlighted the role of autophagy in tumorigenesis. In 1999, Aita *et al.* reported allelic deletions in the essential autophagy gene *beclin 1* (*atg6*) in a high percentage of breast carcinoma cell lines.<sup>16</sup> In the same year, Liang *et al.* reported that expression of *beclin 1* in MCF7 cells, a metastatic human breast cancer cell line with 17q21 loss of heterozygosity, the region where the *beclin 1* locus maps, increased contact inhibition, reduced proliferation rates and decreased tumor formation *in vivo*.<sup>17</sup> Conversely, heterozygous disruption of *beclin 1* compromised autophagy activation and resulted in increased cellular proliferation<sup>18</sup> and spontaneous tumor formation in mice.<sup>19</sup>

These early observations of the role of *beclin 1* in tumorigenesis were extended to other autophagy genes. Expression of the UV irradiation resistance-associated gene (*UVRAG*) protein, which participates in the autophagosome-formation regulatory complex Bcl-2-Beclin1-PI(3)KC3-UVRAG, increased autophagy, reduced proliferation and suppressed tumorigenicity of HCT116 colorectal carcinoma cells in mice.<sup>20</sup> Moreover, lack of *Bif-1*, which also participates in autophagosome formation during starvation, increased spontaneous tumor formation in mice.<sup>21</sup>

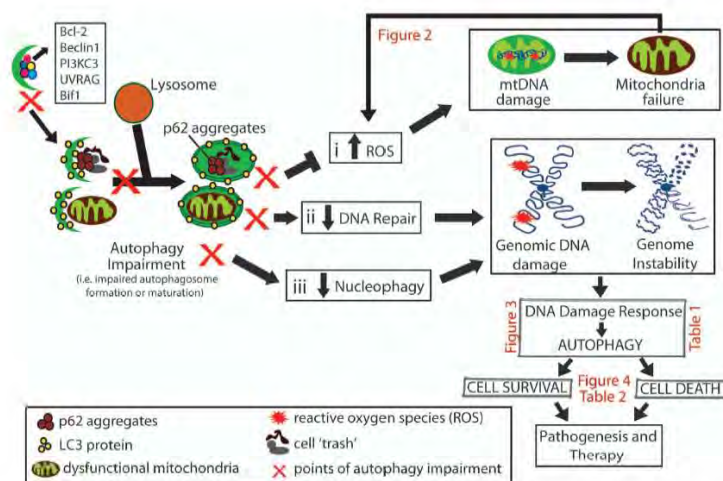
Despite these evidences, it was not until 2007 that Karantza-Wadsworth *et al.* and Mathew *et al.* shed light on the mechanism behind the tumor suppressive function of autophagy. They described that under conditions of metabolic stress, *beclin 1* +/- cells accumulated mitochondria with structural abnormalities, endoplasmic reticulum chaperones and p62/SQSTM1, which target organelles and proteins to the autophagosome. These cells also underwent a marked increase in reactive oxygen species (ROS) generation, causing DNA damage and increased aneuploidy. Moreover, increased resistance to *N*-(phosphonoacetyl)-L-aspartate (PALA) treatment in autophagy-defective cells suggested higher gene amplification rates, evidence that loss of

autophagy increased genomic instability, a driving force behind tumorigenesis.<sup>22–24</sup> Accordingly, a significant association between loss of *beclin 1* and amplification of the *HER2/NEU* oncogene was described in breast carcinoma.<sup>25</sup> Quenching ROS with *N*-acetyl l-cysteine (NAC) delayed the promotion of aneuploidy and improved survival of *beclin 1* +/- cells, revealing that ROS contributes to genomic instability in these cells.<sup>23,24</sup> Interestingly, expression of p62 increased ROS and DNA damage in autophagy-defective cells under metabolic stress, thereby revealing that p62 accumulation may potentiate generation of ROS due to dysfunctional mitochondria.<sup>26</sup> These evidences suggest that autophagy is an important tumor suppressor mechanism involved in different steps of carcinogenesis (Figure 1).

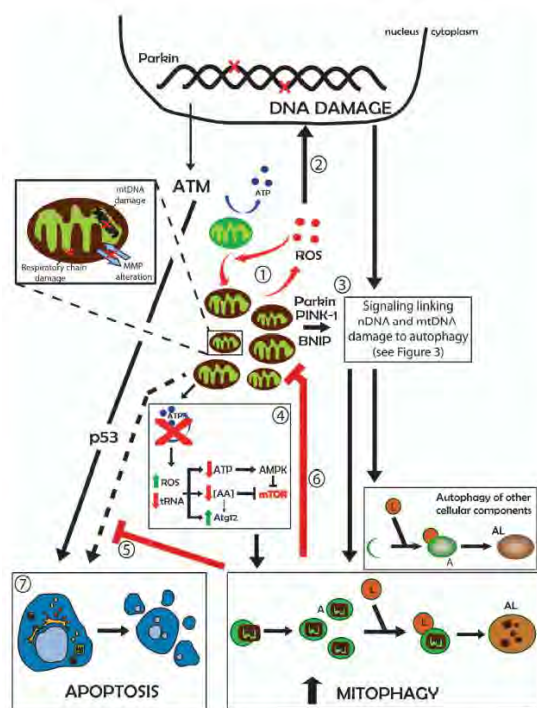
The mitochondria is central to the model linking autophagy, ROS and DNA (Figure 2). Normal mitochondrial activity inevitably generates ROS as by-products, which may cause damage to cell components, including the DNA. Direct ROS-mediated damage to the mitochondria may result in mitochondrial DNA (mtDNA) damage, alterations in the mitochondrial membrane permeability (MMP) and uncoupling of the respiratory chain, resulting in even more ROS generation in a vicious cycle (Figure 1, box i; Figure 2, #1).<sup>27,28</sup> Mitophagy of injured organelles has a central role in impeding this vicious cycle (Figure 2, #6), a process in which the protein parkin has a central role. Parkin translocates from the cytosol to the injured mitochondria, signaling for mitophagy,<sup>29</sup> a process that involves the BCL2/adenovirus E1B 19kd-interacting protein (BNIP3) in cardiac myocytes (Figure 2, #3).<sup>30</sup> Interestingly, mtDNA deletions also trigger autophagy through the increase of oxidized proteins and a reduction of tRNA, leading to reduced levels of ATP and amino acids, triggering AMPK activation and autophagy (Figure 2, #4).<sup>31–33</sup>

Supporting the importance of autophagy for basal mitochondrial physiology and ROS control, deletion of *atg7* in the mouse hematopoietic system resulted in accumulation of mitochondria with high membrane potential, superoxide production, DNA damage and death of hematopoietic stem cells. Atypical myeloid infiltrates were detected in several organs of these animals, showing that loss of autophagy contributes to development of myeloproliferative disorders.<sup>34,35</sup> Further, hepatocytes from *atg5* mosaically deleted mice accumulated swollen mitochondria and oxidatively generated DNA damage, in addition to displaying an increase in glutathione-S-transferase in tumor areas as a result of oxidative stress.<sup>36</sup> Mice lacking MAP1S, which is involved in autophagosome biogenesis, treated with the hepatocarcinogenesis initiator diethylnitrosamine, displayed similar features.<sup>37</sup>

ROS can result in genomic instability (Figure 2, #2) through direct damage to the DNA and/or compromising spindle checkpoint maintenance. In contact with DNA, ROS generates base damage, such as 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8-oxo-G), which, if not repaired, increases the chance of mispairing adenine opposite the lesion.<sup>38</sup> ROS may also lead to breaks in the phosphodiester chain of DNA, including double-strand breaks (DSBs) that are normally detected by  $\gamma$ -H2AX.<sup>39</sup> These extremely toxic and deleterious lesions may cause chromosome alterations or even cell death.



**Figure 1** Overview of the genomic instability caused by autophagy impairment. Autophagy impairment leads to the accumulation of hazardous cellular components, such as dysfunctional mitochondria and toxic protein aggregates, which leads to an increase in ROS production (box i), cell cycle dynamic alterations, DNA damage and, consequently, genomic instability. Autophagy impairment also interferes with DNA repair (box ii) and removal of micronuclei (here referred to as nucleophagy (box iii), contributing to genomic instability. The molecular and cellular mechanisms involved in the role of mitophagy in the context of DNA damage are shown in Figure 2. Pathways that are involved in the crosstalk between DDR and autophagy are summarized in Figure 3 and Table 1, whereas the dual role of DDR-induced autophagy is shown on Figure 4 and Table 2



**Figure 2** Mitochondria quality control by mitophagy in the context of DNA damage. Details of the processes are given in the main text. A, autophagosomes; L, lysosomes; AL, autophagolysosomes; MMP, mitochondrial membrane potential

The induction of DSBs by oxidative stress is most likely a result of the processing of other types of DNA damage, including the repair of clustered lesions, breakage during the fragile blockage of replication forks by the lesions,<sup>40,41</sup> or the handling of DNA–DNA and DNA–protein crosslinks induced by ROS.<sup>42</sup>

A second mechanism by which ROS leads to genomic instability is through the degradation of the anaphase blockers securin and cyclin B1, which impede aneuploidy by ensuring correct segregation of chromosomes during mitosis<sup>43</sup> and in checkpoint-arrested cells, thereby suspending the spindle checkpoint. In agreement with this, budding yeast cells activate autophagy after the induction of DSBs, accompanied by anaphase arrest. This arrest persists even when phosphorylation of the checkpoint kinase Rad53 is reduced, but is overcome when autophagy is blocked or vacuolar proteolysis is inhibited, suggesting that autophagy is fundamental for DNA damage-induced anaphase arrest, thus avoiding improper chromosome segregation.<sup>44</sup> Interestingly, elimination of the mid-body, which is involved in the final stages of cytokinesis, by autophagy was also shown to influence the tumorigenic potential of cancer cells.<sup>45</sup> Indeed, autophagy-defective cells exhibited nuclear morphometric alterations, centrosome abnormalities and increased chromosome number under normal culture conditions.<sup>24</sup>

Altogether, these data show that autophagy has a strong impact on genomic stability, contributing to mitochondria quality control and, as a consequence, modulating ROS levels, ATP production and cell death signaling. These mechanisms are all directly involved in the carcinogenic process and may contribute to the tumor suppressor effect attributed to autophagy.

### The Role of Autophagy in DNA Repair

In addition to mitigating DNA damage by controlling ROS production, autophagy can also influence the dynamics of DNA repair by recycling key proteins involved in the processing of lesions.<sup>46</sup> Alternatively, autophagy may also provide metabolic precursors for the generation of ATP, which is employed in several steps of DNA repair,<sup>47</sup> as well as regulate the supply of dNTPs for DNA synthesis during repair.<sup>48</sup>

By targeting glycogen, lipids and proteins to lysosomes, autophagy guides the breakdown of these macromolecules, thereby producing metabolic precursors that can sustain oxidative phosphorylation and glycolysis.<sup>49,50</sup> In cancer cells from solid undemourished tumors, response to radiotherapy or DNA-damaging chemotherapy triggers ATP production by autophagy, which may have an essential role in DNA repair (Figure 1, box ii). Supporting this hypothesis, the inhibition of autophagy suppressed ATP generation and increased mitotic catastrophe in glioma cells treated with temozolomide (TMZ). Addition of pyruvate rescued ATP levels and prevented mitotic catastrophe, suggesting that autophagy-sustained ATP generation could be employed by mechanisms that promote genomic integrity, such as DNA repair processes.<sup>47</sup> In fact, DNA repair requires ATP at several steps, including DNA unwinding by helicases during nucleotide-excision repair (NER),<sup>51</sup> ATP-dependent chromatin remodeling complexes in DSB repair<sup>52</sup> and PARP activity, which consumes NAD<sup>+</sup> and can cause energy collapse in DNA-damaged cells.<sup>53,54</sup> However, direct evidence to corroborate this hypothesis is still lacking.

Autophagy was also implicated in regulating the dNTP pool levels, which are essential for DNA replication and repair. Upon methyl methane sulfonate (MMS) treatment, yeast trigger autophagy, thereby promoting degradation of ribonucleotide reductase 1 (Rnr1), which associates with other Rnr proteins to regulate the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides. This reduction in Rnr1 levels may favor assembly of the most catalytically active form of Rnr, Rnr1-Rnr3, instead of Rnr1-Rnr1 in the final RNR complex, resulting in optimization of RNR activity and dNTP levels, which in turn could be employed as substrates during DNA repair processes, such as mismatch repair (MMR).<sup>48</sup> It is also interesting to note that imbalanced levels of dNTPs can increase mutagenesis.<sup>55</sup> Thus, it is tempting to speculate that through the degradation of Rnr subunits autophagy may also fight mutagenesis by ensuring a balanced dNTP pool, which is fundamental to avoid stress replication and gene amplification, two characteristics frequently observed in autophagy-deficient cells.<sup>23,24</sup>

Besides dNTP recycling and ATP generation, autophagy also participates in the turnover of key proteins involved in the regulation/processing of genomic lesions. Recently, an intricate relationship between histone deacetylases (HDACS) – which are involved in DNA repair and apoptosis,<sup>56,57</sup> – DSB processing and autophagy was shown in budding yeast.<sup>46,58</sup> Treatment with valproic acid (VPA), an HDAC inhibitor, impaired the activation of Rad53 in response to DSBs. In the VPA-treated cells, Mre11, the first factor recruited to DSB sites, remained bound to the DSB site, accompanied by

reduced levels of Sae2, which is responsible for removing Mre11 from the DSB region, a step required for the progress of lesion repair. In this context, inhibition of autophagy by the serine protease inhibitor PMSF or deletion of *atg1* increased acetylated Sae2 levels, whereas rapamycin, which activates autophagy through mTOR inhibition, decreased it, confirming that autophagy induced by VPA could impair DSB processing through degradation of acetylated Sae2. Moreover, Atg1 inhibition partially rescued sensitivity of an *hda1-rpd3* (HDACs) double mutant (which exhibits low levels of Sae2 as well as impaired DSB resection) to camptothecin. These results suggest that, in one hand, autophagy may be involved in destabilizing key factors, such as the acetylated form of Sae2, impairing DSB repair. On the other hand, clearance of Sae2 by autophagy could also help cells in the control of DSB repair pathway by counteracting extensive DSB resection that may be harmful to cells,<sup>46</sup> demonstrating the complex role of autophagy in the context of DNA damage and repair.

In the same line of thinking, FIP200 (a focal adhesion kinase that participates in autophagy induction)<sup>59</sup> KO MEFs showed persistent nuclear  $\gamma$ -H2AX staining after exposure to ionizing radiation (IR), indicating defective DNA damage repair.<sup>60</sup> Although the initial amount of DNA breaks were similar between *fip200* KO and WT MEFs immediately after IR, the DNA breaks persisted for a longer period in KO cells. Similar results were obtained in response to other DNA damage-inducing agents (camptothecin and etoposide) and also when autophagy was pharmacologically inhibited using 3-methyladenine. Interestingly, silencing p62 in these cells improved DNA repair and cell viability in response to IR and camptothecin. Although accumulation of p62 was shown to increase oxidative stress,<sup>26</sup> the antioxidant NAC did not improve cell viability in response to camptothecin or etoposide, revealing that the mechanism underlying persistent DNA damage in *fip200* KO cells is ROS independent.

These data show that autophagy can influence the resolution of DNA injuries. Although several reports showed that inhibition of autophagy can undermine cells' resistance to chemo- and radiotherapy, only a few studies provide a more careful look into the effect of this approach over DNA repair dynamics.<sup>47</sup> In this sense, spatial and temporal tracking of DNA repair enzymes may provide important clues about the influence of autophagy on the resolution of genomic injuries. In this sense, yeast models can be of great value to create a library of strains in which recruitment of specific DNA repair proteins can be followed. For instance, yeast strains expressing homologous recombination enzymes tagged with fluorescent proteins allowed spatial and temporal localization of these enzymes upon DSB repair activation.<sup>61</sup> Thus, by using such approaches, important clues may be revealed that significantly improve our understanding of this exciting yet obscure role of autophagy in DNA repair.

### Nucleophagy as a Way to Eliminate Injured DNA

Autophagy removal of whole nuclei is not as common as removal of other organelles because it may cause deleterious loss of genetic information. However, in multinucleated cells of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, nucleophagy of entire nuclei contributes to cell maintenance during nutrient

deprivation.<sup>62</sup> Similarly, removal of nuclei from intestinal epithelial cells of *Caenorhabditis elegans* also occurs through autophagy.<sup>63</sup>

Autophagy of nuclear components in eukaryotes, or piecemeal microautophagy of the nucleus (PMN), was initially described in *Saccharomyces cerevisiae*. It is triggered by nutrient deprivation and occurs through the release of nuclear portions into the vacuole,<sup>64</sup> followed by digestion by hydrolases.<sup>65</sup> Nuclear components targeted for PMN include granular nucleolus enriched in pre-ribosomes and nuclear envelope, nuclear pore complexes or spindle pole bodies.<sup>66,67</sup> PMN involves the core Atg proteins involved in macroautophagy and microautophagy, such as Atg4, 5, 7 and 12, as well as macroautophagy-specific proteins such as Atg17, 29 and 31.<sup>64</sup>

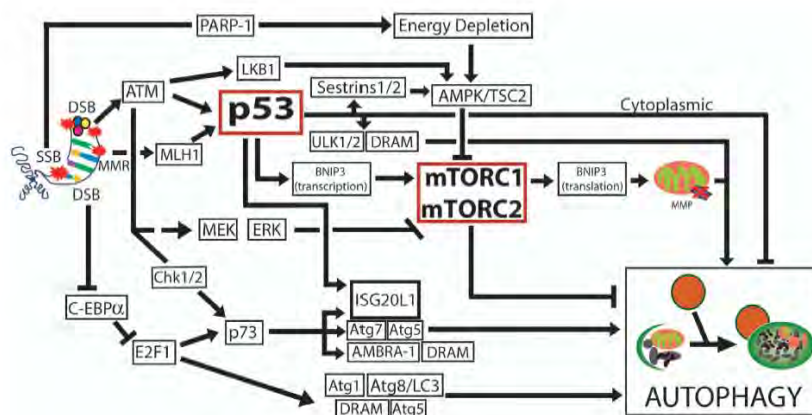
In mammalian cells, autophagy can degrade nuclear components, thereby contributing to the maintenance of nuclear function and integrity.<sup>68</sup> The initial observation of the engulfment of nuclear components points to the presence of perinuclear vacuoles in skeletal and/or cardiac muscle cells from patients or mice with envelopopathies,<sup>68</sup> disorders caused by mutations in nuclear envelope components.<sup>69,70</sup> Mutated cells presented higher levels of autophagic flow and the vacuoles were positive for Atg5, Atg16L and Atg9. Cells presented giant autophagosomes and autophagolysosomes containing LC3 and DNA, with the presence of histone H1 and  $\gamma$ -H2AX, but not the markers of nuclear envelope, lamin A and B, confirming that the DNA contained in autophagosomes was extranuclear and damaged. In this case, the contribution of autophagy to nuclear stability was clear since its inhibition increased the incidence of nuclear abnormalities, accompanied by a reduction in cell viability.<sup>68</sup> Autophagy was also shown to degrade micronuclei generated by treatment with cell cycle blockers. Interestingly, 'autophagic micronuclei' colocalized with p62, besides presenting reduced chromatin content and  $\gamma$ -H2AX foci, a DNA damage marker. However, non-autophagic micronuclei appeared p62-negative, suggesting that the presence of DNA damage directly or indirectly signaled for autophagic engulfment (Figure 1, box iii).<sup>71</sup>

Thus, evolutionarily, the process of nucleophagy may represent a physiological mechanism for the removal of damaged nuclear components and micronuclei, thus contributing to genomic stability. In multinuclear eukaryote cells, it is plausible that autophagy of nuclear components can be triggered under metabolically stressful situations or DNA damage, contributing to genomic stability and cellular homeostasis (Figure 1; box iii).

### Pathways Connecting DDR to Autophagy

DDR comprises an array of processes triggered by DNA lesions that allows cells to cope with these insults, aiming at safeguarding the integrity of the genome and avoiding propagation of mutated cells.<sup>4,17</sup> The kinases ATM and ATR have key roles sensing DNA breaks and activating downstream components of DDR, such as Chk1, Chk2 and p53.<sup>72,73</sup> p53 is an important protein in DDR, inducing the transcription of key genes involved in cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis<sup>74,75</sup> and, more recently described, in autophagy.<sup>76</sup>

Two central components, p53 and mTOR, link DDR to autophagy (Figure 3 and Table 1). p53 can activate autophagy after DNA damage through transcriptional induction of several genes, including damage-regulated autophagy modulator (*dram*), UNC-51-like kinase 1/2, (*ulk1/2*), *sestrin1/2*, *isg20L1* and *bnip3*, among others.<sup>77</sup> p53 targets can regulate autophagy directly, as is the case with the lysosomal proteins DRAM<sup>14</sup> and ULK1/2, which interact with Atg13 and FIP200 to induce autophagy,<sup>13</sup> or indirectly through Sestrin 1 and 2, which activate AMPK and the TSC1/2 complex, leading to inactivation of mTORC1 and autophagy induction.<sup>78</sup> Additionally, ATM was shown to activate AMPK in a p53-independent manner through direct activation of the AMP kinase LKB1.<sup>79</sup> Interestingly, cytoplasmic p53 is able to repress autophagy, and deletion or pharmacological inhibition of p53 induces, rather than inhibits, autophagy. Accordingly, induction of autophagy by starvation requires destruction of cytoplasmic p53,<sup>80,81</sup> thereby revealing a complex role for p53 in the regulation of autophagy.



**Figure 3** Autophagy modulation in response to DNA damage response (DDR). DDR-activated signaling can result in autophagy modulation. The autophagy box represents the central autophagy regulating genes. DSB, double-strand break; SSB, single-strand break; MMR, mismatch repair



Table 1 Proteins that have functions in both DNA damage response and autophagy

Protein	Functions in DNA damage response (DDR)	Functions in autophagy and/or interplay with DDR
p53	Regulates cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis in response to DNA damage. <sup>74,75,77</sup>	Induces autophagy in response to DNA damage through transcription of ULK1, ULK2, DRAM, Sestrins 1/2 and ISG20L1. <sup>13,14,78,88</sup> In the cytoplasm, inhibits autophagy through AMPK inhibition. <sup>81,127</sup>
p73	Promotes apoptosis in response to chemotherapeutic-induced DNA damage. <sup>90</sup> Induces transcription of glycosylases (associated to BER) in response to bile acid-induced DNA damage. <sup>91</sup>	Induces autophagy in a DRAM-independent manner. <sup>89</sup> Binds to genomic sites near to the autophagy-related genes <i>atg5</i> , <i>atg7</i> , <i>ambra1</i> . <sup>128</sup>
UVRAG	Was shown to partially complement sensitivity of XPC transformed cells to UVC. <sup>128</sup> Binds to and activates DNAPK complex, thereby promoting repair of DNA DSB through NHEJ. <sup>124</sup>	Participates in the multiprotein complex Bcl-2-Beclin1-Pi(3)KC3-UVRAG that regulates autophagosome formation. <sup>20</sup>
E2F1	Promotes DNA repair and survival or apoptosis in response to DNA damage. Recruits NER factors to sites of UV-induced DNA damage to augment repair activity. <sup>130,131</sup>	Upregulates transcription of <i>atg1</i> , <i>lc3</i> , <i>atg5</i> and <i>dram</i> . Activates autophagy in response to Etoposide. <sup>87</sup>
Parkin	Was found to associate with PCNA in the nucleus and enhance NER-mediated resolution of UV-induced lesions and BER-mediated resolution of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induced lesion. <sup>115,116</sup>	Recruited to damaged mitochondria (by PINK1) to promote their degradation through mitophagy. <sup>29</sup>
ATM	Senses and responds to DNA double strand breaks, thus regulating cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis. <sup>72,73</sup>	Induces autophagy through of activation of TSC2 and inhibition of mTORC1 in response to ROS. <sup>79</sup> Involved in autophagy activation in response to the N-mustard derivative BO-1051-induced DNA damage. <sup>132</sup>
HDAC	May influence repair of damaged DNA by regulating accessibility of DNA repair enzymes at sites of lesions. Downregulates expression of apoptotic genes. <sup>56,57</sup>	Impairs autophagy activation. <sup>58</sup> Inhibition of HDAC by valproic acid was shown to promote autophagic degradation of acetylated Sae2 and further reduction of DNA double strand break repair in yeast. <sup>46</sup>
PARP	Recruits BER proteins to sites of DNA containing single strand breaks through poly ADP-ribosylation. <sup>133,134</sup>	PARP activation consumes NAD <sup>+</sup> , which results in ATP depletion, AMPK activation and further autophagy induction. <sup>53,54</sup>

The other protein placed in the core of DDR to autophagy signaling, mTOR, is an important repressor of autophagy, and inactivation of the mTOR complex 1 (mTORC1) by AMPK-TSC1/2 has an important role in autophagy induction upon starvation. Interestingly, DDR was also shown to participate in autophagy induced by starvation,<sup>53</sup> which may increase mitochondria-dependent ROS generation, causing DNA damage, PARP-1 activation and ATP depletion. As a consequence, AMPK is activated, thereby inhibiting mTOR and inducing autophagy.<sup>53,54</sup> It is worth noting that autophagy activation was shown to precede phosphorylation of ATM and p53 and activation of DNA repair proteins in response to capsaicin treatment, revealing an intricate pathway in which autophagy acts upstream, and not just as a consequence, of DDR activation.<sup>82</sup>

BNIP3 is a Bcl-2 homologous protein and is activated after conditions of stress such as hypoxia. MMR induced by 6-thioguanine activates autophagy through MLH1, p53 activation and transcription of *bnip3*. Additionally, the TORC1 target p70S6 kinase 1 promotes translation of BNIP3, which induces loss of mitochondrial outer membrane potential and further autophagy activation, possibly through ROS generation, thus triggering mitophagy and preventing apoptosis.<sup>83,84</sup> It is worth noting that in this case mTOR activation, rather than inhibition, activates autophagy.

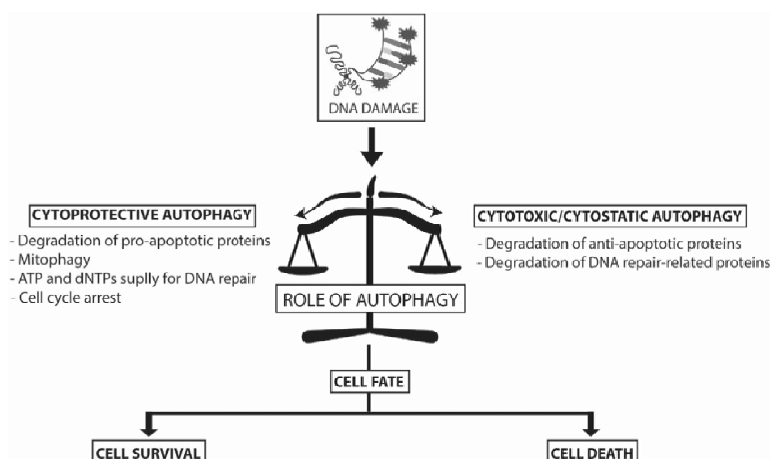
E2F1 transcriptional activity is activated after DNA damage, most likely due to the removal of C-EBP $\alpha$  repression<sup>85,86</sup> and activates autophagy by directly inducing the transcription of *atg1*, *atg6*, *atg5* and *dram*,<sup>87</sup> as well as by

inducing p73, which is a transcriptional activator of *atg5*, *atg7*, *ambra*, *dram* and *isg20l1*.<sup>88,89</sup> Several chemo therapeutic agents induce TA-p73 $\alpha$  and TA-p73 $\beta$  expression,<sup>90</sup> which are sufficient to activate autophagy through direct transcriptional regulation of the above-mentioned genes. Moreover, p73 induces the expression of several DNA repair genes,<sup>91</sup> thus positioning p73 in the interface between DNA repair and autophagy. In strong contrast to p53, p73 is rarely mutated in primary tumors.<sup>92</sup> Thus, it is plausible that p73-induced autophagy has an important role in the resistance of p53-compromised cells, making p73 inhibition a good target for chemotherapy sensitization.

As seen in Figure 3, the signaling that links DNA damage to autophagy is complex and redundant, as is the case for signaling pathways fundamental for life. It is unlikely that all these pathways are activated in a given cell by one type of DNA damage. However, the relative contribution of these pathways to the cellular response to different types of damage is not clear and may be an important part to understand the link between DNA damage and cell fate.

### The Dual role of Autophagy in the Context of DNA Damage

As previously discussed, autophagy can either contribute to or prevent cell death in response to DNA damage (Figure 4). As summarized in Table 2, the majority of studies showed that inhibition of autophagy in cells treated with DNA damaging agents leads to increased cell death, supporting a protective



**Figure 4** Roles for autophagy in regulating cell fate after DNA damage. We propose that after DNA injury, autophagy can influence cell fate, supporting or impairing cell survival. As a cytoprotective mechanism, autophagy may degrade pro-apoptotic proteins and membrane permeabilized mitochondria, enhance ATP and dNTPs generation for DNA repair and also regulate cell cycle arrest. However, autophagy may favor cell death through degradation of anti-apoptotic and DNA repair-related proteins

role for autophagy. We hypothesize that a mechanism based on the severity and/or type of genomic damage could turn on either a pro-survival or pro-death autophagic role. In this scenario, transcription factors such as p53, p73 and E2F1 would have pivotal roles, as they were not only shown to promote DNA repair, cell cycle arrest or apoptosis in response to different degrees of DNA damage, but also to control autophagy.<sup>74,75,91,93</sup>

Thus, we hypothesize that after low doses of DNA damage, autophagy activation by these transcription factors would result in clearance of membrane-permeabilized mitochondria,<sup>94</sup> generation of dNTPs and/or ATP for DNA repair activity,<sup>47,48</sup> degradation of pro-apoptotic proteins such as active caspase 8<sup>95</sup> and elimination of p62, thus preventing p38-hyperactivation.<sup>96</sup> Supporting the role of p53 in autophagy and cell survival, p53 mediates the transcription of parkin,<sup>97</sup> suggesting that p53 could regulate transcription of mitophagy genes in response to genomic damage, thus counterbalancing mitochondrial apoptotic signaling.

Conversely, autophagy can also promote degradation of anti-apoptotic proteins, thus facilitating cell death. Autophagy-mediated degradation of the inhibitor of apoptosis *dBruce* during late oogenesis in *Drosophila melanogaster*<sup>98</sup> and degradation of catalase in apoptosis-compromised cells resulting in increased ROS and oxidatively generated damage<sup>99</sup> reveal how autophagy can have an impact on cell death. As autophagy was also shown to promote degradation of acetylated Sae2 in VPA-treated yeast cells, thereby influencing, in an intricate manner, the dynamics of DNA DSB repair, it is possible that autophagy activation could contribute to perseverance of DNA damage and further enhancement of apoptotic signaling in mammalian cells by controlling turnover of certain DNA repair-related enzymes.<sup>46</sup> In this scenario, autophagy was shown to degrade OGG1, an enzyme that participates in 8-oxoG base-excision repair, in starved myocytes.<sup>100</sup>

Thus, it is tempting to speculate that, the intensity by which autophagy is activated as well as the targets to be degraded can dictate whether it is going to cooperate with or protect from cell death induced by DNA damage (Figure 4). This dual role of autophagy in cell death can be exemplified by the modulation of autophagy by the MAPK pathway. While transient or moderate activity of MEK/ERK results in mTOR inhibition, weakly beclin 1 increase and protective autophagy, sustained MEK/ERK activation results in inhibition of mTORC1 and mTORC2, stronger beclin 1 activation and toxic autophagy.<sup>101</sup> Thus, high levels of DNA damage could induce stronger mTORC1 inhibition, followed by stronger beclin 1 activation, thus resulting in levels of autophagy that contribute to cell death. In fact, overexpression of beclin 1, *per se*, is able to increase basal as well as induced autophagy in both normal and cancerous tissue and cells.<sup>17,102,103</sup>

Thus, understanding the crosstalk between DDR and autophagy may be essential to understand how autophagy has either a positive or negative role in cell death induction after activation of DDR-induced autophagy. Recent advances in the field of transcription factors and effector proteins are addressing these questions and may aid in the understanding of how cells define their fate in this context.<sup>104,105</sup>

#### Autophagy-DNA damage crosstalk in neurodegeneration, cancer and aging

All of the aforementioned findings raised a natural interest in the pharmacological modulation of autophagy, which could have a significant impact on mitigating genomic damage. This is of particular interest for human syndromes that arise from genetic deficiency in genes related to DNA repair, such as the premature aging disorder Cockayne Syndrome (CS).<sup>106</sup> In fact, accumulation of dysfunctional mitochondria, mtDNA mutations and oxidatively generated damage were observed in CS type B (CSB) fibroblasts,<sup>107,108</sup> suggesting that the

Table 2 Main factors regulating autophagy and role of autophagy in cell fate triggered by genotoxic agents

Genotoxic agent	Agent class	Main DNA repair pathways/enzymes involved <sup>105</sup>	Main factors regulating autophagy induction after DNA damage	Cell type	Autophagy inhibition employed	Effect of autophagy/inhibition	Ref.
ActinomycinD	Topoisomerase and transcription inhibitor	ND	p53, DRAM	RKO Colon Carcinoma	DRAM siRNA, ATGs siRNA	Increased clonogenic survival	14
Camptothecin	Topoisomerase inhibitor	HR, NHEJ	p53, ULK1/ULK2	U2OS Osteosarcoma	ATG13 siRNA	Increased clonogenic survival	15
Doxorubicin	Topoisomerase inhibitor	HR, NER, NHEJ	PARP-1	BT3 MEFs	Beclin 1 and ATG5 siRNA, 3-MA, CQ	Increased death (Trypan Blue)	54
6-Thioguanine	Nucleoside analog	MMR, BER	MLH1, MSH2, p53, mTOR, BNIP3	HCT116 colon carcinoma and HEC59 endometrial cancer	ATG5 siRNA	Increased apoptosis	106
EO-1051	Alkylating agent	ND	ATM	H4227/VGH Malignant Lymphomas	Bathiomycin A1, beclin-siRNA	Reduced Viability (MTT)	102
Fluorouracil	Alkylating agent	MMR, BER, MGMT	ATM, TSC2, mTORC1	LN229 and U87 gliomas	3-MA	Increased apoptosis	107
Hydroxyurea	Alkylating agent	MMR, BER, MGMT	ND	Lymphomas	CQ, ATG5 siRNA	Reduced cell number	108
Osipatin	Alkylating-like agent	MMR, NER, HR, NHEJ	ATM	H4227/VGH Malignant Lymphomas	Beclin 1 siRNA	Reduced viability (MTT)	109
5-methoxyflavone	Methoxylated flavone	ND	MEK, AMPK, ULK1	HCT116 Colon Carcinoma MEFs	3-MA, bathiomycin A1, ATG5 KO 3MA	Reduced clonogenic survival, Increased apoptosis	104
UVB	Electromagnetic radiation	NER					96

regulation of autophagy may have an impact on CS pathogenesis. Indeed, the induction of autophagy reduced mitochondrial loading and mitochondrial membrane potential in CSB cells, revealing that pharmacological modulation of this pathway is a promising approach.<sup>109</sup> Moreover, autophagy also has a role in stem cells maintenance,<sup>110</sup> suggesting that this pathway may also fight accelerated aging by maintaining the health of the stem cell population, avoiding loss of regenerative potential.<sup>111</sup>

Accumulation of oxidatively generated damage has been implicated in several neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's diseases.<sup>112,113</sup> Data point to autophagy as an important factor in the context of both the pathogenesis and, consequently, therapy of these pathologies. It has become clear that parkin is necessary for p62 localization to damaged mitochondria and its consequent elimination through beclin-dependent autophagy.<sup>29,114</sup> Deletion of *parkin* increases ROS generation due to accumulation of dysfunctional organelles, resulting in mtDNA and nDNA damage, which is the basis for parkin deficiency-associated Parkinson's disease.<sup>115,116</sup> In this sense, induction of autophagy has given promising results in mouse models of Alzheimer's disease<sup>117</sup> and other neurodegenerative diseases.<sup>118</sup> Further, the increased genomic instability observed in *parkin*-deleted cells could also be explained by the observation that parkin translocates from the cytosol to the nucleus where it participates in DDR after DNA damage.<sup>115,116</sup> Therefore, the parkin protein is an important factor in both DDR and autophagic removal of injured mitochondria.

In cancer, heterozygous disruption of *beclin 1* compromised autophagy activation and resulted in increased cellular proliferation and increased spontaneous as well as induced tumor formation. Contrary to the normal genetic behavior of classical tumor suppressors, the remaining wild-type allele was neither mutated nor silenced in the formed tumors.<sup>18,19</sup> Accordingly, 40–75% of cases of human sporadic breast, ovarian and prostate cancer had monoallelic deletion of *beclin 1*.<sup>16</sup> Further, genes involved in autophagy are monoallelically inactivated in human cancers or occur in genes whose deletion only partially reduces autophagy. Moreover, frameshift mutations were identified in *UVRAG*, *atg2B*, *atg5* and *atg9B* in colorectal and in gastric carcinomas with microsatellite instability (MSI), but not in DNA from normal tissues of the same patients,<sup>119–121</sup> although the effects of these mutations on autophagic flux were not determined.

This genetic evidence points to the scenario in which reduced levels of autophagy favor tumor development, whereas the complete absence of autophagy is anti-tumoral.<sup>122</sup> However, it is important to keep in mind that several members of the classical autophagic pathway have autophagy-independent roles. For instance, ATG4C KO mice did not present altered basal or starvation-induced autophagy in several tissues, but an increased methylcholanthren-induced fibrosarcoma formation.<sup>123</sup> Similarly, MSI-positive colon cancer cells with monoallelic deletions of *UVRAG* or *UVRAG-KD* HEK cells did not show reduced autophagy. Indeed, *UVRAG* participates in an autophagy-independent manner in preventing centrosome overduplication and chromosome missegregation during anaphase<sup>124</sup> as well as

in endocytic trafficking of EGFR, whose accumulation may enhance growth factor receptor signaling, thus supporting tumor growth.<sup>125</sup> Therefore, an autophagy-centric interpretation must always bear in mind these other functions described for the 'autophagy' genes.<sup>126</sup>

### Concluding Remarks

The crosstalk between autophagy and DDR, as well as its role in defining cell fate, is a hot topic that is just beginning to be explored, as can be evidenced by the new and fast-growing body of work related to this theme. Understanding this complex and intricate relationship will have profound impacts on several fields of medical interest, such as cancer, aging and neurodegeneration. Additionally, the majority of studies mentioned in this review focus on cell biology and the roles played by autophagy in response to DNA damage in DDR and survival of the cell. Much more difficult and therefore less clear is the impact of the link between DNA damage and autophagy on the physiology of the whole organism, mainly on aging and cancer, in which elimination of cellular components by high levels of mitophagy or nucleophagy may, in fact, be very beneficial. Notwithstanding, the current evidence linking DNA damage to autophagy indicates that both are involved in the normal physiology as well as in pathological processes and that modulation of the pathways linking DDR to autophagy has to be considered in therapeutic interventions for several diseases.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

- Ljungman M. Activation of DNA damage signaling. *Mutat Res* 2005; **577**: 203–216.
- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 2012; **481**: 287–294.
- Lenz G. Endogenous anticancer mechanisms (EACMs). *Front Biosci (Schol Ed)* 2012; **4**: 1017–1030.
- Ljungman M. The DNA damage response—repair or despair? *Environ Mol Mutagen* 2010; **51**: 879–889.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; **27**: 107–132.
- Shanware NP, Bray K, Abraham RT. The PI3K, metabolic, and autophagy networks: interactive partners in cellular health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; **53**: 89–106.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 132–141.
- Corsetto E, Djorbi N, Mari M, Nebout M, Fiorini C, Fenichel P et al. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* 2007; **3**: 57–60.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011; **333**: 1109–1112.
- Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; **40**: 280–293.
- Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011; **13**: 495–504.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 2007; **128**: 931–946.
- Gao W, Shen Z, Shang L, Wang X. Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1598–1607.
- Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR et al. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; **126**: 121–134.
- Schwarze PE, Seglen PO. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced *in vitro* survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res* 1985; **157**: 15–26.
- Aila VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; **59**: 59–65.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672–676.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Fan Y, Hoshino H, Cox A et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1809–1820.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 15077–15082.
- Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Cnaanani D, Oh BH et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 688–699.
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cueling HD, Sun M, Saito Y et al. Bif-1 interacts with Beclin-1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1142–1151.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646–674.
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007; **21**: 1621–1635.
- Mathew R, Kötting S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; **21**: 1367–1381.
- Negri T, Tarantino E, Orsenigo M, Reid JF, Gariboldi M, Zambetti M et al. Chromosome band 17q21 in breast cancer: significant association between beclin 1 loss and HER2/NEU amplification. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; **49**: 901–909.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; **137**: 1062–1075.
- Lenaz G. Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* 2012; **942**: 93–136.
- Lenaz G, Bovina C, D'Aurelia M, Fato R, Formigoni G, Genova ML et al. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **959**: 199–213.
- Gessler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 119–131.
- Lee Y, Lee HY, Hanna RA, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy by Brip3 involves Dcp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **301**: H1924–H1931.
- Prigione A, Cortopassi G. Mitochondrial DNA deletions and chloramphenicol treatment stimulate the autophagic transcript ATG12. *Autophagy* 2007; **3**: 377–390.
- Alemi M, Prigione A, Wong A, Schoenfeld R, DiMauro S, Hirano M et al. Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript. *Free Radic Biol Med* 2007; **42**: 32–43.
- Prigione A, Cortopassi G. Mitochondrial DNA deletions induce the adenosine monophosphate-activated protein kinase energy stress pathway and result in decreased secretion of some proteins. *Aging Cell* 2007; **6**: 619–630.
- Mortensen M, Solteux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* 2011; **208**: 455–467.
- Mortensen M, Watson AS, Simon AK. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy* 2011; **7**: 1069–1070.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; **25**: 795–800.
- Xie R, Wang F, McKeathan WL, Liu L. Autophagy enhanced by microtubule- and mitochondrion-associated MAP1S suppresses genome instability and hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2011; **71**: 7537–7545.
- van Loon B, Markkanen E, Hubacher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)* 2010; **9**: 604–616.
- Kirner A, Wu W, Staudt C, Illakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: 5678–5694.
- Reinert R, Volkmer B, Henning S, Breitbart EW, Greslich KO, Cardoso MC et al. UVA-induced DNA double-strand breaks result from the repair of clustered oxidative DNA damages. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 10263–10273.
- Eccles LJ, O'Neill P, Lomax ME. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? *Mutat Res* 2011; **711**: 134–141.
- Cadet J, Ravanet JL, TavernaPorro M, Menoni H, Angelov D. Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer Lett* 2012; **327**: 5–15.
- D'Angiolella V, Santaripa C, Grieco D. Oxidative stress overrides the spindle checkpoint. *Cell Cycle* 2007; **6**: 576–579.
- Dotiwala F, Eapen VV, Harrison JC, Attek-Eden A, Ranade V, Yoshida S et al. DNA damage checkpoint triggers autophagy to regulate the initiation of anaphase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E41–E49.

45. Kuo TC, Chen CT, Baron D, Onder TT, Loewer S, Almeida S *et al*. Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat Cell Biol* 2011; **13**: 1214–1223.
46. Robert T, Vanoli F, Chiolo I, Shubassi G, Bemstein KA, Rothstein R *et al*. HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 2011; **471**: 74–79.
47. 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.
48. Dyavaiah M, Rooney JP, Chittur SV, Lin Q, Begley TJ. Autophagy-dependent regulation of the DNA damage response protein ribonucleotide reductase 1. *Mol Cancer Res* 2011; **9**: 462–475.
49. Ferraro E, Pulicati A, Cencioni MT, Cozzolino M, Navoni F, di Marino S *et al*. Apoptosome-deficient cells lose cytochrome c through proteasomal degradation but survive by autophagy-dependent glycolysis. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 3576–3588.
50. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010; **330**: 1344–1348.
51. de Laat WL, Jaspers NG, Hoelijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; **13**: 768–785.
52. Bao Y, Shen X. Chromatin remodeling in DNA double-strand break repair. *Curr Opin Genet Dev* 2007; **17**: 126–131.
53. Rodriguez-Vargas JM, Ruiz-Magana MJ, Ruiz-Ruiz C, Majuelos-Melguizo J, Peralta-Leal A, Rodriguez MI *et al*. ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy. *Cell Res* 2012; **22**: 1181–1198.
54. Munoz-Gomez JA, Rodriguez-Vargas JM, Quiles-Perez R, Aguilar-Quesada R, Martin-Oliva D, de Murcia G *et al*. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 2009; **5**: 61–74.
55. Kumar D, Abdulovic AL, Viberg J, Nilsson AK, Kunkel TA, Chabas A. Mechanisms of mutagenesis in vivo due to imbalanced dNTP pools. *Nucleic Acids Res* 2011; **39**: 1360–1371.
56. Henderson C, Mizzaoui M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C. Role of caspases, Bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Biol Chem* 2003; **278**: 12579–12589.
57. Kruszewski M, Szumił I. Sirtuins (histone deacetylases III) in the cellular response to DNA damage—facts and hypotheses. *DNA Repair (Amst)* 2005; **4**: 1306–1313.
58. True O, Mathias P. Interplay between histone deacetylases and autophagy—from cancer therapy to neurodegeneration. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**: 78–84.
59. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL *et al*. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 2008; **181**: 497–510.
60. Bae H, Guan JL. Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents. *Mol Cancer Res* 2011; **9**: 1232–1241.
61. Moore DM, Karlin J, Gonzalez-Barrera S, Mardiros A, Lisby M, Doughty A *et al*. Rad10 exhibits lesion-dependent genetic requirements for recruitment to DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 6429–6438.
62. Shoji JY, Kikuma T, Arioka M, Kitamoto K. Macroautophagy-mediated degradation of whole nuclei in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *PLoS One* 2010; **5**: e15650.
63. McGee MD, Weber D, Day N, Vitelli C, Crippen D, Herndon LA *et al*. Loss of intestinal nuclei and intestinal integrity in aging *C. elegans*. *Aging Cell* 2011; **10**: 699–710.
64. Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen EL *et al*. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 4492–4505.
65. Kvam E, Gable K, Dunn TM, Goldfarb DS. Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: a role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 3987–3998.
66. Kraft C, Reggiori F, Peter M. Selective types of autophagy in yeast. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 1404–1412.
67. Millen JI, Krick R, Prick T, Thumm M, Goldfarb DS. Measuring piecemeal microautophagy of the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 2009; **5**: 75–81.
68. Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I *et al*. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy* 2009; **5**: 795–804.
69. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merini L *et al*. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999; **21**: 285–288.
70. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L *et al*. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003; **423**: 293–298.
71. Rello-Varona S, Lissa D, Shen S, Niso-Santano M, Senovilla L, Marino G *et al*. Autophagic removal of micronuclei. *Cell Cycle* 2012; **11**: 170–176.
72. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 2010; **108**: 73–112.
73. Tichy A, Vavrova J, Pejchal J, Rezacova M. Ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) as a central regulator of radiation-induced DNA damage response. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2010; **53**: 13–17.
74. Batista LF, Roos WP, Kaina B, Menck CF. p53 mutant human glioma cells are sensitive to UV-C-induced apoptosis due to impaired cyclobutane pyrimidine dimer removal. *Mol Cancer Res* 2009; **7**: 237–246.
75. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 2009; **137**: 413–431.
76. Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M *et al*. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 2008; **4**: 810–814.
77. Ryan KM. p53 and autophagy in cancer: guardian of the genome meets guardian of the proteome. *Eur J Cancer* 2011; **47**: 44–50.
78. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 2008; **134**: 451–460.
79. Alexander A, Cai SL, Kim J, Nanez A, Sahin M, MacLean KH *et al*. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 4153–4158.
80. Morselli E, Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A *et al*. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 2008; **7**: 3056–3061.
81. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M *et al*. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 676–687.
82. Yoon JH, Ahn SG, Lee BH, Jung SH, Oh SH. Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1. *Biochem Pharmacol* 2012; **83**: 747–757.
83. Zeng X, Kinsella TJ. BNI3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing. *Cell Res* 2010; **20**: 665–675.
84. Zeng X, Kinsella TJ. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res* 2008; **68**: 2384–2390.
85. Guo R, Chen J, Zhu F, Biswas AK, Berton TR, Mitchell DL *et al*. E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2001; **276**: 19308–19315.
86. Marabese M, Vikhanskaya F, Rainelli C, Sakai T, Broggin M. DNA damage induces transcriptional activation of p73 by removing C-EBPalpha repression on E2F1. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 6624–6632.
87. Polager S, Ofir M, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 2008; **27**: 4860–4864.
88. Eby KG, Rosenbluth JM, Mays DJ, Marshall CB, Barton CE, Sinha S *et al*. ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Mol Cancer* 2010; **9**: 95.
89. Crighton D, O'Prey J, Bell HS, Ryan KM. p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 1071–1079.
90. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG Jr. Chemoresensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 2003; **3**: 403–410.
91. Zaika E, Wei J, Yin D, Andl C, Moll U, El-Rifai W *et al*. p73 protein regulates DNA damage repair. *FASEB J* 2011; **25**: 4406–4414.
92. Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 1999; **6**: 1154–1161.
93. Guo R, Chen J, Zhu F, Biswas AK, Berton TR, Mitchell DL *et al*. E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J Biol Chem* 2010; **285**: 19308–19315.
94. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW *et al*. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; **90**: 1383–1435.
95. Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA, Rabinowich H. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 2010; **6**: 891–900.
96. Qiang L, Wu C, Ming M, Viollet B, He YY. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem* 2013; **288**: 1603–1611.
97. Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ *et al*. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16259–16264.
98. Nezis IP, Shrivage BV, Sagona AP, Lemark T, Bjorkoy G, Johansen T *et al*. Autophagic degradation of dBruce controls DNA fragmentation in nurse cells during late *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J Cell Biol* 2010; **190**: 523–531.
99. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E *et al*. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 4952–4957.
100. Siggins L, Figg N, Bennett M, Foo R. Nutrient deprivation regulates DNA damage repair in cardiomyocytes via loss of the base-excision repair enzyme OGG1. *FASEB J* 2012; **26**: 2117–2124.
101. Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D *et al*. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 2009; **284**: 21412–21424.
102. Wang ZH, Xu L, Duan ZL, Zeng LQ, Yan NH, Peng ZL. Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells. *Gynecol Oncol* 2007; **107**: 107–113.
103. Nascimento-Ferreira I, Santos-Ferreira T, Sousa-Ferreira L, Auregan G, Onofre I, Alves S *et al*. Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* 2011; **134**(Pt 5): 1400–1415.

104. Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 2011; **711**: 158–166.
105. Hughson LR, Poon VI, Spowart JE, Lum JJ. Implications of therapy-induced selective autophagy on tumor metabolism and survival. *Int J Cell Biol* 2012; **2012**: 872091.
106. Stevnsner T, Muftuoglu M, Aamann MD, Bohr VA. The role of Cockayne Syndrome group B (CSB) protein in base excision repair and aging. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 441–448.
107. Stevnsner T, Nyaga S, de Souza-Pinto NC, van der Horst GT, Gorgels TG, Hogue BA *et al*. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* 2002; **21**: 8675–8682.
108. Aamann MD, Sorensen MM, Hvitby C, Berquist BR, Muftuoglu M, Tian J *et al*. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *FASEB J* 2010; **24**: 2334–2346.
109. Scheibye-Knudsen M, Ramamoorthy M, Sykora P, Maynard S, Lin PC, Minor RK *et al*. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *J Exp Med* 2012; **209**: 855–869.
110. Vessoni AT, Muotri AR, Okamoto OK. Autophagy in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells Dev* 2012; **21**: 513–520.
111. Garcia-Prat L, Sousa-Victor P, Munoz-Canoves P. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *FEBS J* 2013; e-pub ahead of print 2 March 2013; doi:10.1111/febs.12221.
112. Filipcik P, Cente M, Ferencik M, Hulin I, Novak M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Bratisl Lek Listy* 2006; **107**: 384–394.
113. Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, Sakumi K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2007; **85**: 919–934.
114. Khandelwal PJ, Herman AM, Hoe HS, Rebeck GW, Moussa CE. Parkin mediates beclin-dependent autophagic clearance of defective mitochondria and ubiquitinated Abeta in AD models. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 2091–2102.
115. Kao SY. DNA damage induces nuclear translocation of parkin. *J Biomed Sci* 2009; **16**: 67.
116. Kao SY. Regulation of DNA repair by parkin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **382**: 321–325.
117. Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. *PLoS One* 2011; **6**: e25416.
118. Taylor R, Goldman SJ. Mitophagy and disease: new avenues for pharmacological intervention. *Curr Pharm Des* 17: 2056–2073.
119. Ionov Y, Nowak N, Perucho M, Markowitz S, Cowell JK. Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer cells with microsatellite instability. *Oncogene* 2004; **23**: 639–645.
120. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS *et al*. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* 2009; **217**: 702–706.
121. Kim MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH, Yoo NJ. Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol* 2008; **39**: 1059–1063.
122. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R *et al*. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 87–93.
123. Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, Lopez-Otin C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007; **282**: 18573–18583.
124. Zhao Z, Oh S, Li D, Ni D, Pirooz SD, Lee JH *et al*. A dual role for UVRAG in maintaining chromosomal stability independent of autophagy. *Dev Cell* 2012; **22**: 1001–1016.
125. Knaevelsrud H, Ahlquist T, Merok MA, Nesbakken A, Stenmark H, Lothe RA *et al*. UVRAG mutations associated with microsatellite unstable colon cancer do not affect autophagy. *Autophagy* 2010; **6**: 863–870.
126. Ni Chonghaile T, Letai A. Who put the "A" in Atg12: autophagy or apoptosis? *Mol Cell* 2011; **44**: 844–845.
127. Green DR, Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 2009; **458**: 1127–1130.
128. Rosenbluth JM, Pieterpol JA. mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73. *Autophagy* 2009; **5**: 114–116.
129. Teitz T, Penner M, Eli D, Stark M, Bakhanashvili M, Naiman T *et al*. Isolation by polymerase chain reaction of a cDNA whose product partially complements the ultraviolet sensitivity of xeroderma pigmentosum group C cells. *Gene* 1990; **87**: 295–298.
130. Biswas AK, Johnson DG. Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer Res* 2012; **72**: 13–17.
131. Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 1071–1079.
132. Chen LH, Loong CC, Su TL, Lee YJ, Chu PM, Tsai ML *et al*. Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 2011; **81**: 594–605.
133. Leung M, Rosen D, Fields S, Cesano A, Budman DR. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition: preclinical and clinical development of synthetic lethality. *Mol Med* 2011; **17**: 854–862.
134. Javle M, Curtin NJ. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation. *Br J Cancer* 2011; **105**: 1114–1122.
135. Casorelli I, Bossa C, Bignami M. DNA damage and repair in human cancer: molecular mechanisms and contribution to therapy-related leukemias. *Int J Environ Res Public Health* 2012; **9**: 2636–2657.
136. Zeng X, Yan T, Schupp JE, Seo Y, Kinsella TJ. DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 1315–1321.
137. Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M *et al*. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* 2013; **8**: e55665.
138. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI *et al*. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007; **117**: 326–336.
139. Shin SY, Hyun J, Yu JR, Lim Y, Lee YH. 5-Methoxyflavanone induces cell cycle arrest at the G2/M phase, apoptosis and autophagy in HCT116 human colon cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; **254**: 288–298.

### CAPÍTULO III

## *Single cell analysis challenges the connection of autophagy and senescence induced by DNA damage*

### APRESENTAÇÃO

Ao contrário da interação entre autofagia e apoptose, a qual já foi demonstrada em inúmeros modelos celulares e animais, a relação dos mecanismos de autofagia e senescência permanece pouco conhecida. De fato, nenhum trabalho mostrou de maneira integrada e completa a relação entre estes mecanismos, e até o momento os resultados existentes são inconclusivos.

Durante o mestrado, investiguei a indução de autofagia e senescência por TMZ em células de glioma. Dessa forma, meu projeto central de doutorado teve como objetivo investigar a interação entre estes mecanismos, tal qual apresentado no Objetivo Geral 2 da presente tese. Para tal, nos apropriamos de um modelo de indução de senescência e autofagia induzida por TMZ em células de glioma expressando estavelmente o marcador de autofagia GFP-LC3.

Através de análises a nível populacional e do acompanhamento de células únicas, nós investigamos os mecanismos por trás dessa interação. O presente capítulo descreve os principais resultados dessa investigação, e o trabalho foi recentemente submetido ao periódico *Autophagy*.

## SINGLE CELL ANALYSIS CHALLENGES THE CONNECTION OF AUTOPHAGY AND SENESCENCE INDUCED BY DNA DAMAGE

Eduardo Cremonese Filippi-Chiela<sup>1</sup>; Mardja Manssur Bueno e Silva<sup>1</sup>;  
Marcos Paulo Thomé<sup>1</sup>; Guido Lenz<sup>1,2\*</sup>

*1 – Department of Biophysics, 2 – Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

*\*corresponding author: lenz@ufrgs.br*



**ABSTRACT**

Autophagy and senescence have been described as central in cell biology, but the interplay between these mechanisms remains obscure. Using a therapeutically relevant model of DNA damage-induced senescence in human glioma cells, we show that acute treatment with Temozolomide induced DNA damage, a transitory activation of AMPK/ULK1 and p38 as well as a sustained Akt/mTOR inhibition. This produced a transient induction of autophagy, which was followed by senescence. However, at the single cell level this coordinated transition was not observed, with autophagy and senescence triggered in a very heterogeneous manner. Indeed, at a population level autophagy was highly correlated negatively with senescence markers, while in single cells this correlation did not exist. Inhibition of autophagy triggered apoptosis and decreased senescence, while its activation increased Temozolomide-induced senescence, showing that DNA damage-induced autophagy acts by suppressing apoptosis.

## INTRODUCTION

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a physiological catabolic process involved in the maintenance of the quality of cellular components and energetic homeostasis. Autophagy is directly coordinated by Atg genes and indirectly modulated by several signaling pathways involved in cell metabolism and growth, such as the positive regulators AMPK and nuclear p53, as well as the negative regulators PI3k/Akt and MAPK pathways. These pathways have, as a common target in autophagy, the mammalian Target of Rapamycin (mTOR) protein, which directly controls initial autophagy steps (Parzych and Klionsky, 2014; Yang and Klionsky, 2009).

Autophagy is involved in several processes, such as aging and cancer (Wu et al., 2012). It seems to contribute to the control of lifespan from plants (Minina et al., 2013) to mammals (Pyo et al., 2013), which is corroborated by the observation that several longevity pathways, such as Insulin Growth Factor 1, sirtuins and FoxO modulate autophagy (Hansen et al., 2008; Morselli et al., 2009; Toth et al., 2008). In cancer, autophagy is thought to act as a tumor suppressor mechanism during tumor initiation by contributing to the maintenance of genomic integrity and elimination of pro-carcinogens (Duran et al., 2008; Inami et al., 2011; Takamura et al., 2011). Accordingly, genetic alterations on autophagic genes such as beclin1 and Atg7 have been associated with higher tumor incidence, susceptibility and resistance to therapies (Qu et al., 2003; Takamura et al., 2011; Xue et al., 2010), and several tumor suppressor genes also induce autophagy, such as PTEN, TSC1/2 and LKB1 (Maiuri et al., 2009). On the other hand, in established solid tumors, autophagy may contribute to tumor adaptation and survival during metabolic stress, as well as favoring cell resistance to therapy (Yang et al., 2011). Autophagy is triggered by several therapeutic interventions, including those inducing DNA damage response (DDR) (Filippi-Chiela et al., 2013b), and interferes on cancer cells fate in two ways, either favoring cell survival or contributing to cell death (Maes et al., 2013). Increasingly, it has been shown that autophagy exerts its effect through modulation of apoptosis, cell cycle and senescence (Filippi-Chiela et al., 2011; Vicencio et al., 2008). Autophagy normally blocks apoptosis (Marino et al., 2014), but the role of autophagy in senescence remains unclear, despite these mechanisms playing a central role in aging and carcinogenesis (Gewirtz, 2009; Gewirtz, 2014).

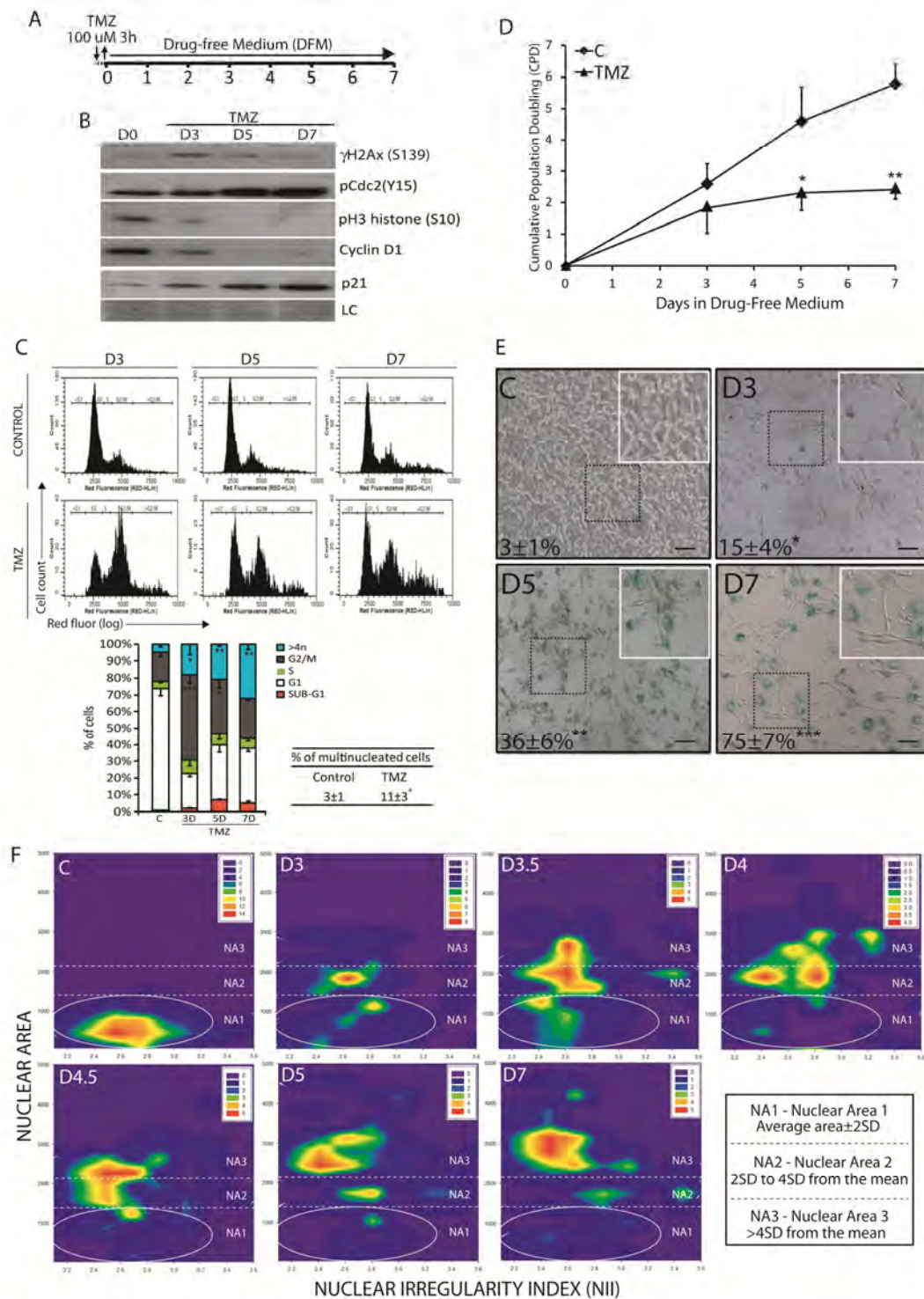
Senescence is a state of irreversible cell growth arrest and metabolic activity maintenance. It acts as an endogenous antitumor mechanism by avoiding the proliferation of transformed, pre-tumor cells (Collado et al., 2005; Lenz, 2011; Rodier and Campisi, 2011). On the other hand, it has been associated to tumor resistance in apoptosis-resistant cancer cells, since senescent cells remain metabolically active and can affect the growth of surrounding cells through paracrine signaling (Coppe et al., 2010; Coppe et al., 2006; Laberge et al., 2012). Senescence can be triggered by cell aging, oncogenic activation or in response to drugs that affect DNA and mitochondria, among other cell components (Rodier and Campisi, 2011; Vargas et al., 2012). Senescence establishment is driven by proteins that control cell cycle and stress response, such as p53, p21, p27 and INK4/Arf proteins (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Rodier and Campisi, 2011; Vargas et al., 2012).

The studies that deal with the role of autophagy on senescence *"did not present an overview of the temporal induction of autophagy and senescence"*, as recently stated (Gewirtz, 2014). To shed light on these issues, we used a model of DNA damage-induced autophagy and senescence by treating glioma cells with the alkylating agent Temozolomide (TMZ), which is the main chemotherapeutic agent used in gliomas (Filippi-Chiela et al., 2013a; Kanzawa et al., 2004; Knizhnik et al., 2013). We found that acute DNA damage triggered a transient autophagy, followed by senescence induction. Although at a population level autophagy and senescence strongly correlated, no direct interdependence was observed in single cells. Additionally, inhibition of autophagy triggered apoptosis and reduced senescence.

## RESULTS

### Acute treatment with TMZ induced long-term senescence

U87 glioma cells stably expressing the autophagy marker GFP-LC3 (hereafter referred as U87-LC3 cells) were treated with 100  $\mu$ M of TMZ for 3 h, followed by replating in Drug-Free Medium (DFM) (Fig. 1 A).  $\gamma$ H2AX(S139) phosphorylation, an indicator of DDR activation, was transiently increased, peaking at day 3 (D3), accompanied by a gradual increase in the phosphorylated form of Cdc2 (Y15) - which inhibits the activity of the CyclinB/CDK1 complex at G2/M - and an induction of the CDK inhibitor p21. This signaling is indicative of an activation of the G2/M checkpoint, which is corroborated by the decrease of both H3 histone S10 phosphorylation and cyclin D1 levels (Fig. 1 B). As expected, TMZ produced an accumulation of cells at G2/M, peaking at D3, followed by a gradual increase in the hyperdiploid and multinucleated cells (Fig. 1 C). Cumulative Population Doubling (CPD) indicated that acute TMZ treatment led to a stabilization of the cell number, suggesting permanent cell growth arrest (Fig. 1 D). CPD profile suggested senescence entry, corroborated by the increase of cells positively marked with the Senescent Associated- $\beta$ -Galactosidase (SA- $\beta$ -Gal+ cells) (Fig. 1E) and an increase in the percentage of cells with large and regular nuclei, a morphological feature of senescent cells (Supplementary Fig. S1 A), as we showed with the Nuclear Morphometric Analysis (NMA) technique (Filippi-Chiela et al., 2012). Interestingly, when NMA was analyzed as a contour plot, it was possible to observe a dynamic distribution of nuclei over time in three well defined regions as described in the legend of Fig. 1. Nuclear area (NA) from TMZ-treated cells progressed from NA1 to NA3, which is characteristic of senescent cells, through the intermediary state, NA2. At D7, only a few cells remained with a nuclear area of non-senescent cells (NA1) or in the intermediary region NA2 (Fig. 1F and Supplementary Fig. S1 B).

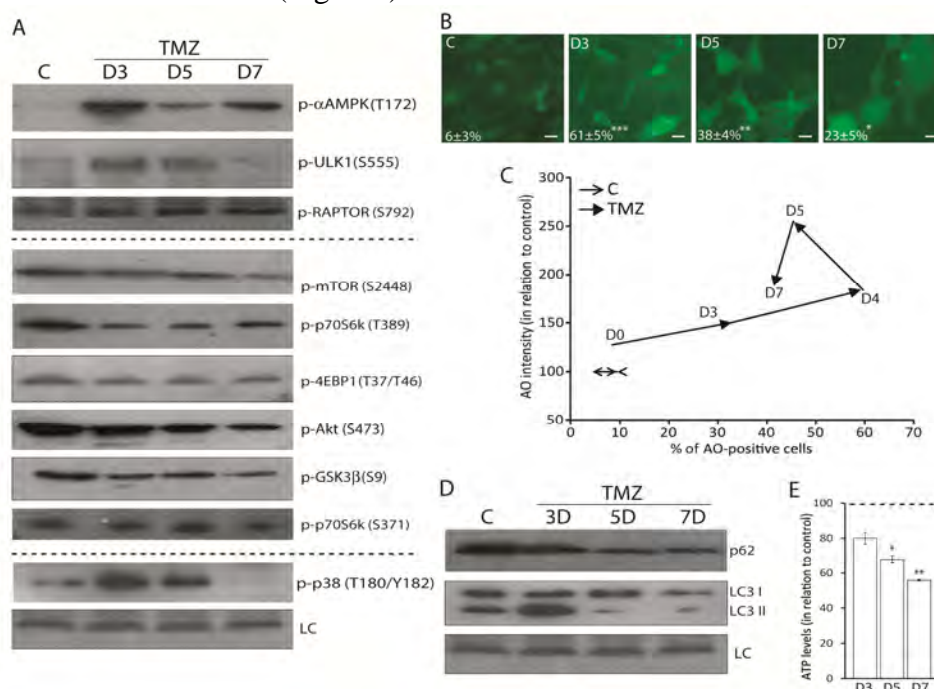


**Figure 1** Acute treatment with TMZ induces cell cycle arrest and senescence in glioma cells. **(A)** U87-LC3 cells were treated with TMZ 100  $\mu$ M for 3 h, followed by growth in drug-free medium (DFM) for the indicated time. Time zero (D0) represents 3h after treatment. **(B)** Western blot for the indicated proteins at 3D, 5D and 7D after DFM replating; LC – loading control, *comassie blue* stained membrane. **(C)** Cell cycle distribution. *Top* – representative plots; *bottom left* – quantification of the percentage of Sub-G1, G1, S, G2/M and hyperdiploid cells; *bottom right* – percentage of multinucleated cells, assessed by direct counting of cells with two or more nuclei presenting normal area at D7. **(D)** Cumulative population doubling (CPD) of cells treated as in (a). **(E)** Representative images of SA- $\beta$ -gal staining; numbers represent the quantification of the percentage of  $\beta$ -gal-positive cells (mean  $\pm$  SEM); scale bar: 80  $\mu$ m. **(F)** NMA contour plot of TMZ-treated cells over time. Nuclear areas (NA) were defined based on the average of normal nuclei and thresholds determined by average area $\pm$ 2SD (NA1), 2SD to 4SD from the average (NA2) and more than 4SD from the mean (NA3). NII represents the index of nuclear irregularity, as a measurement of nuclear morphometric alterations that occur overtime. Values on heat maps legends represent the number of cells. \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  in relation to control.

## Acute TMZ treatment triggers early AMPK/ULK1 and p38 activation, persistent Akt/PI3k/mTOR suppression and transient autophagy

Acute TMZ treatment induced an increase in pT172- $\alpha$ AMPK at D3, accompanied by an increase of two AMPK targets (Kim et al., 2011) - pS555-ULK1, a member of the initial complex of autophagy promotion (ULK1-FIP200-Atg13), and pS792-Raptor, which when phosphorylated disrupts the formation of mTORC1, leading to autophagy induction (Dunlop et al., 2011). Accordingly, mTOR activity, as indicated by pS389-p70S6K, pS2448-mTOR, pT37/46-4EBP1, pS473-Akt and pS9-GSK3 $\beta$  was gradually reduced, remaining low at D7. p38, an important sensor of cell damage (including genomic injury), presented an increased phosphorylation at D3 and D5 (Fig. 2 A). It is important to emphasize that phosphorylation of p38, AMPK and ULK1 follows a kinetics that resembles the primary DNA damage produced (Fig. 1 B), whereas the remaining proteins presented slower and more long lasting post-translational modifications. These data are supportive of pro-autophagic signaling after DNA damage, involving activation of the AMPK/ULK1 axis and suppression of Akt/mTORC1 pathway.

Indeed, TMZ led to an increase in the proportion of GFP-LC3+ cells (Fig. 2 B). The proportion of acridine orange (AO) positive cells increased until D4, followed by a sudden increase in the mean level of AO staining with a concomitant reduction in the proportion of AO+ cells (Fig. 2 C, Supplementary Fig. S1 C and S1 D). Autophagy induction was also confirmed by western blot for LC3 I/II conversion and levels of p62 protein (also known as SQSTM1), which is degraded during autophagy (Fig. 2 D). These data confirm that acute DNA damage triggered autophagy, peaking at around D3 and D4 followed by a gradual reduction. Despite high levels of autophagy, a reduction of intracellular ATP levels was observed after TMZ treatment (Fig. 2 E).



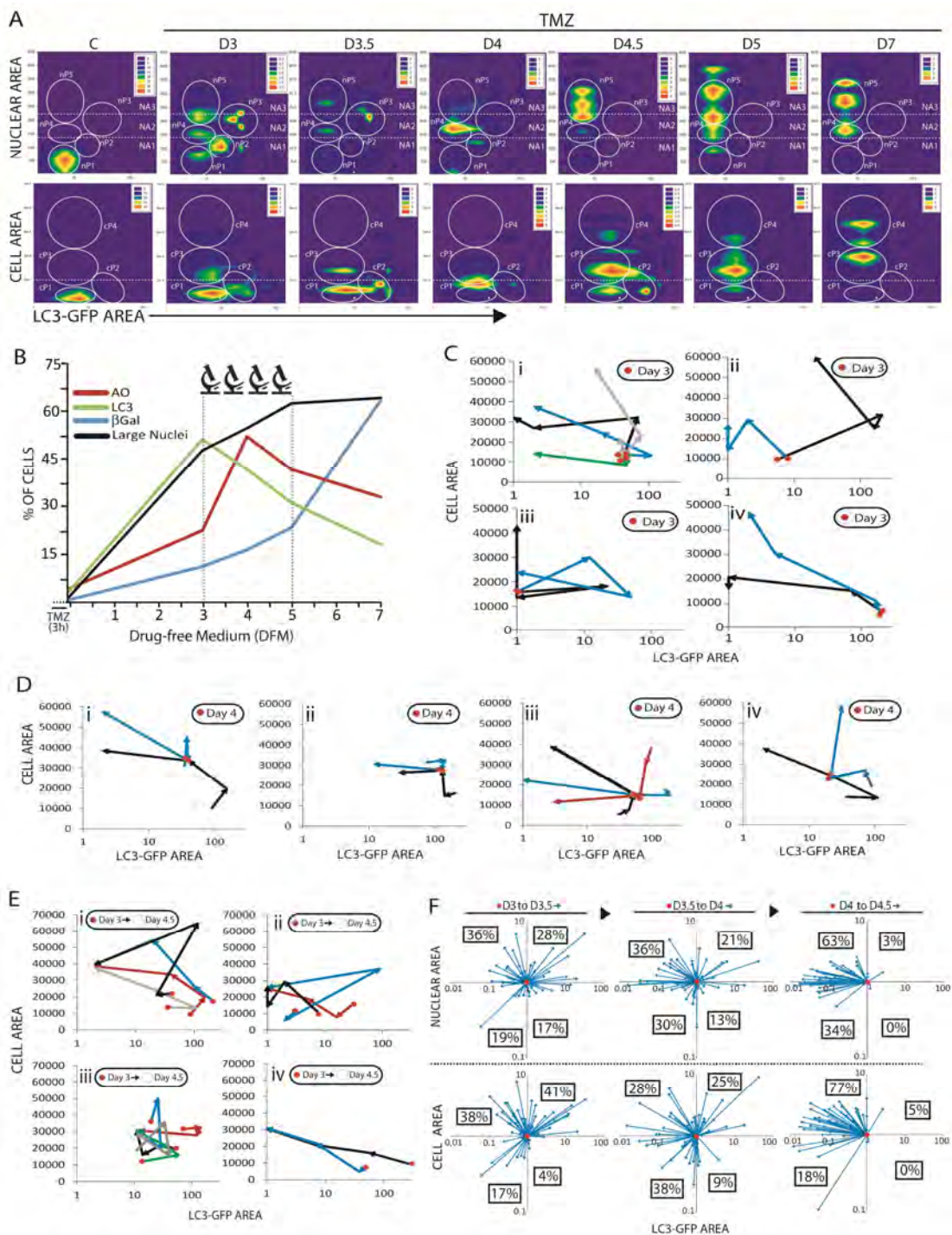
**Figure 2** Acute treatment with TMZ induces autophagy accompanied by early AMPK/ULK1 axis activation and long lasting Akt/PI3k/mTOR suppression. **(A)** U87 cells were treated as described in Fig 1A and western blot for the indicated proteins and phospho-proteins were performed; LC – loading control, *comassie blue* stained membrane. **(B)** GFP-LC3 dots formation assay; numbers depict the percentage of cells with at least 5 GFP-LC3 dots (mean  $\pm$  SEM); \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 and \*\*\* $p$ <0.001; scale bar: 20 $\mu$ m. **(C)** Acridine orange (AO) staining - graph shows the percentage of AO-positive cells *versus* AO intensity of the positive population in relation to control over time (to see data of AO intensity and percentage of cells in a separated manner see Supplementary Fig. S 1C and S1 D). **(D)** Western blots for p62 and LC3 I/II. LC – loading control, *comassie blue* stained membrane. **(E)** ATP levels of cells treated with TMZ as in Fig 1A; \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.01 in relation to control, which was considered 100%.

### **The connection between autophagy and senescence is highly heterogeneous at the single cell level**

When two well defined mechanisms are induced in a population of heterogeneous cells, it begs the question whether what is observed for a population is an average of a heterogeneous response or the depiction of a homogeneous effect. Analysis of GFP-LC3 area in relation to nuclear area showed a population transition from an initial state with neither autophagy nor senescence markers (nuclear population 1 - nP1), passing through an state of high autophagy (nP2 and nP3) and nuclear area in the NA2 region, reaching a final state of low autophagy and a intermediary (nP4) or large (nP5) nuclei at D7 (Fig. 3 A). Similar dynamics were observed for the area of the cell, except for a delay on one to two days in relation to nuclear area to pass from an intermediary region (cP3) to the region corresponding to the state of largest cell area (cP4) (Fig. 3 A).

When analyzed as the proportion of cells with a given phenotype, it can be observed that between D3 and D4.5 a critical period occurred, in which autophagy reached maximum levels accompanied by senescence entry, based on CPD and  $\beta$ -Gal staining (Fig. 3 B). In order to evaluate how individual cells go through this transition, we measured autophagy and senescence markers through single cells tracking from D3 to D4.5. In control cells, LC3, cell and nuclear area remained virtually constant (see examples at Fig. 4 B). On the other hand, TMZ-treated cells underwent a very heterogeneous response, as observed in the path taken in a cell area versus GFP-LC3 area graph (Fig. 3 E, D and E). We found some cells that presented very similar positions in the LC3 versus cell area graph at 3D and reached very different positions at D4.5 (Fig. 3 C); cells that passed through a similar point but coming from and going to very different positions (Fig. 3 D); and cells that reached a similar position even though starting at a different point and going along very different paths (Fig. 3 E). A similar heterogeneous response was observed for the nuclear area (Supplementary Fig. S2 A-D).

In order to try to make some sense of this very heterogeneous response, we plotted the vectors of all cells over the intervals of analysis, in relation to the initial value (considered 1). The high degree of heterogeneity concerning nuclear and cell area in relation to GFP-LC3 became evident during the intervals from D3 to D3.5 and D3.5 to D4 (Fig. 3 F - left and middle graphs). However, from D4 to D4.5 a clear reduction of autophagy occurred in more than 90% of cells to very low GFP-LC3 area (Fig. 3 F - right graph). Importantly, non-normalized data indicate that this reduction in GFP-LC3 occurred independently of cell and nuclear area (Supplementary Fig. S2 E), suggesting an orchestrated mechanism of autophagy ending after DNA damage, independent of the area of the cell or nucleus and, probably, of the process of senescence induction. As expected, 85% of control cells did not trigger autophagy nor a significant increase in cell area or nuclear area (Supplementary Fig. S2F).



**Figure 3** Single cell analysis of GFP-LC3, nuclear and cell area after TMZ treatment. **(A)** Contour plots of cell and nuclear area in relation to GFP-LC3 area after treatment as described in Fig 1 A. Circles mark the populations based on regions with high density that emerges from plots of nuclear area (nP - top) and cell area (cP - bottom) in relation to GFP-LC3; dashed line marks the thresholds of NA1, NA2 and NA3, as indicated in Fig 1 F. Values on heat maps legends represent the number of cells for each color. **(B)** Summary of autophagy and senescence marker after TMZ treatment. Single cells were photographed every 12h, from D3 to 4.5. From **(C)** to **(E)** are shown different profiles of cells. Each color line represents a single cell tracking of cells that present very similar characteristics **(C)** at D3, **(D)** at D4 or **(E)** at D4.5. **(F)** Vectors of GFP-LC3 area versus nuclear (top) or cell (bottom) area, considering the initial value as 1 for each interval (red circle); numbers represent the percentage of cells in each quadrant at the end of the interval.

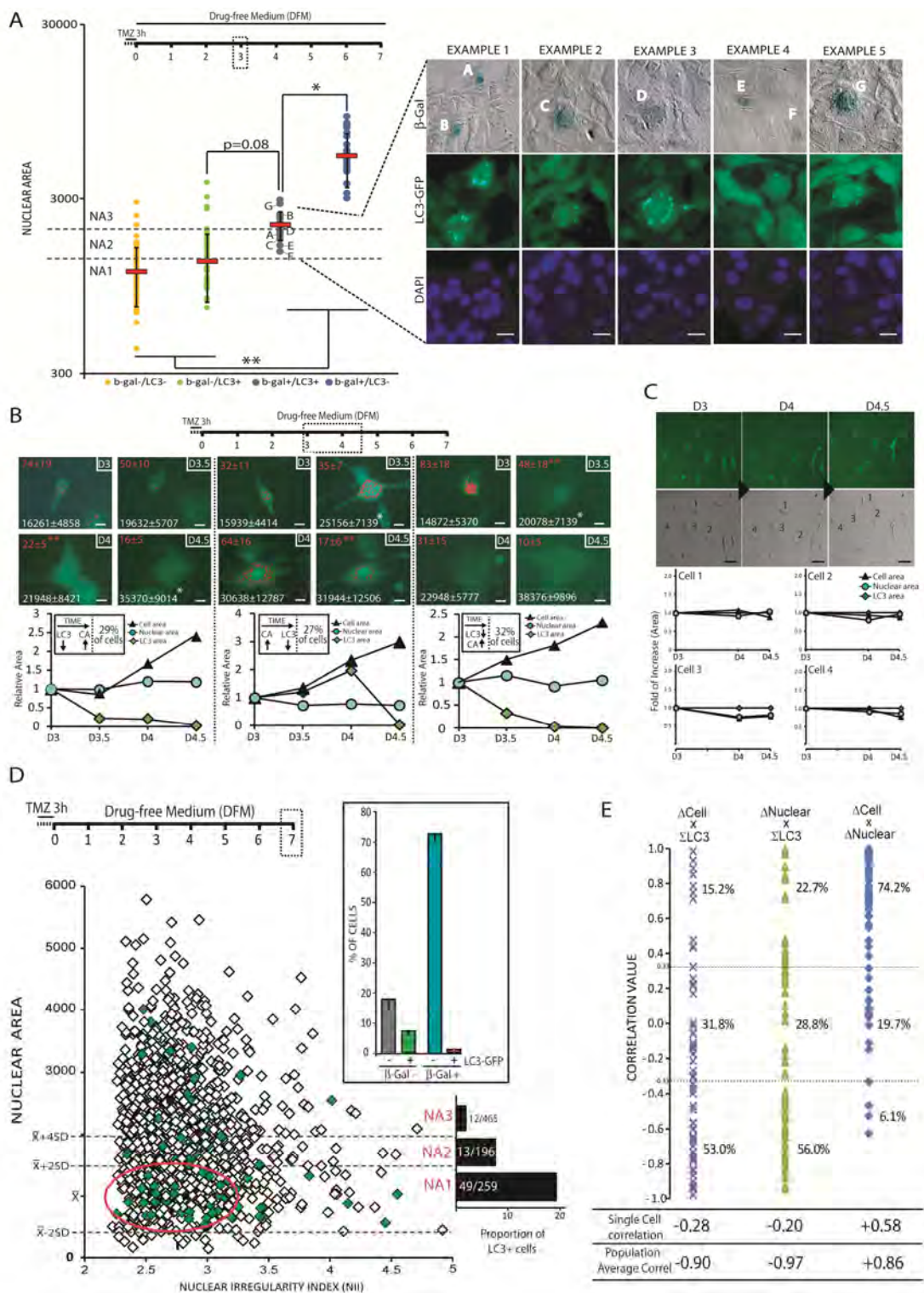
## Population versus single cells analysis of autophagy and senescence

Despite this heterogeneous response in individual cells, at a population level a significantly larger nuclear area was observed in the few cells already  $\beta$ gal<sup>+</sup> positive at D3 in relation to  $\beta$ gal<sup>-</sup> cells. Interestingly, GFP-LC3 status was inversely correlated with nuclear area in  $\beta$ gal<sup>+</sup> but not  $\beta$ gal<sup>-</sup> cells, with LC3<sup>-</sup> cells being significantly larger than LC3<sup>+</sup> cells in the former (Fig. 4 A). This was also observed after treatment with another DNA damage agent, Doxorubicin, at 100 nM for 24h followed by 7 days in DFM (Supplementary Fig. S3 A). This effect, along with the reduction in autophagy observed in the majority of cells raised the question whether autophagy reduction precedes senescence entry (Gewirtz, 2013; Gewirtz, 2014). To answer this, we measured, for each cell, the interval in which GFP-LC3 area undergoes the highest alteration and, in parallel, the interval in which each cell suffers the highest increase in area between D3 and D4.5. Roughly one third of the cases fell into each of the three possibilities, i.e. autophagy reduction before, concomitant or after the largest increase in cell area (Fig. 4 B). As mentioned above, control cells almost did not alter their phenotype over time (Fig. 4 C and Supplementary Fig. S2 F).

After 7 days in DFM, the distribution of LC3<sup>+</sup> and LC3<sup>-</sup> cells was more uniform in the  $\beta$ gal<sup>-</sup> cells when compared to  $\beta$ gal<sup>+</sup>, suggesting that progression to senescence eventually includes reduction of LC3, which is less likely to occur in cells that also received the initial proautophagic damage, but did not progress towards senescence (Fig. 4 D – insert graph – and Supplementary Fig. S3 B). Considering the nuclear area of cells still LC3<sup>+</sup> at D7, around 66% presented a normal nuclear area (NA1), and the proportion of LC3<sup>+</sup> cells gradually decreases from NA1 to NA3 population (Fig. 4 D – black bars on the right).

Taken together, this indicates that when analyzed at a population level, autophagy markers increased with a faster and transient kinetics, while senescence markers increased with a slower and sustained kinetics and the former decreased before the latter became dominant in the population. This is indicated by the inverse correlation between cell or nuclear area variation and the sum of LC3 area from D3 to D4.5 in the whole population (Fig. 4 E). This inverse correlation is also high when considering data from D3 to D7 (*not shown*). However, when these correlations were calculated for each cell from 3D to 4.5D, the average did not indicate a positive or negative correlation and the distribution of single cells correlation values were very heterogeneous (Fig. 4 E). Altogether, our results suggest that the data obtained from population of cells represent the average of a very heterogeneous response at a single cell level during the critical period from autophagy peak and low phenotypic features of senescence to autophagy reduction with the appearance of senescence markers. Thus, our data indicate that reduction of autophagy does not have to precede the increase in cell or nuclear area in a given cell.





**Figure 4** Autophagy and senescence markers highly correlates at the population level but not at the single cell level. **(A)** LC3 and  $\beta$ gal staining in relation to nuclear area at D3 (Left); in red average  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . Letters in the graph (A to G) correspond to the representative examples of  $\beta$ gal/LC3 double-positive cells shown on the right; scale bar: 20  $\mu$ m. The number of events shown does not represent the ratio of each population of cells. **(B)** Representative images of TMZ-treated cells that decrease autophagy before (left), after (mid) or concomitant with (right) cell enlargement. Red dots in GFP-LC3 images correspond to GFP-LC3 dots as they were marked in Image Pro Plus software. Numbers in images represent the mean  $\pm$  SEM of GFP-LC3 area (red) and nuclear area (white). \* $p > 0.05$  and \*\* $p > 0.01$  in relation to the previous day. Scale bar: 20  $\mu$ m. Data in graphs are shown in relation to 3D value. Inserts describe the profile of GFP-LC3 area (LC3) and cell area (CA) during mitotic to senescence transition. Numbers in the boxes denote the percentage of cells in each profile. **(C)** Representative images (top) and graphs (bottom) of control cells assessed at a single cell level at days 3 to 4.5. Data are shown in relation to control, considered as 1 at 3D. **(D)** Distribution of LC3+ cells according to nuclear area at D7. Red circle marks the normal nuclear area. NA1, NA2 and NA3 are shown (dashed lines). On the right is shown the proportion of LC3+ cells in relation to total cells in each nuclear area (NA) region; insert: Profile of GFP-LC3 and  $\beta$ gal staining at D7. **(E)** Correlations between the variation of cell and nuclear area and total LC3 area for all single cells from 3D to 4.5D. Bottom: average of these correlations ('Single cell') and correlations of the average of the population of cells ('Population Average').

## **Inhibition of TMZ-induced autophagy triggers apoptosis and reduces senescence**

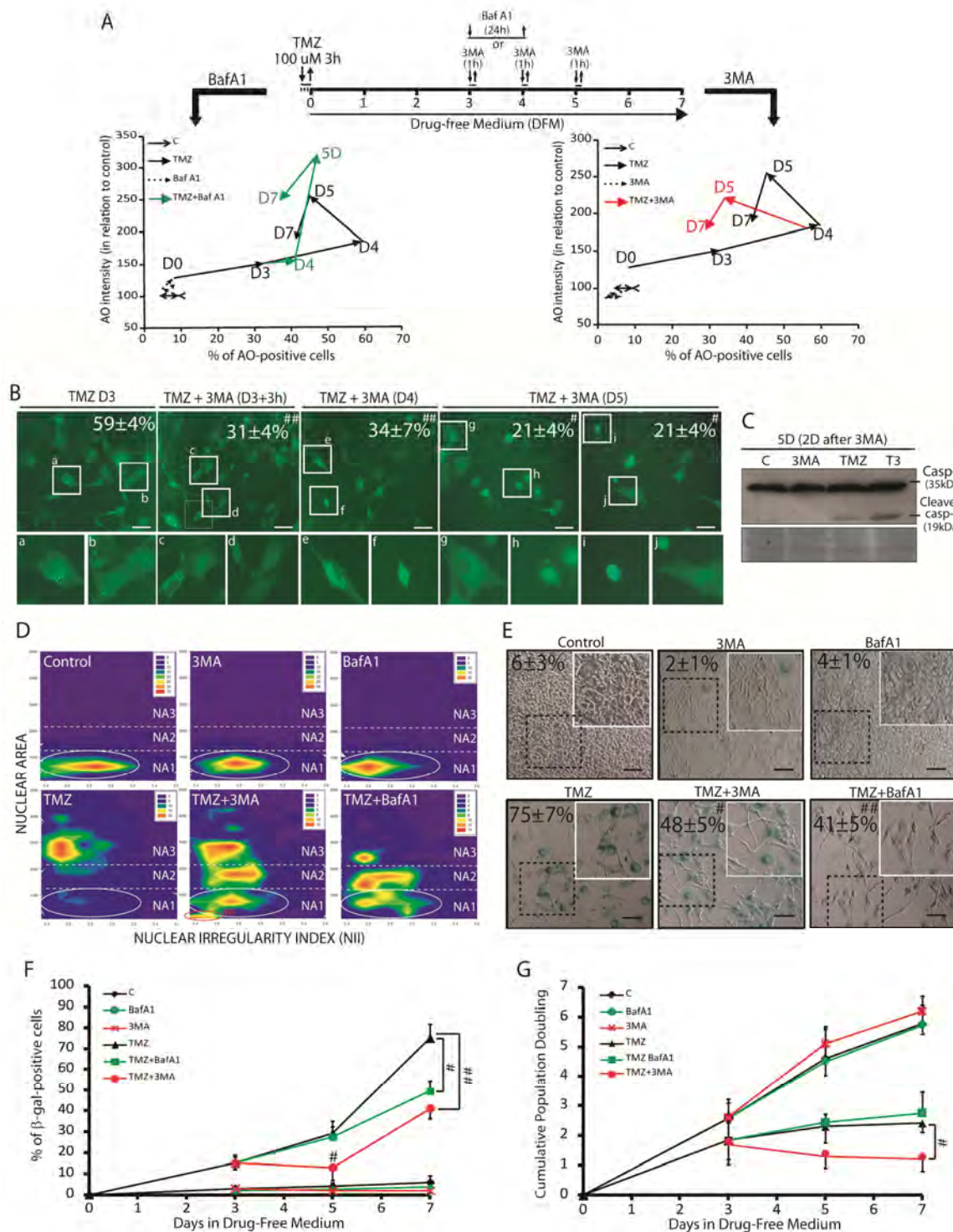
Inhibition of autophagy with bafilomycin A1 (BafA1) at D3 for 24h reduced TMZ-induced autophagy only while present (*i.e.* from D3 to D4), followed by a rebound in both the percentage and intensity of AO staining to levels even higher than those induced by TMZ alone (Fig. 5 A – left; Supplementary Fig. S4 A, B). This effect may be due to the accumulation of autophagosomes, since BafA1 suppresses the fusion between autophagosomes and lysosomes through the blockage of lysosomes acidification (Yamamoto et al., 1998). On the other hand, 3-methyladenine (3MA) during 1h at D3, D4 and D5 reduced AO staining (Fig. 5 A – right; Supplementary Fig. S5 A, B) as well as GFP-LC3 dots formation (Fig. 5 B). Furthermore, autophagy inhibition with 3MA induced apoptosis, as indicated by cell shrinkage (Fig. 5 B and Supplementary Fig. S4 C), caspase-3 cleavage (Fig. 5 C) and increase in small and regular nuclei (Fig. 5 D), a typical feature of apoptotic cells (Filippi-Chiela et al., 2012). Interestingly, despite also reducing autophagy, BafA1 treatment did not lead to apoptosis.

At D3, some nuclei of TMZ-treated cells were already in the NA2 and NA3 regions, but at D7, almost all nuclei were in the NA3 population (Fig. 1 F). Inhibition of autophagy with either BafA1 or 3MA kept nuclei in the NA1 and NA2 populations (Fig. 5 D), in agreement with the reduction in the proportion of  $\beta$ Gal<sup>+</sup> cells (Fig. 5 E and F). Finally, treatment with 3MA reduced the number of cells from 3D onwards, probably due to apoptosis induction, which was not observed to BafA1 treatment (Fig. 5 G).

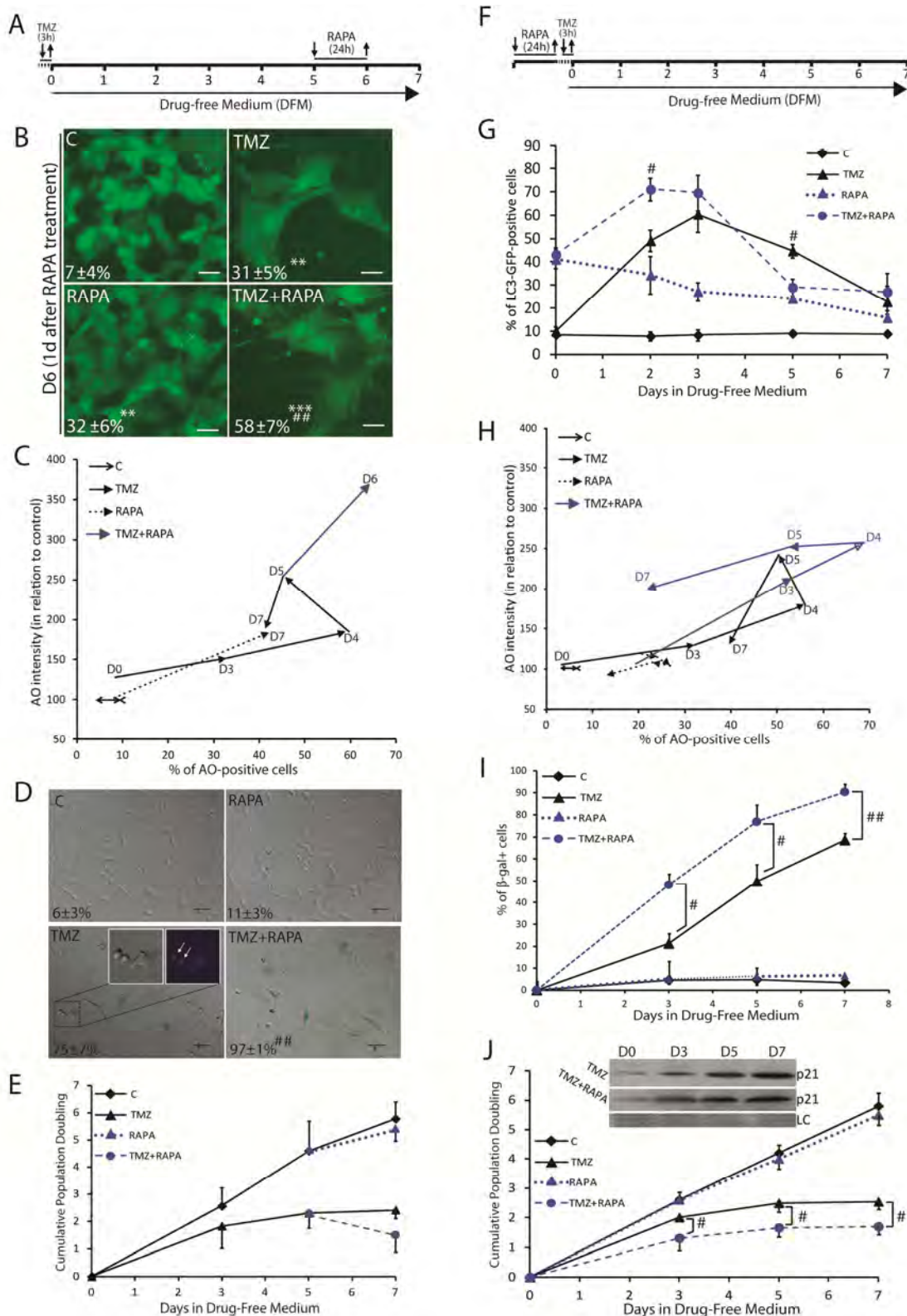
## **Rapamycin increased TMZ-induced senescence**

Treatment with the mTOR inhibitor Rapamycin (RAPA) at D5 (Fig. 6A) led to a high increase in GFP-LC3 dots formation (Fig. 6 B) and AO staining (Fig. 6C and Supplementary Fig. S5 A, B) in comparison to TMZ alone. This acute increment of autophagy from D5 to D6 led to an increased percentage of  $\beta$ gal<sup>+</sup> cells at D7 in comparison to TMZ alone (Fig. 6 D) and a reduction in the number of cells (Fig. 6 E). Furthermore, while in TMZ-treated cells we observed some mitotic figures at D7, we did not observe these phenotypes in TMZ+RAPA-treated cells (Fig. 6 E – insert).

Accordingly, RAPA treatment 24h before TMZ (Fig. 6 F) anticipated the peak of TMZ-induced autophagy measured with GFP-LC3 (Fig. 6 G and Supplementary Fig. S5 C) and AO (Fig. 6 H and Supplementary Fig. S6 D,E). RAPA pre-treatment accelerated TMZ-induced senescence entry, as shown by  $\beta$ gal staining (Fig. 6I), CPD analysis and p21 levels (Fig. 6J). It is interesting to point that RAPA alone, despite inducing a higher initial pro-autophagic effect than TMZ (Fig. 6 G, H and Supplementary Fig. S5 C-E), neither induced a sustained autophagy nor senescence.



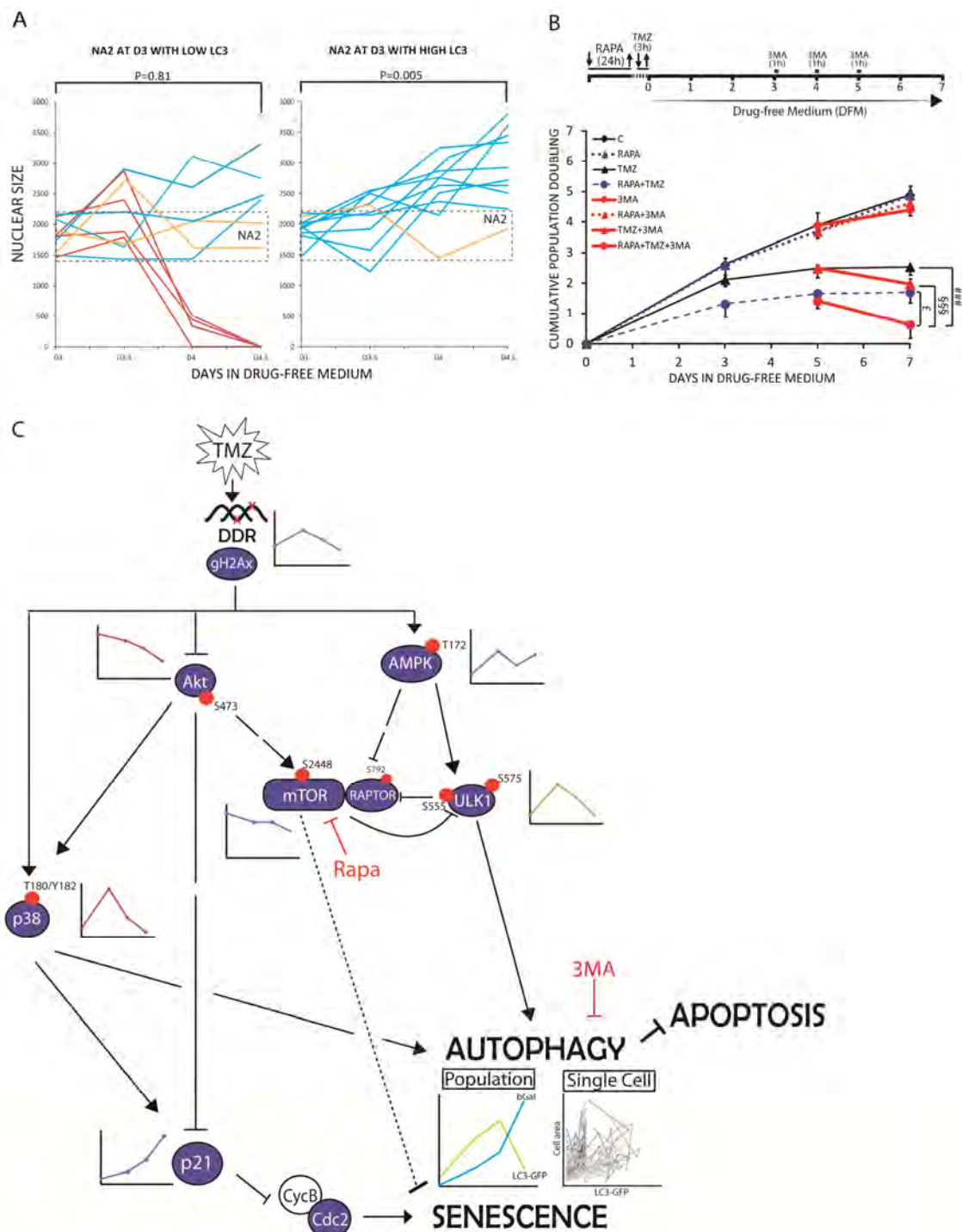
**Figure 5** Inhibition of TMZ-induced autophagy triggers apoptosis and reduces senescence in glioma cells. **(A)** Top - Experimental design. Bafilomycin A1 (BafA1) 100 nM was added at D3 for 24 h; 3-methyladenine (3MA) 2 mM was added for 1h at days 3, 4 or 5. Left graph - AO graph for BafA1. Right graph - AO graph for 3MA; data are presented as % of AO-positive cells versus AO intensity. **(B)** Representative images of cells after 3h, 24 h and 48 h of 3MA treatment; for 48h after 3MA treatment, two representative images are shown to illustrate apoptotic cells (white arrowhead); ##p<0.01 in relation to TMZ alone at D3; #p<0.05 in relation to TMZ alone at D5 (see Fig. 2 A); scale bar: 40 μm. **(C)** Western blot for caspase-3. **(D)** NMA contour plot at D7; NA1, NA2 and NA3 correspond to regions 1, 2 and 3, respectively; SR: small and regular (i.e. apoptotic) nuclei. **(E)** Representative images of SA-βgal staining at 7D; numbers denote the percentage of βgal-positive cells; scale bar: 100 μm. #p<0.05 and ##p<0.01 in relation to TMZ alone. **(F)** Percentage of βgal+ cells. #p<0.05 and ##p<0.01 in relation to TMZ. **(G)** CPD of cells treated as in (a). #p<0.05 in relation to TMZ.



**Figure 6** Rapamycin increases TMZ-induced senescence. (A) Cells were treated with Rapamycin (RAPA) 100 nM at D5 for 24h. (B) Representative images and quantification of GFP-LC3 at D6, 24h after RAPA treatment at D5; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in relation to control; ##  $p < 0.05$  in relation to TMZ alone. Scale bar: 40  $\mu\text{m}$ . (C) AO graphs; data are presented as % of AO-positive cells versus AO intensity. (D) SA- $\beta$ -gal staining at D7 after treatment as shown in (a); detail in TMZ image point to a mitotic figure (white arrow), which was not observed in TMZ+RAPA treatment; \*\* $p < 0.01$  in relation to TMZ alone; scale bar: 60  $\mu\text{m}$ . (E) CPD after treatment as in (a). (F) Cells were pre-treated with RAPA 100 nM 24h before TMZ. (G) Percentage of GFP-LC3-positive cells; # $p < 0.05$  comparing TMZ to TMZ+RAPA. (H) AO graphs. (I) Percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  in relation to TMZ alone. (J) CPD and western blot for p21 protein. LC – loading control, comassie blue stained membrane. # $p < 0.05$  in relation to TMZ alone.

## Inhibiting and activating autophagy at different times as a form of eliminating TMZ-resistant cells

Cells with nuclei in the NA2 region at D3 (Fig. 1 F) responded differently according to its autophagic status – high LC3 cells increased average nuclear area from D3 to D4.5 whereas low LC3 cells remained with the same area or decreased nuclear area, i.e. suffered apoptosis (Fig. 7 A). Therefore, we wondered whether activating and blocking autophagy at different times could potentiate the effect of TMZ by increasing senescence and inducing apoptosis. Indeed, RAPA pre-treatment followed by TMZ treatment and the addition of 3MA at D3, D4 and D5 led to a further reduction of cells in comparison to treatments alone (Fig. 7 B), indicating a potential therapeutic regimen aimed at eliminating resistant cells.



**Figure 7** Autophagy activation followed by its inhibition highly increases the toxicity of TMZ *in vitro*. (A) Single cell tracks of nuclear area alterations in cells with nuclear area in the NA2 region separated by both low (left) and high GFP-LC3 area (right). (B) *Top* - cells were pre-treated with RAPA 100 nM for 24 h followed by treatment with 100  $\mu$ M of TMZ for 3 h; 3MA (2mM) was added for 1 h at days 3, 4 and 5, followed by CPD (*bottom*). ### $p < 0.001$  in relation to TMZ alone,  $\&p < 0.05$  in relation to TMZ + RAPA and §§§  $p < 0.001$  in relation to TMZ + 3MA. (C) Overview of the cellular and molecular effects triggered by TMZ in glioma cells. Sites of phosphorylation are shown as red circles. Dashed line indicates molecular links that may occur not directly or not well established. Broken line from Akt to p21 indicates a multistep mechanism.

## DISCUSSION

In this study we found that: (i) acute DNA damage leads to AMPK/ULK1 and p38 activation and sustained downregulation of Akt/PI3k/mTOR pathway, leading to transient activation of autophagy (Fig. 7 C); (ii) at a population level, autophagy is highly correlated negatively with senescence markers, while in single cells this correlation does not exist; (iii) boosting senescence, by inhibiting mTOR, prior to DNA damage together with inducing apoptosis later, by inhibiting autophagy, may be a good strategy to overcome resistance.

The dynamic of autophagy induction resembles the kinetics of DDR and the activation of AMPK/ULK1 and p38 pathways, while the orchestrated reduction of autophagy at 4D occurred despite the sustained mTOR inhibition. In support to our suggested mechanism, Singh *et al* showed that DNA damage activated H2AX/ATM pathway, followed by AMPK/ULK1 activation and autophagy in epithelial cells (Singh *et al.*, 2012). Indeed, after TMZ treatment, DNA damage proteins (Knizhnik *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2012) and DNA repair proteins (Zeng and Kinsella, 2008; Zeng and Kinsella, 2010) may signal to activate the AMPK/ULK1 axis, which can trigger autophagy both directly, through activation of VPS34 (Russell *et al.*, 2013), or indirectly, by inhibiting mTORC1 through phosphorylation of Raptor (Dunlop *et al.*, 2011). In addition, we found that Akt/PI3k pathway gets chronically suppressed, which can contribute to long lasting mTOR inhibition and late senescence (Aistle *et al.*, 2012). Thus, it is plausible to assume that RAPA sensitized cells to both TMZ-induced autophagy and senescence due to the anticipation of mTOR inhibition. This was similar to observations in skin cancer cells exposed to UV radiation (Strozyk and Kulms, 2013) and in radiotherapy-treated breast cancer cells (Nam *et al.*, 2013).

Population data showed an early activation of autophagy followed by its decrease accompanied by a concomitant increase of senescence, in agreement with other models of autophagy and senescence induction (Gamerding *et al.*, 2009; Patschan *et al.*, 2008). In single cells, however, autophagy can decrease before, after or concomitant with cell enlargement. Additionally, LC3, nuclear or cellular area status at a given time were neither indicative of the previous state nor of the outcome regarding autophagy or senescence markers. Since autophagy presented a concerted reduction independent of cell or nuclear area at 4D, it is plausible to conclude that the kinetics of senescence induction is heterogeneous and unaffected by autophagy. Indeed, autophagy and senescence are triggered in parallel after various stimuli, but with different kinetics (Goehe *et al.*, 2012; Patschan *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2009), therefore giving the population impression of causality but which was not observed at the single cell level, as already hypothesized (Gewirtz, 2014). In support of autophagy not being necessary for senescence induction, senescence occurred at high levels even after autophagy inhibition in models using RNAi for Atg proteins (Gewirtz, 2014; Goehe *et al.*, 2012; Young *et al.*, 2009). Indeed, silencing of *Atg5* and *Atg7* only attenuated senescence induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in fibroblasts (Luo *et al.*, 2011) and failed to block senescence induced by adriamycin in breast cancer cells (Goehe *et al.*, 2012), despite highly suppressing autophagy induction. The reduction in markers of senescence when autophagy was inhibited at the initial and final steps suggests that autophagy may play an important role in supporting the full development of the senescence phenotype, probably by providing ATP

to the cell, as indicated in studies with TMZ in gliomas (Katayama et al., 2007). Additionally, autophagy inhibition also reduces the percentage of senescent cells due to targeting autophagic cells to apoptosis, as also observed by others (Katayama et al., 2007; Singh et al., 2012).

In several models, autophagy is part of the machinery that generates an adaptive context during cell stress, preventing cells undergoing apoptosis. In this context, autophagy is permissive for senescence entry, which is the terminal response (Young and Narita, 2010) of those cells that resisted apoptosis (Collado et al., 2007; Grimes and Chandra, 2009). Therefore, inhibition of autophagy may improve therapeutic efficiency of DNA damage agents, reducing tumor resistance (Sui et al., 2013). Indeed, targeting autophagy in the therapy of aggressive tumors has provided promising results (Kaza et al., 2012; Yang et al., 2011), including some clinical trials combining classical chemotherapeutics with autophagy activators (Chinnaiyan et al., 2013; Mason et al., 2012; Reardon et al., 2006) and inhibitors (Briceno et al., 2007; Sotelo et al., 2006). Furthermore, the percentage of cells that remained autophagic at 7D (8%), from which more than 90% are on NA1 or NA2 area, is closely related to the percentage of cells that retained clonogenic capacity after TMZ treatment, as we previously reported (Filippi-Chiela et al., 2013a).

In fact, the study of different protocols of cancer treatment with autophagy modulation may give important insights about the role of autophagy in long term response of cancer cells to cytotoxic agents, which can predict clinical responses (Augustine et al., 2009). In this sense, careful scheduling of chemotherapeutic agents and autophagy modulators may potentiate their effect through the elimination of resistant cells.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cell culture and treatments**

Human GBM cell line U87 stably expressing the autophagic marker GFP-LC3 was kindly provided by Carlos F. M. Menck (University of São Paulo, Brazil). Cells were cultured in DMEM low glucose, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37°C/5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). Temozolomide, 3-methyladenine (3MA), bafilomycin (BafA1), rapamycin (RAPA) and acridine orange (AO) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). The drug vehicle DMSO never exceeded 0.5% (v/v).

### **Images Acquisition and processing**

We used a Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescent microscope, equipped with an AxioCam MRc camera. Images were acquired using AxioVision Rel 4.8 Software, at 25°C. Depending on the experiment, cells were photographed in DMEM Low glucose (single cell experiments and GFP-LC3 images during the experiment) or in PBS 1x (SA-β-gal assay, DAPI and GFP-LC3 at the endpoint of the experiment). Fluorochromes used were: acridine orange, GFP-LC3, DAPI. No processing was performed on images after acquisition.

### **Cumulative Population Doubling (CPD)**

For cumulative population doubling (CPD), cells were treated with TMZ 100 μM for 3 h, followed by two washes and cell replating in Drug-Free Medium (DFM). After 3, 5 and 7 days in DFM cell number was determined and CPD was calculated as described previously (Zamin et al., 2009), through the equation  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , where  $N(t)$  is the number of cells per well at time of count, and  $N(t_0)$  is the initial number of cells. The sum of PDs was then plotted versus time of culture.

### **GFP-LC3 assay**

U87 were transduced using lentivirus with EGFP-LC3, which localizes at the autophagosome after processing (Kabeya et al., 2000). The percentage of cells with at least 5 clear green dots in the cytosol was determined for at least 100 green cells per treatment (Mizushima et al., 2010). We also measured GFP-LC3 area using Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

These data were plotted with both nuclear area and cell area in a contour plot graph, using SigmaPlot software (Systat Software, Inc., CA, USA).

### **Acridine Orange Assay**

Acridine orange (AO) is a marker of Acidic Vacuolar Organelles (AVOs) that fluoresces green in the whole cell but red in acidic compartments (mainly late autophagosomes). At the indicated days, cells were harvested and incubated with AO 2.7  $\mu\text{M}$  for 15 min at room temperature. To quantify the percentage of AO-positive cells and the intensity of red fluorescence, AO-stained cells were analyzed in a GUAVA EasyCyte flow cytometer (Guava Technologies, Hayward, CA). AO data was presented as a plot of % of AO-positive cells *versus* red intensity graph, to better illustrate the effect of treatments over time.

### **Western Blot**

Protein expression and phosphorylation analysis was performed as described (Zamin et al., 2006; Zamin et al., 2009), with minor modifications. Primary antibodies used were: p62, LC3, pULK1, pRaptor, pAMPK, pAkt, p-mTOR, pp70S6K, p4EBP, pGSK-3 $\beta$ , gammaH2AX, pCdc2, cyclin D1, pH3 histone, p21, and pp38 (Cell Signaling, Beverly, MA).

### **Senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal or $\beta$ -gal) assay**

Cells were treated, washed twice with PBS and replated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well, in a 12-wells plate. At the indicated time, cells were tested for senescence (Dimri et al., 1995). Briefly, cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and incubated with fresh SA-beta-gal staining solution (1 mg/mL X-gal (Sigma), 40 mM citric acid/sodium phosphate (pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, and 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) for 8 h at 37°C. After, cell nuclei were stained with DAPI 300nM for 30 min in the dark. Results are presented as ratio of SA- $\beta$ -gal-positive cells to total cells, for at least one hundred cells per treatment per experiment.

### **Nuclear Morphometric Assay (NMA) and Contour Plot for NMA**

Nuclear morphometry was analyzed using a tool developed by our group (Filippi-Chiela et al., 2012). Briefly, cells were treated with TMZ, fixed with 2% paraformaldehyde (v/v in PBS) for 30 min at room temperature and marked with DAPI 300 nM for 30 min at room temperature, followed by quantification of DAPI-stained nuclei using the Software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) or Image J plugin available at [www.ufrgs.br/labsinal/nma](http://www.ufrgs.br/labsinal/nma). Data are presented as a plot of Area versus Nuclear Irregularity Index (NII). Here, we also present a new, alternative presentation of NMA data through a contour plot graph using SigmaPlot (Systat Software, Inc., CA, USA). Data from nuclear, cellular and GFP-LC3 area are given as  $\mu\text{m}^2$ .

### **Cell Cycle Analysis**

For cell cycle analysis, cells were treated, followed by two washes and cells replating in DFM. After 3, 5 and 7 days in DFM, cells were harvested and fixed in ice-cold ethanol 70% (v/v in PBS) for at least 2 h. Fixed cells were washed with PBS and marked with a solution containing 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Propidium Iodide, 0.1% Triton X-100 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase for 30 min, in the dark, at room temperature. Marked cells were analyzed using the flow cytometer GUAVA EasyCyte software to evaluate DNA content of cells and, thus, cell cycle distribution of samples.

### **ATP intracellular levels measurement**

Intracellular ATP levels were measured using the ATP determination kit (Molecular Probes, Invitrogen) Kit. Briefly, cells were lysed on ice with TE buffer (Tris 100 mM, EDTA 4 mM, pH 7.5) and samples heated at 95°C for 7 min, followed by centrifugation at 14000 rpm for 3 min. Supernatant was used to measure intracellular ATP levels, according to manufacturer's instruction. ATP intracellular levels were determined based on an ATP standard curve (1 nM – 1  $\mu\text{M}$ ). Total protein of the samples was measured by BCA kit assay, to normalize the samples.

### **Single Cell Analysis**

For single cell analysis, cells were treated with TMZ 100  $\mu\text{M}$  for 3 h, followed by two washes and cell replating at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well in 12-wells plate. The same fields were photographed each 12 h, guided by a line on the external surface of the plate. Images were acquired in



visible and green fluorescence from D3 until D4.5. After, cell area, nuclear area and GFP-LC3 area were determined for 72 TMZ-treated cells and 42 control cells, using Image Pro Plus 6.0 software. For Fig 3F we separated the intervals of analysis (i.e. from D3 to 3.5, from D3.5 to 4 and from D4 to 4.5) and converted the initial value of cell, nuclear and GFP-LC3 area to 1. Then, we calculated the values of the interval endpoint in relation to 1. For Fig 4B and 4C we converted values as relative to D3, which was considered 1. Data from nuclear, cellular and GFP-LC3 area are given as pixel<sup>2</sup>.

#### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was conducted by TTEST for single comparisons or ANOVA followed by Student-Newman-Kleus for multiple comparisons of at least three independent experiments; 'p' value under 0.05 was considered significant. Correlation analysis was done using Pearson correlation using the Microsoft Excel or PASW Statistics 18.

**Acknowledgements:** We thank Carlos F. Menck and Alexandre T. Vessoni for the U87 GFP-LC3 cells, Andrew O. Silva for given some insights and Diana Bordin for reagents and Alexandre T. Vessoni, Peter Dunkley, Dirk Van Helden and Charley Staats for critical reading of the manuscript. This work was supported by CNPq, 472512/2011-0; ICGB BRA11/01, Pronex-Fapergs 10/0044-3 and FAPERGS/PRONEN 11/2072-2. ECFC, MMBS, MPT and GL are or were recipient of CNPq fellowships. The authors declare no competing financial interests.

**Abbreviations List:** TMZ, temozolomide; DFM, Drug-Free Medium;  $\beta$ gal, senescence associated beta galactosidase assay; BafA1, bafylomicin A1; 3MA, 3-methyladenine; RAPA, rapamycin; AO, Acridine Orange; NMA, Nuclear Morphometric Analysis, NA, Nuclear Area.

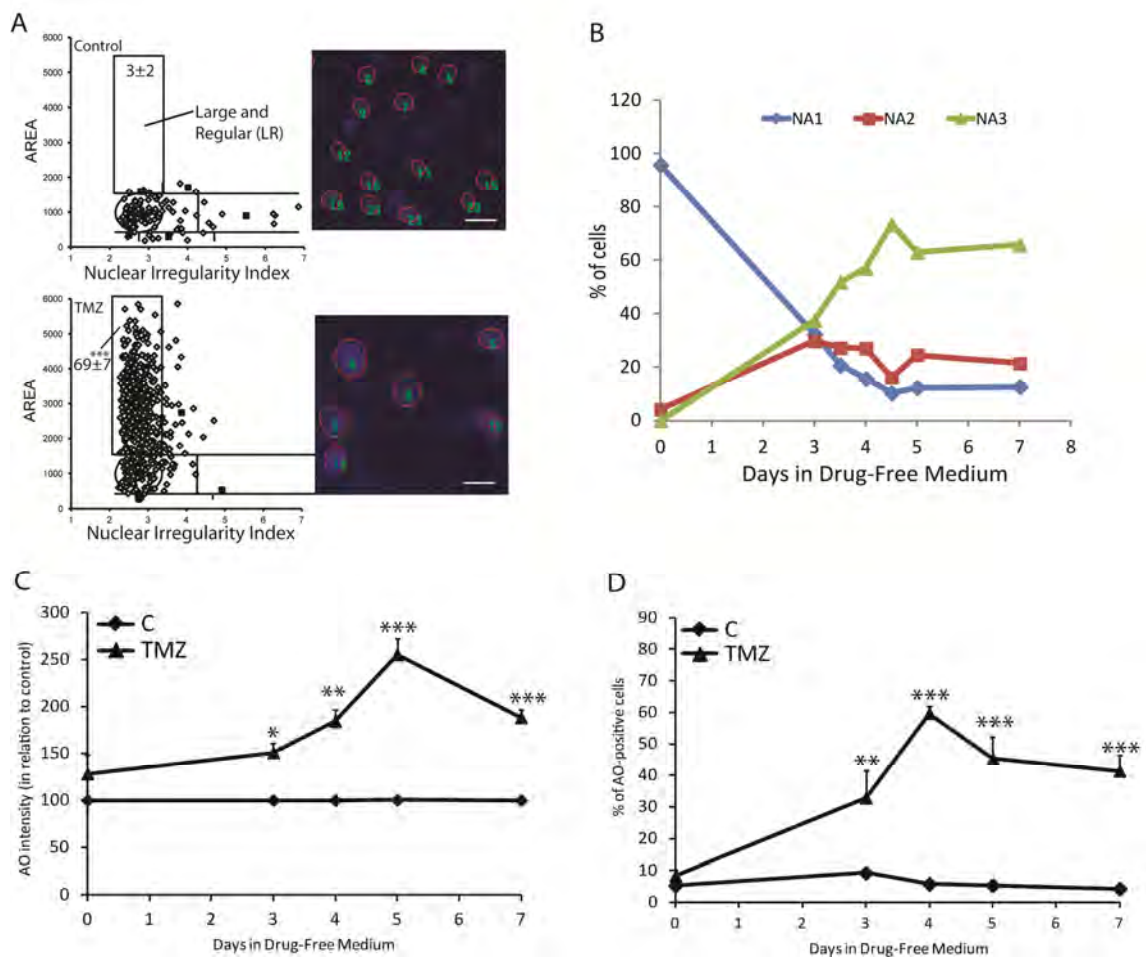
## REFERENCES

- Astle, M.V., K.M. Hannan, P.Y. Ng, R.S. Lee, A.J. George, A.K. Hsu, Y. Haupt, R.D. Hannan, and R.B. Pearson. 2012. AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene*. 31:1949-62.
- Augustine, C.K., J.S. Yoo, A. Potti, Y. Yoshimoto, P.A. Zipfel, H.S. Friedman, J.R. Nevins, F. Ali-Osman, and D.S. Tyler. 2009. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clin Cancer Res*. 15:502-10.
- Ben-Porath, I., and R.A. Weinberg. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:961-76.
- Briceno, E., A. Calderon, and J. Sotelo. 2007. Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme. *Surg Neurol*. 67:388-91.
- Chinnaiyan, P., M. Won, P.Y. Wen, A.M. Rojiani, M. Wendland, T.A. Dipetrillo, B.W. Corn, and M.P. Mehta. 2013. RTOG 0913: a phase 1 study of daily everolimus (RAD001) in combination with radiation therapy and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 86:880-4.
- Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 130:223-33.
- Collado, M., J. Gil, A. Efeyan, C. Guerra, A.J. Schuhmacher, M. Barradas, A. Benguria, A. Zaballos, J.M. Flores, M. Barbacid, D. Beach, and M. Serrano. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 436:642.
- Coppe, J.P., P.Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 5:99-118.
- Coppe, J.P., K. Kauser, J. Campisi, and C.M. Beausejour. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*. 281:29568-74.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9363-7.
- Dunlop, E.A., D.K. Hunt, H.A. Acosta-Jaquez, D.C. Fingar, and A.R. Tee. 2011. ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding. *Autophagy*. 7:737-47.
- Duran, A., J.F. Linares, A.S. Galvez, K. Wikenheiser, J.M. Flores, M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2008. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 13:343-54.
- Filippi-Chiela, E.C., M.M. Oliveira, B. Jurkovski, S.M. Callegari-Jacques, V.D. da Silva, and G. Lenz. 2012. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One*. 7:e42522.
- Filippi-Chiela, E.C., M.P. Thome, M.M. Bueno e Silva, A.L. Pelegrini, P.F. Ledur, B. Garicochea, L.L. Zamin, and G. Lenz. 2013a. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*. 13:147.
- Filippi-Chiela, E.C., A.T. Vessoni, C.F. Menck, and G. Lenz. 2013b. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ*.
- Filippi-Chiela, E.C., E.S. Villodre, L.L. Zamin, and G. Lenz. 2011. Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One*. 6:e20849.
- Gamerding, M., P. Hajieva, A.M. Kaya, U. Wolfrum, F.U. Hartl, and C. Behl. 2009. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *Embo J*. 28:889-901.
- Gewirtz, D.A. 2009. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy*. 5:1232-4.
- Gewirtz, D.A. 2013. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy*. 9:808-12.
- Gewirtz, D.A. 2014. Autophagy and senescence in cancer therapy. *J Cell Physiol*. 229:6-9.
- Goehe, R.W., X. Di, K. Sharma, M.L. Bristol, S.C. Henderson, K. Valerie, F. Rodier, A.R. Davalos, and D.A. Gewirtz. 2012. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther*. 343:763-78.
- Grimes, A., and S.B. Chandra. 2009. Significance of cellular senescence in aging and cancer. *Cancer Res Treat*. 41:187-95.
- Hansen, M., A. Chandra, L.L. Mitic, B. Onken, M. Driscoll, and C. Kenyon. 2008. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet*. 4:e24.
- Inami, Y., S. Waguri, A. Sakamoto, T. Kouno, K. Nakada, O. Hino, S. Watanabe, J. Ando, M. Iwadate, M. Yamamoto, M.S. Lee, K. Tanaka, and M. Komatsu. 2011. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol*. 193:275-84.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J*. 19:5720-8.

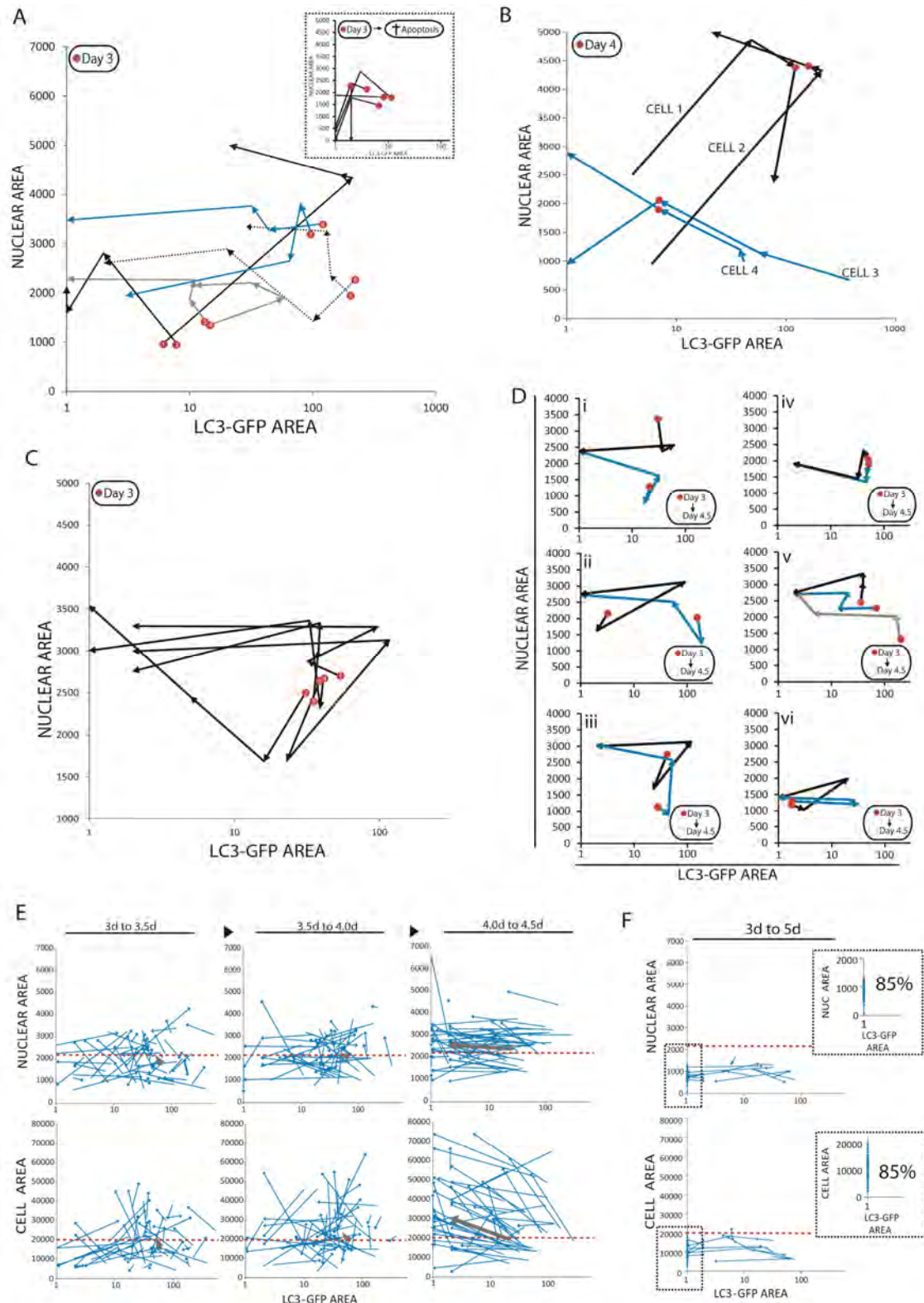
- Kanzawa, T., I.M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo, and S. Kondo. 2004. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 11:448-57.
- Katayama, M., T. Kawaguchi, M.S. Berger, and R.O. Pieper. 2007. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 14:548-58.
- Kaza, N., L. Kohli, and K.A. Roth. 2012. Autophagy in brain tumors: a new target for therapeutic intervention. *Brain Pathol.* 22:89-98.
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, and K.L. Guan. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13:132-41.
- Knizhnik, A.V., W.P. Roos, T. Nikolova, S. Quiros, K.H. Tomaszowski, M. Christmann, and B. Kaina. 2013. Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One.* 8:e55665.
- Laberge, R.M., P. Awad, J. Campisi, and P.Y. Desprez. 2012. Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron.* 5:39-44.
- Lenz, G. 2011. Endogenous Anticancer Mechanisms. *Frontiers in Bioscience.* in press.
- Luo, Y., P. Zou, J. Zou, J. Wang, D. Zhou, and L. Liu. 2011. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPKalpha dependent manner. *Exp Gerontol.* 46:860-7.
- Maes, H., N. Rubio, A.D. Garg, and P. Agostinis. 2013. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med.* 19:428-46.
- Maiuri, M.C., E. Tasdemir, A. Criollo, E. Morselli, J.M. Vicencio, R. Carnuccio, and G. Kroemer. 2009. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 16:87-93.
- Marino, G., M. Niso-Santano, E.H. Baehrecke, and G. Kroemer. 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:81-94.
- Mason, W.P., M. Macneil, P. Kavan, J. Easaw, D. Macdonald, B. Thiessen, S. Urva, Z. Lwin, L. McIntosh, and E. Eisenhauer. 2012. A phase I study of temozolomide and everolimus (RAD001) in patients with newly diagnosed and progressive glioblastoma either receiving or not receiving enzyme-inducing anticonvulsants: an NCIC CTG study. *Invest New Drugs.* 30:2344-51.
- Minina, E.A., V. Sanchez-Vera, P.N. Moschou, M.F. Suarez, E. Sundberg, M. Weih, and P.V. Bozhkov. 2013. Autophagy mediates caloric restriction-induced lifespan extension in Arabidopsis. *Aging Cell.* 12:327-9.
- Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 140:313-26.
- Morselli, E., L. Galluzzi, O. Kepp, A. Criollo, M.C. Maiuri, N. Tavernarakis, F. Madeo, and G. Kroemer. 2009. Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging (Albany NY).* 1:961-70.
- Nam, H.Y., M.W. Han, H.W. Chang, S.Y. Kim, and S.W. Kim. 2013. Prolonged autophagy by MTOR inhibitor leads radioresistant cancer cells into senescence. *Autophagy.* 9.
- Parzych, K.R., and D.J. Klionsky. 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal.* 20:460-73.
- Patschan, S., J. Chen, A. Polotskaia, N. Mendeleev, J. Cheng, D. Patschan, and M.S. Goligorsky. 2008. Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H1119-29.
- Pyo, J.O., S.M. Yoo, H.H. Ahn, J. Nah, S.H. Hong, T.I. Kam, S. Jung, and Y.K. Jung. 2013. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* 4:2300.
- Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E.L. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti, and B. Levine. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 112:1809-20.
- Reardon, D.A., J.A. Quinn, J.J. Vredenburgh, S. Gururangan, A.H. Friedman, A. Desjardins, S. Sathornsumetee, J.E. Herndon, 2nd, J.M. Dowell, R.E. McLendon, J.M. Provenzale, J.H. Sampson, R.P. Smith, A.J. Swaisland, J.S. Ochs, P. Lyons, S. Tourt-Uhlig, D.D. Bigner, H.S. Friedman, and J.N. Rich. 2006. Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 12:860-8.
- Rodier, F., and J. Campisi. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 192:547-56.
- Russell, R.C., Y. Tian, H. Yuan, H.W. Park, Y.Y. Chang, J. Kim, H. Kim, T.P. Neufeld, A. Dillin, and K.L. Guan. 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol.* 15:741-50.
- Sasaki, M., M. Miyakoshi, Y. Sato, and Y. Nakanuma. 2010. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest.* 90:835-43.
- Singh, K., S. Matsuyama, J.A. Drazba, and A. Almasan. 2012. Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. *Autophagy.* 8:236-51.

- Sotelo, J., E. Briceno, and M.A. Lopez-Gonzalez. 2006. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 144:337-43.
- Strozyk, E., and D. Kulms. 2013. The role of AKT/mTOR pathway in stress response to UV-irradiation: implication in skin carcinogenesis by regulation of apoptosis, autophagy and senescence. *Int J Mol Sci.* 14:15260-85.
- Sui, X., R. Chen, Z. Wang, Z. Huang, N. Kong, M. Zhang, W. Han, F. Lou, J. Yang, Q. Zhang, X. Wang, C. He, and H. Pan. 2013. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4:e838.
- Takamura, A., M. Komatsu, T. Hara, A. Sakamoto, C. Kishi, S. Waguri, Y. Eishi, O. Hino, K. Tanaka, and N. Mizushima. 2011. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25:795-800.
- Toth, M.L., T. Sigmond, E. Borsos, J. Barna, P. Erdelyi, K. Takacs-Vellai, L. Orosz, A.L. Kovacs, G. Csikos, M. Sass, and T. Vellai. 2008. Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy.* 4:330-8.
- Vargas, J., B.C. Feltes, F. Poloni Jde, G. Lenz, and D. Bonatto. 2012. Senescence; an endogenous anticancer mechanism. *Front Biosci (Landmark Ed).* 17:2616-43.
- Vicencio, J.M., L. Galluzzi, N. Tajeddine, C. Ortiz, A. Criollo, E. Tasdemir, E. Morselli, A. Ben Younes, M.C. Maiuri, S. Lavandro, and G. Kroemer. 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology.* 54:92-9.
- Wu, W.K., S.B. Coffelt, C.H. Cho, X.J. Wang, C.W. Lee, F.K. Chan, J. Yu, and J.J. Sung. 2012. The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene.* 31:939-53.
- Xue, L.Y., S.M. Chiu, and N.L. Oleinick. 2010. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy.* 6:248-55.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and Y. Tashiro. 1998. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct.* 23:33-42.
- Yang, Z., and D.J. Klionsky. 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 335:1-32.
- Yang, Z.J., C.E. Chee, S. Huang, and F.A. Sinicrope. 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 10:1533-41.
- Young, A.R., and M. Narita. 2010. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol.* 22:234-40.
- Young, A.R., M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J.F. Darot, S. Tavaré, S. Arakawa, S. Shimizu, and F.M. Watt. 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 23:798-803.
- Zamin, L.L., P. Dillenburg-Pilla, R. Argenta-Comiran, A.P. Horn, F. Simao, M. Nassif, D. Gerhardt, R.L. Frozza, and C. Salbego. 2006. Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis.* 24:170-82.
- Zamin, L.L., E.C. Filippi-Chiela, P. Dillenburg-Pilla, F. Horn, C. Salbego, and G. Lenz. 2009. Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci.* 100:1655-62.
- Zeng, X., and T.J. Kinsella. 2008. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res.* 68:2384-90.
- Zeng, X., and T.J. Kinsella. 2010. BNIP3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing. *Cell Res.* 20:665-75.

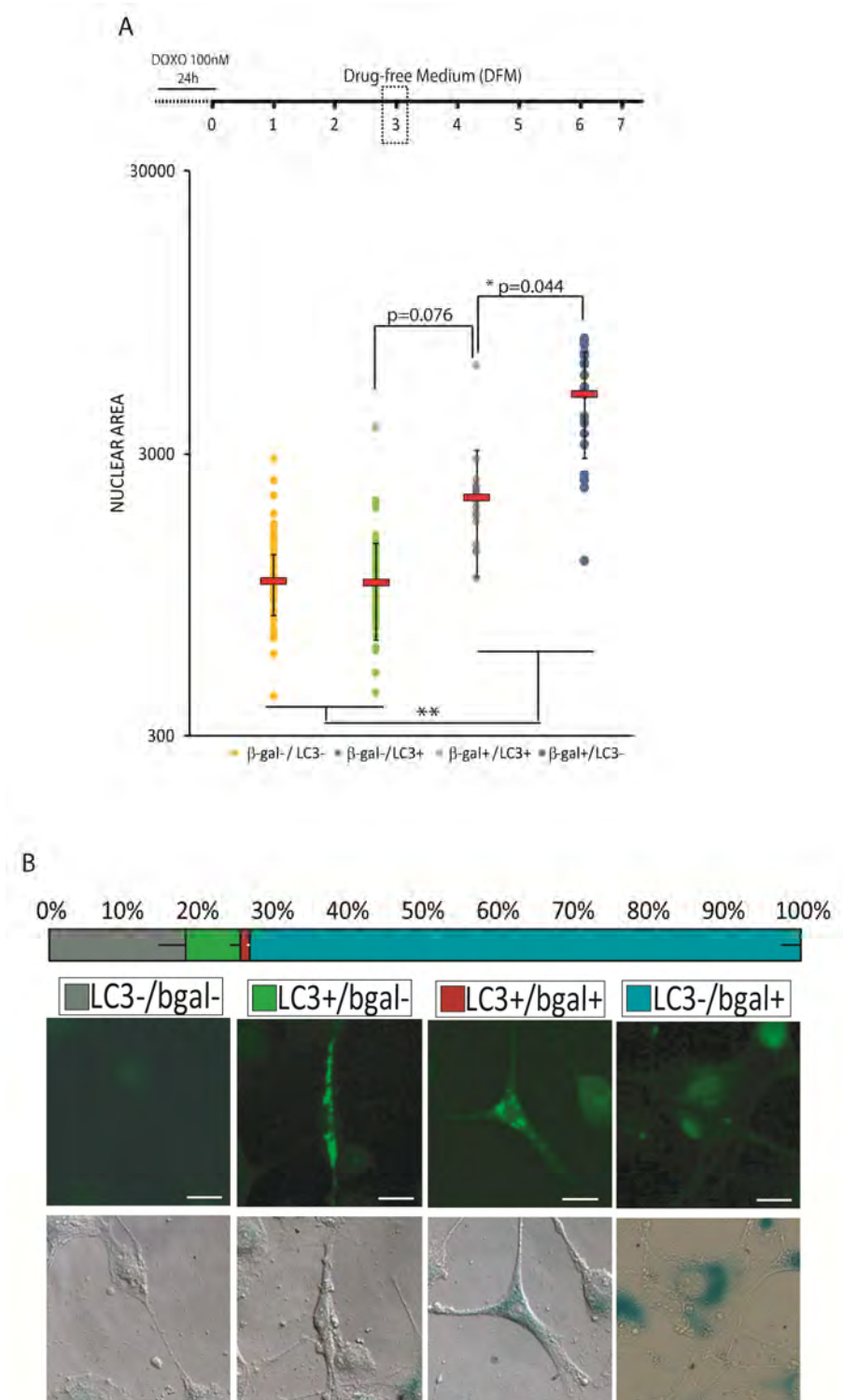
## SUPPLEMENTARY FIGURES



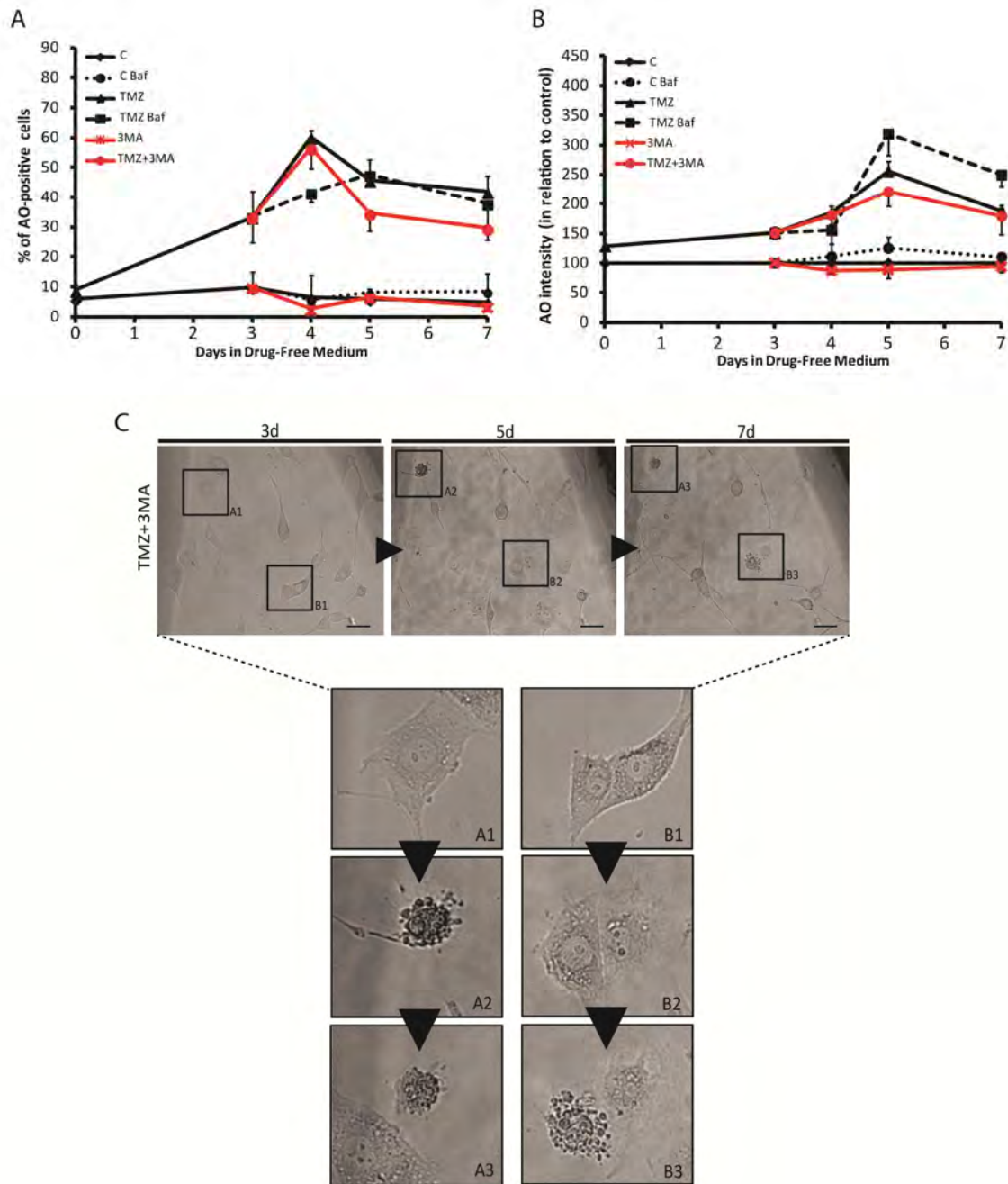
**Supplementary Figure 1** Chronic effect of acute TMZ treatment on nuclear morphometry and autophagy in TMZ-treated cells. U87-LC3 cells were treated as shown in Fig. 1 A. Time zero represents 3 h after treatment (day 0). **(A)** NMA of TMZ-treated cells at day 7; numbers correspond to the percentage of cells with large and regular nuclei. \*\*\* $p < 0.01$  in relation to control. **(B)** Percentage of cells in NA1, NA2 and NA3 regions over time, based on graphs of Fig. 1f. **(C)** relative AO red intensity and **(D)** % of AO-positive cells; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.01$  in relation to control.



**Supplementary Figure 2** Single cell analysis of GFP-LC3, nuclear and cell area after TMZ treatment. (A) Representative tracks of cell pairs that are very similar in cell and GFP-LC3 area at D4. Red marks the start point of each cell and same colors represent two cells with a similar start point; *Insert*: Tracks of cells that entered apoptosis. (B) Representative tracks of cells that share a similar position at day 4 cell; (C) Representative tracks of cells that started single cell tracking with very similar characteristics of nuclei and GFP-LC3 area; (D) Representative graph of several cells reached a similar position at D4.5. (E) Graphs of GFP-LC3 area versus absolute nuclear (top) and cell (bottom) area at the three intervals of single cell tracking analysis; each line represents a single cell accompanied over time; gray arrow represents the mean at each time; red dashed line indicates the division between NA2 and NA3 and cP2 and cP3 population, based on Fig. 1f and Fig. 3a, respectively. (F) Tracks of control cells. *Insert*: Detail of cells without autophagy.

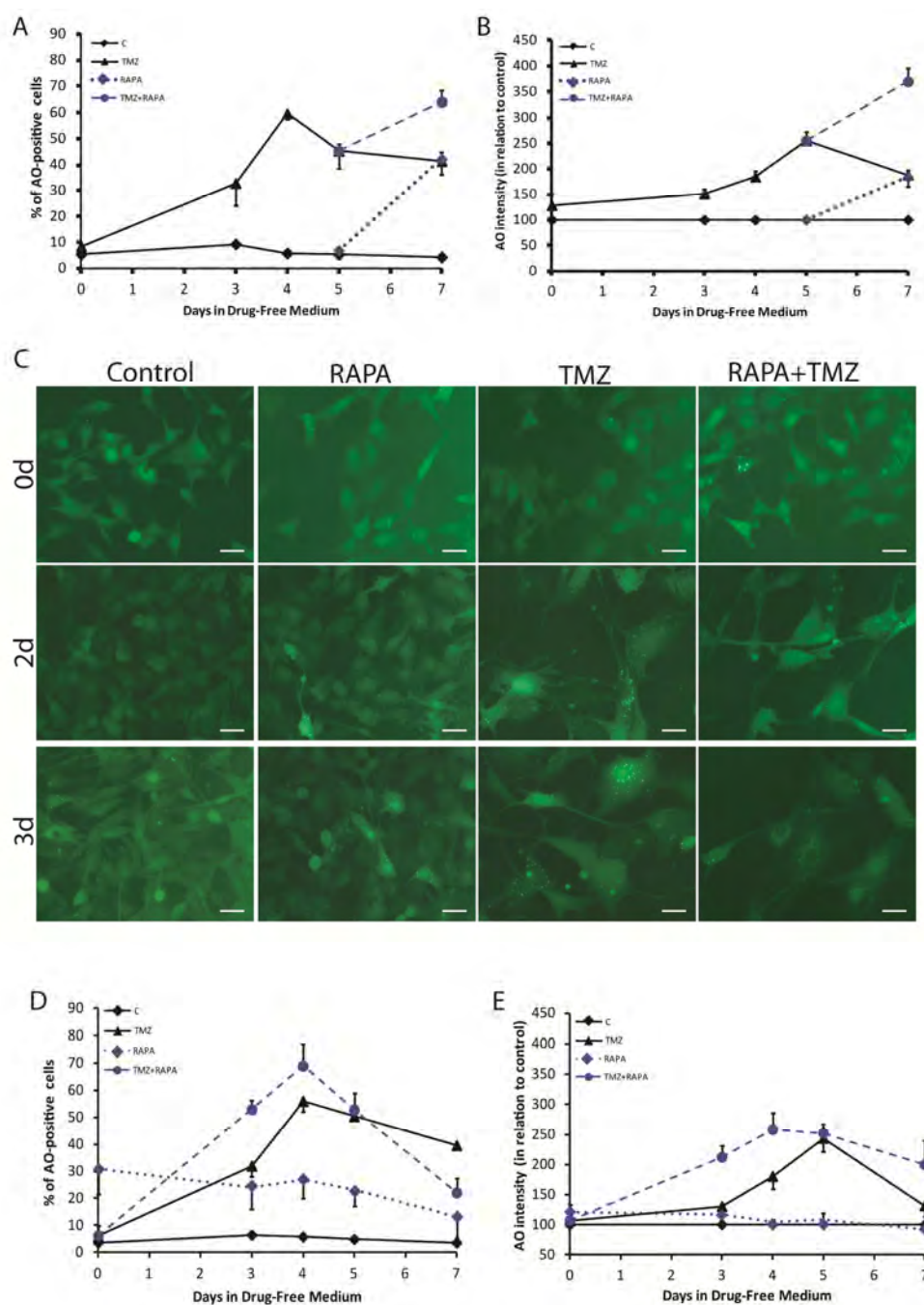


**Supplementary Figure 3** Doxorubicin induces the co-occurrence of autophagy and senescence. **(A)** U87-LC3 cells were treated with Doxo 100  $\mu$ M for 3 h, followed by replating in DFM for 7 days, after which cells were fixed with paraformaldehyde 2% and stained for SA- $\beta$ -gal. **(B)** Representative images of the profile of GFP-LC3 and  $\beta$ gal staining at D7 after TMZ treatment; scale bar: 20  $\mu$ m.



**Supplementary Figure 4** Inhibition of TMZ-induced autophagy induces apoptosis in glioma cells. **(A)** U87 GFP-LC3 cells were treated as described in Fig. 5 A followed by determination of the percentage of AO-positive cells (*left*) and AO red intensity (*right*). **(B)** Representative images of the same field treated with TMZ+3MA over time (3, 5 and 7d); *left image* show images of cells treated with TMZ+3MA; scale bar: 30  $\mu$ m; *right images* – detail of two apoptotic cells (cells A and B), triggered after 3MA treatment.





**Supplementary Figure 5** Rapamycin potentiates the pro-senescent effect of TMZ in glioma cells. U87 cells were treated with RAPA as described in Fig. 6 A,F and tested for autophagy. **(A and B)**. Percentage of AO-positive cells and relative AO red intensity of cells treated with RAPA 100 nM at D5, as showed in Fig. 6a. **(C)** GFP-LC3 dots formation assay assessed 0, 2 and 3 days after TMZ treatment, as showed in Fig. 6f; scale bar: 20  $\mu$ m. **(D and E)** Percentage of AO-positive and relative AO red intensity of cells treated with RAPA 100 nM 24h previous to TMZ treatment, as showed in Fig. 6f.

## CAPÍTULO IV

### ***SLEEP OR LET DIE: TWO SIDES OF THE SAME COIN IN THE INHIBITION OF AUTOPHAGY***

#### **APRESENTAÇÃO**

A idéia do comentário apresentado neste capítulo surgiu a partir do desenvolvimento da parte experimental central, apresentada no capítulo anterior. Revisando a literatura acerca da conexão de autofagia e senescência, encontramos diversos trabalhos que apresentavam ensaios incompletos, o que prejudicou a interpretação ou conclusões baseadas nos resultados. Na maioria destes trabalhos foram utilizados inibidores de autofagia, mas o número de células e a indução de morte celular não foram avaliadas. Desse modo, aqueles trabalhos que mostram redução da autofagia e redução concomitante da senescência apresentam o viés de que algumas células poderiam estar sendo eliminadas por algum mecanismo de morte celular.

Este comentário será submetido à revista *Autophagy*.

## ***SLEEP OR LET DIE: TWO SIDES OF THE SAME COIN IN THE INHIBITION OF AUTOPHAGY***

Eduardo Cremonese Filippi-Chiela<sup>1</sup>, Guido Lenz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biophysics and Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

### **Abstract**

The dual role of autophagy in eukaryotic cells makes necessary the use of autophagy inhibitors to define its function. Due to the modulation exerted by autophagy in cell senescence, cell cycle and cell death, inhibition of autophagy may lead to several consequences in these mechanisms and, consequently, in cell fate. Here, we propose that the study of the role of autophagy in a given context requires a careful analysis of these mechanisms in an integrated manner, to avoid the misinterpretation of data. This aspect is even more necessary considering the connection between autophagy and cell cycle or senescence, since the induction of cell death in parallel after autophagy inhibition may hamper some conclusions. We reviewed the main studies concerning these connections, which have experienced a great increase due to the key role that has been attributed to these mechanisms on human health and disease.

**Key words:** autophagy; cell death; apoptosis; senescence; cell cycle; 3-methyladenin; cloroquine; bafilomycin; Atg

**Abbreviations list:** 3-MA, 3-methyladenin; CQ, chloroquine; HCQ, hydroxychloroquine; BafA1 (Bafilomycin A1)

Recent years have experienced a burst of studies concerning the connection of autophagy with others cell growth and death mechanisms. Among these interplays, the ones involving apoptosis, cell cycle and senescence are the most relevant. However, literature is poor and inconclusive concerning these interplays in an integrated way, and some key questions remain unsolved, such as: how do several cellular mechanisms that are activated by a single signal interact? How much information can be harnessed from heterogeneous populations of cells in which one of the responses induced by this treatment is inhibited? How to design experiments and analyze data from these approaches to avoid misinterpretation? That's what we discuss here.

Autophagy has a dual role in eukaryotic cells. Depending on the environmental and cellular context that it is triggered, autophagy can mediate cell adaptation and survival to stressful conditions but, on the other hand, can contribute to cell death<sup>1-2</sup>. Until the mid-2000s, autophagy was used almost without distinction with autophagic cell death being considered as part of the toxicity induced by all treatments, as showed by initial review articles<sup>3</sup>. From that time to now, the knowledge about the mechanism increased dramatically and the concept of autophagic cell death was demystified<sup>4-5</sup>. The current state of art point to autophagy as contributing to cell adaptation and survival in the majority of cell types and models<sup>6</sup>. Indeed, autophagy also seems to contribute to cell cycle arrest and senescence<sup>7-9</sup>, despite no data definitely showing this connection or an interdependence between these

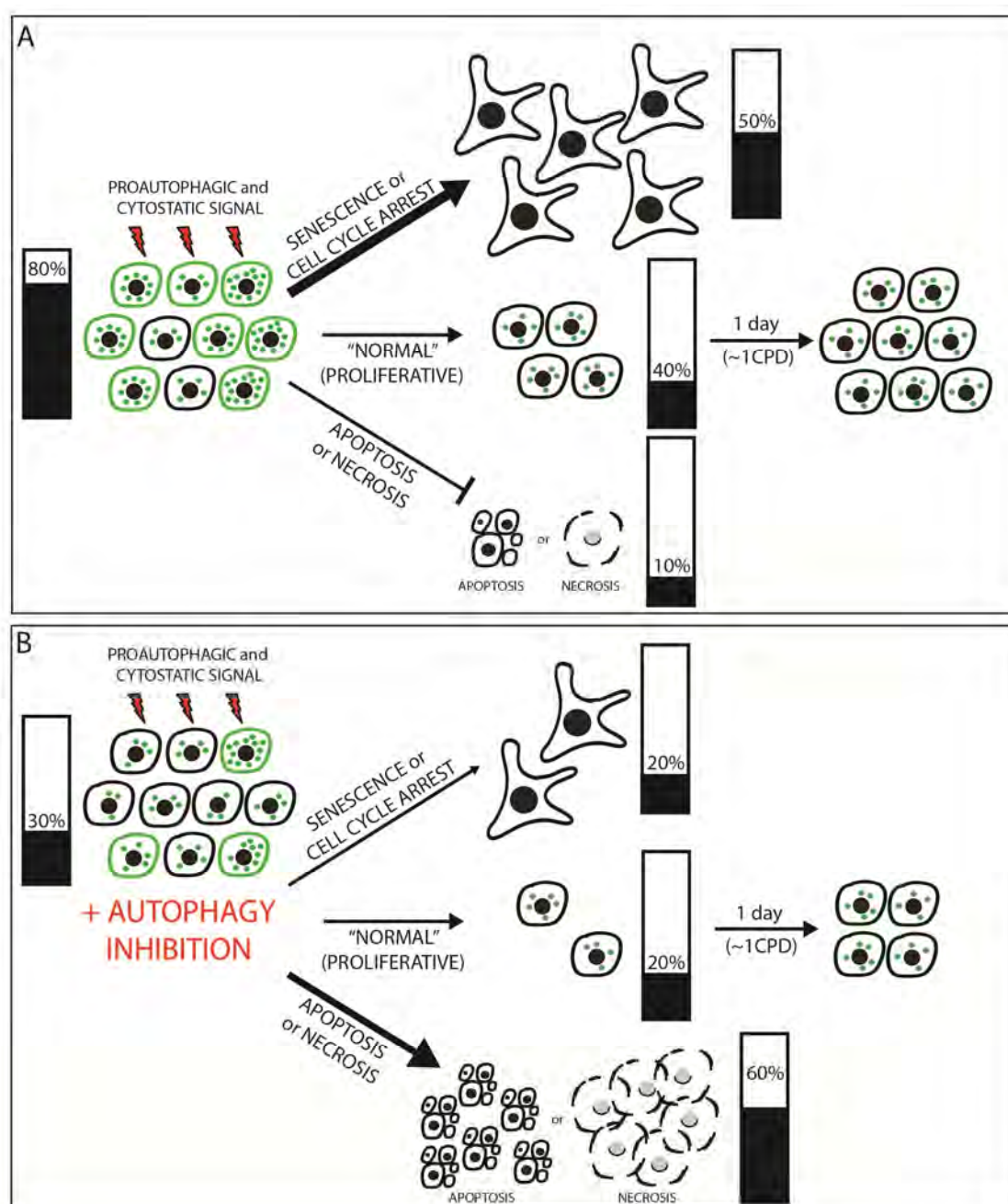
mechanisms<sup>10</sup>. Autophagy, apoptosis, cell cycle alterations and senescence can be triggered by a single stress inductor, but with different kinetics<sup>7-11</sup>. Thus, pro-death signals may also be present in arrested or senescent cells but suppressed by pro-survival mechanisms, among which is autophagy<sup>12</sup>. The interest on the functional connections between these mechanisms has been propelled by the key role that autophagy and senescence have received in several physiological and pathological contexts, such as aging, neurodegenerative diseases and cancer<sup>13-14</sup>.

Due to the dual aspect of autophagy on cell homeostasis, the evaluation of its role fundamentally requires its inhibition. This has been done through pharmacological treatment or genetic manipulation of Atg genes, to specifically suppress autophagy at different steps of the mechanism, as fully reviewed<sup>15</sup>. Inhibition of autophagosome formation has been achieved mainly through treatment with 3-methyladenine (3MA), wortmannin, spautin or shRNA to Atg genes, such as Atg1 (Ulk1), Atg4, Atg5, Atg6 (beclin-1), Atg7 or Atg12. Inhibition of autophagolysosomes formation, in turn, has been usually achieved pharmacologically through inhibition of lysosome acidification using cloroquine (CQ), hydroxicloroquine (HCQ) and Bafilomycin A1 (BafA1). Indeed, the use of these modulators has allowed the study of the role of autophagy in several physiological and pathological contexts.

However, it is important that authors keep in mind that autophagy modulation, even with specific targets such as iRNA for Atgs, may also interfere in others mechanisms due to the central role of autophagy in cell mechanisms. In this sense, to avoid misinterpretation of results it is fundamental that experiments performed to assess the role of autophagy, mainly considering its interaction with senescence and cell cycle, include the analysis of cell number, cell morphology and cell death mechanisms, such as apoptosis and necrosis. To illustrate this, we present a representative effect of autophagy inhibition in cells exposed to a proautophagic treatment, in an integrated manner with other cell mechanisms (**Figure 1**). After treatment, cells triggered autophagy, which can contribute to cell survival through (i) providing some energetic precursors to support metabolic requirements, (ii) elimination of pro-apoptotic intracellular signals or (iii) contributing to the turnover of injured cell components. As a consequence, autophagy constitutes a context that is permissive to cell cycle arrest maintenance or long term senescence entry through avoiding cell death. As a final fate, part of these cells remains alive and proliferative, while others enter in senescence and a small percentage die through apoptosis or necrosis (**Fig. 1A**). On the other hand, when cytoprotective autophagy is inhibited, cell death is triggered leading to a relative decrease in senescence entry or cell cycle arrest. As a general consequence, the final number of cells is reduced (**Fig. 1B**). Thus, authors could wrongly conclude, if assessing only senescence or cell cycle in the context of autophagy inhibition, that autophagy is fundamental to cell cycle arrest and senescence entry. Actually, autophagy was protecting cells from death, thus enabling cell cycle arrest and senescence entry as backup mechanisms. Then, if in this model authors had evaluated cell number, the dominant cytoprotective effect of autophagy would have been observed.

---

**Figure 1** - Representative model of the effect of autophagy suppression in cell growth and death mechanisms. **(A)** A stressful, proautophagic and cytostatic condition induces autophagy in 80% of cells. This autophagy contributes to cell survival, allowing 50% of cells achieve long term senescence. In addition, 10% of cells die by apoptosis or necrosis, while 40% of cells are not affected by treatment. The conclusion of this context is that the mechanism of action of the indicated condition involves autophagy activation and senescence entry in this population of cells. However, no conclusion about the interaction between this mechanism is possible based solely in this data. **(B)** In the same proautophagic context, autophagy inhibition deviates 60% of cells to cell death, due to the suppression of cytoprotection conferred by autophagy to those cells. As a consequence, some cells that would enter in senescence die due to the absence of autophagy, leading to a relative reduction of the percentage of senescent cells and also a reduction in cell number. In this sense, the evaluation of senescence only could lead to the wrong conclusion that autophagy mediates senescence entry, while in true autophagy avoid cell death and is permissive to senescence. In the same way, the absence of cell number analysis impairs the evaluation of what approach result in higher toxicity.



With this in mind, we summarize the main works that evaluated the role of autophagy on cell fate considering more than one mechanism of cell death and growth inhibition (**Table 1**). In several of these works the conclusion about the effect of a given treatment is impaired by the lack of some key data. This is more critical in studies that evaluate the role of autophagy in senescence or cell cycle, in which some results raise the question whether cell death was not being induced in parallel after autophagy inhibition. In fact, inhibition of autophagy may deviate some cells to cell death, leading to a relative reduction of senescent or cell cycle arrested cells, as suggested by several works from Table 1<sup>11, 16-18</sup>. In these cases, the conclusion that autophagy mediates or is fundamental to cell senescence or cell cycle arrest, based solely on the percentage of cells presenting these phenotypes, is biased. Indeed, autophagy probably may allow cells to remain arrested or to enter in senescence, which usually is the long-term response of injured cells that resisted to treatments. Actually, the effect of autophagy in preventing apoptosis is dominant in several models, and the majority of the studies did not show the consequence of autophagy inhibition on cell number, which should be fundamental in basic pharmacologic studies.

**TABLE 1 - Review of main works that used autophagy inhibition and consequences of this inhibition.**

	Autophagy Inhibition*	Autophagy inhibitor	Effect of autophagy inhibition (% of alteration and method used)	Treatment	Cells	Data lacking	Ref
<b>P H A R M A C O L O G I C</b>	↓65% (AO cytom. e microsc.)	3MA 5mM 1h PreT	↑ Apo - 15% (Anex) ↑ Necr - 5% (PI) ↓ Senesc - 50% (bgal)	Imidozoacridinone C1311, 7days	A549 lung cancer	Cell number	16
	↓55% (AO cytom. and microsc.)	3MA 5mM 1h PreT	↑ Necr - 16% (PI) ↓ Apo - from 5% to 3% (PI) ↓ Senesc - 30% (βgal)	Imidozoacridinone C1311, 7days	H460 lung cancer	Cell number	16
	Not shown	3MA 10mM (no time)	↑ Apo 12% (Anex) ↓ Senesc - 3-fold (βgal)	Glycated collagen I (GC)	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)	Proof of 3MA efficacy; cell number	17
	↓ LC3 I/II wb	3MA 10mM, from day 3 to 5 after Temozolomide treatment	↑ Cell death with signs of micronuclei - 40% (microscopy)	Temozolomide 100 μM, 3h	U251 glioma	Cell number; specific cell death	25
	↓ pULK1 wb	3MA 10mM (no time)	↑ Apo - 10% (Sub-G1)	UV irradiation and p18-CycE (a product of cyclin E cleavage)	NCI-H1299 lung cancer	Cell number; apoptosis assays	11
	↓ 3-folds LC3 I/II conversion (wb) ↓ 14% (AO cytom)	3MA 2mM 1h PreT	↑ Apo - 30% Apo (Anex) ↓ CC arrest (S and G2/M) - 22%	Resveratrol, 24h and 48h	U87 glioma	Chronic assays	18
	<b>CQ</b> - ↓34% (AO cytom.); ↑p62 <b>3MA</b> - ↓ 42% (AO cytom.); ↑p62	3MA 5mM, 1h PreT CQ 5μM, 1h PreT	↓ Senesc - only demonstrative, not quantified (βgal, p21)	Adriamycin	MCF7 human breast cancer	Cell number and cell death	8
	Autophagy Inhibition*	Autophagy inhibitor	Effect of autophagy inhibition (% of alteration and method used)	Treatment	Cells	Data lacking	Ref
<b>G E N E T I C</b>	↓ LC3 I/II conversion (wb)	Atg5 shRNA Atg7 shRNA	Atg5 shRNA - ↓ Senesc - 20% (bgal); ↑ 5% BrdU Atg7 shRNA - ↓ Senesc - 18% (bgal)	Ras overexpression	IMR90 diploid fibroblasts	Cell number and cell death assays	13
	↓ 18% (AO cytom.)	Atg7 shRNA	↑ Apo - 13% (Sub-G1) ↓ Senesc - 1.7 fold (bgal) ↓ Surviving Fraction	UV irradiation and p18-CycE (a product of cyclin E cleavage)	NCI-H1299 Lung cancer	Cell number and cell death assays	11
	↓ LC3 I/II conversion (wb)	Atg5 shRNA	↓ Senesc - 18% (bgal) ↑ Proliferative cells - 6% (BrdU)	H2O2	W138 human diploid fibroblasts	Cell number and cell death	9
	Atg5 shRNA - ↓46% (AO cytom.) Atg7 shRNA - ↓53% (AO cytom.)	Atg5 shRNA Atg7 shRNA	Atg5 shRNA - ↓ Senesc - 8% (bgal) Atg7 shRNA - ↓ Senesc - 12% (bgal)	Adriamycin	MCF7 human breast cancer	Cell number and cell death	8
	↓ 30% (AO cytom.); ↑ p62	Atg5 shRNA	↓ Senesc - 9% (bgal)	Cisplatin	MCF7 human breast cancer	Cell number and cell death	8

\*some papers did not quantify some experiments to proof autophagy inhibition, only including western blot.

**Abbreviations:** AO: Acridine Orange (AO) assay; wb: western blot; Cytom.: flow cytometry; Microsc.: microscopy; PreT: pre-treatment, Senesc - senescence; CC - cell cycle; Apo - apoptosis; Necr - necrosis

The complete evaluation of cell death mechanisms after autophagy inhibition in basic research may also provide important insights concerning the therapeutic potential of new drugs or cocktails for cancer. For instance, the imidozoacridinone C1311 induced similar levels of autophagy in two human lung cancer cells lines. Inhibition of autophagy, however, triggered apoptosis in one cell type (A549 cells) but necrosis in the other one (H460 cells)<sup>16</sup>. If these results were corroborated in pre-clinical tests, inhibition of autophagy should not be a good approach for various types of cancers, since necrotic cell death is correlated with poor prognosis<sup>19-22</sup>. This aspect is also important because autophagy inhibition has emerged as an alternative to increase the toxicity of chemotherapeutics<sup>23</sup>, which has propelled some clinical trials to test CQ and HCQ in combination to other chemotherapeutics<sup>24</sup>. Thus, the complete characterization of the effect of autophagy inhibition in cancer cells, as suggested here, may permit the rational design of therapeutic combinations in an attempt to improve the efficacy of treatments and avoid unexpected side effects.

Despite great advances in recent years, the role of autophagy in several mechanisms and responses of eukaryotic cells is far from clear. If, in one hand, the interplay between autophagy and apoptosis is well characterized, on the other hand the effect of autophagy on cell cycle dynamics and senescence remains very obscure, as recently stated<sup>10</sup>. Since these mechanisms seem to be involved in several contexts in human health and disease, it is plausible to assume that the connection between them will be extensively explored in the coming years. Due to this, it is important to carefully plan basic investigations concerning the role of autophagy on senescence and cell cycle, to avoid misinterpretation of data that could undermine the advances concerning the therapeutic use of this connection.

### **Acknowledgements**

This work was supported by CNPq, 472512/2011-0; ICGEB BRA11/01, Pronex-Fapergs 10/0044-3 and FAPERGS/PRONEN 11/2072-2. ECFC, MMBS, MPT and GL are or were recipient of CNPq fellowships.

### **Disclosure of Potential Conflicts of Interest**

No potential conflicts of interest were disclosed

### **REFERENCES**

1. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:505-10.
2. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306:990-5.
3. Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy. *Autophagy* 2006; 2:85-90.
4. Levine B, Kroemer G. Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ* 2009; 16:1-2.
5. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:1004-10.
6. Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P. Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* 2013; 19:428-46.

7. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803.
8. Goehle RW, Di X, Sharma K, Bristol ML, Henderson SC, Valerie K, et al. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 343:763-78.
9. Luo Y, Zou P, Zou J, Wang J, Zhou D, Liu L. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK $\alpha$  dependent manner. *Exp Gerontol* 2011; 46:860-7.
10. Gewirtz DA. Autophagy and senescence in cancer therapy. *J Cell Phys*. 2014; 229:6-9.
11. Singh K, Matsuyama S, Drazba JA, Almasan A. Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. *Autophagy* 2012; 8:236-51.
12. Gewirtz DA. Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* 2013; 9:808-12.
13. Young AR, Narita M. Connecting autophagy to senescence in pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:234-40.
14. Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res* 2014; 24:69-79.
15. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 2012; 8:445-544.
16. Polewska J, Skwarska A, Augustin E, Konopa J. DNA-damaging imidazoacridinone C-1311 induces autophagy followed by irreversible growth arrest and senescence in human lung cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 346:393-405.
17. Patschan S, Chen J, Polotskaia A, Mendeleev N, Cheng J, Patschan D, et al. Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H1119-29.
18. 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:e20849.
19. Bachmann IM, Ladstein RG, Straume O, Naumov GN, Akslen LA. Tumor necrosis is associated with increased  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin expression and poor prognosis in nodular cutaneous melanomas. *BMC Cancer* 2008; 8:362.
20. Richards CH, Mohammed Z, Qayyum T, Horgan PG, McMillan DC. The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review. *Future Oncol* 2011; 7:1223-35.
21. Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O'Byrne KJ. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer* 2002; 37:235-40.
22. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1999; 79:991-5.



23. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2013; 4:e838.
24. Townsend KN, Hughson LR, Schlie K, Poon VI, Westerback A, Lum JJ. Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity. *Immunol Rev* 2012; 249:176-94.
25. 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; 14:548-58.

## CAPÍTULO V

# KINETIC ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN DNA DAMAGE-INDUCED SENESENCE *IN VITRO*

### APRESENTAÇÃO

A análise de senescência *in vitro* é limitada. O principal marcador utilizado é o aumento da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase ácida associada à senescência (SA- $\beta$ -gal). Outras alterações morfológicas também são evidenciadas, como aumento das áreas nuclear e celular, bem como surgimento de prolongamentos e surgimento de foci intranucleares de heterocromatina associados à senescência.

Com o desenvolvimento da Análise Morfométrica Nuclear (NMA), apresentada nos capítulos I e II da presente tese, e utilização do NMA no capítulo IV, nós observamos a dinâmica de alteração nuclear ao longo do desenvolvimento de senescência. Dessa forma, nós sugerimos neste comentário que a marcação com SA- $\beta$ -gal pode gerar resultados falso-negativos, uma vez que é um marcador tardio da senescência celular. Por outro lado, o aumento do tamanho nuclear é uma alteração inicial neste mecanismo. Aqui, discutimos as alterações morfológicas e moleculares que ocorrem ao longo do tempo durante o estabelecimento da senescência.

Este comentário será submetido à revista *Aging Cell* no formato de *short take*.

## KINETIC ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN DNA DAMAGE-INDUCED SENESCENCE *IN VITRO*

Eduardo Cremonese Filippi-Chiela<sup>1</sup>; Guido Lenz<sup>1,2\*</sup>

*1 – Department of Biophysics, 2 – Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

### Abstract

The irreversible cell growth arrest that characterizes senescent cells *in vitro* is accompanied by morphologic, molecular and metabolic alterations. However, the kinetics of occurrence of these alterations is not clear. Here, we assessed the proliferative capacity, cell area, nuclear area and morphometry, cell cycle, the activity of SA- $\beta$ -gal and levels of key proteins related to senescence and cell proliferation over a period of 7 days. We found that nuclear enlargement, which highly correlated with cell enlargement, occurs early after DNA damage, while levels of p21 and SA- $\beta$ -gal, in turn, increased later. Despite different kinetics, all markers highly negatively correlated with Cumulative Population Doubling growth curve. We also discuss the key aspects of the main senescence markers as well as its capacity to differentiate transitory cell cycle arrest from senescence. After a thorough review, we found that morphological alterations (nuclear and cell enlargement and SAHF formation) are the most specific markers to distinguish senescence from transitory cell cycle arrest. At last, we reinforce that the planning of senescence studies may lead into account both the specificity and the kinetics of senescence hallmarks to avoid false results of data misinterpretation.

**Key words:** Senescence; SA- $\beta$ -gal; nuclear morphometry; p21; cell area; nuclear area

Somatic cells stop their proliferation in response to stressful conditions and enter in a senescent state, which is accompanied by morphologic, molecular and metabolic alterations (Cho et al. 2011; de Jesus & Blasco 2012). Senescence occurs due to cell aging or after induction through stimuli that normally include DNA damage, such as cell replication, genomic injury, increase of ROS or oncogene overexpression (Kuilman et al. 2010; Rodier & Campisi 2011). However, senescence can be induced even in the absence of detectable DNA breaks like after ATR activation (Toledo et al. 2008), PI3K-Akt overactivation (Astle et al. 2012), adenovirus infection (Fragkos et al. 2009) or pharmacological treatments (Pospelova et al. 2009; Zamin et al. 2009; Filippi-Chiela et al. 2013). Senescence has a primary role in aging and cancer suppression (Rodier & Campisi 2011), and has gain some attention in neurodegeneration (Luo et al. 2010), cardiovascular diseases (Kovacic et al. 2011) and cancer (Collado et al. 2007; Campisi 2013).

In general, senescence (Table 1) is characterized by the arrest of population growth, which can be accessed through growth curves that consider the proliferative capacity of cells. *In vitro*, senescent cells present extensions, become enlarged, flattened and presented enlarged nuclei, which highly correlated with loss of proliferative capacity (Mitsui & Schneider 1976). They also present Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF) (Narita et al. 2003) and foci of histone  $\gamma$ H2A.X, a marker of DNA damage (Zhang et al. 2005; Funayama 2007). Molecular markers include mediators of stress response such as p53 (Bond et al. 1994; Serrano et al. 1997) and  $\gamma$ H2A.X (Wang et al. 2009), hipophosphorylated Retinoblastoma protein (pRb) (Shi et al. 2013) and inhibitors of CDKs or cyclin-CDKs complexes (Kuilman et al. 2010), mainly p21 (Tahara et al. 1995; Brown et al. 1997) and p16(INK4a) (Afshari et al. 1993; Serrano et al. 1997; Krishnamurthy et al. 2004). Metabolically, senescent cells accumulate the lysosomal enzyme beta-galactosidase (Senescent-Associated beta-Galactosidase, SA- $\beta$ -Gal) (Dimri et al. 1995).

	ASSAY *	Q	S	KEY CONCEPTS AND CHARACTERISTICS	FALSE NEGATIVES	FALSE POSITIVES																																												
C E L L  G R O W T H	CPD or PDT	+	++	Number of cells has to stabilize and time to duplicate the population has to increase. It is important to keep in mind that the time necessary to reach the stabilization of cell number varies depending on the cell type and the inducer of senescence, and may take up to 30 weeks (Dulic <i>et al.</i> 2000).	Despite a $\Delta$ CPD that suggests senescence after a treatment (T), the averaged $\Delta$ CPD can be composed by a subpopulation of proliferative cells (T.1, $\Delta$ CPD+), and another subpopulation that dies after treatment (T.2, $\Delta$ CPD-). The presence of T.1 and T.2 subpopulations can be elucidated by BrdU and specific cell death assays.	High proportion of quiescent cells, which can remain arrested at the cell cycle for a long term but without entering senescence (e.g. differentiated cells or cells exposed to stressful environment). A stable proportion of cell death that maintains the population stable.																																												
					<table border="1"> <caption>Cumulative Population Doubling (CPD) over 7 days</caption> <thead> <tr> <th>Days</th> <th>CTR</th> <th>T.1 (<math>\Delta</math>CPD)</th> <th>T (<math>\Delta</math>CPD)</th> <th>T.2 (<math>\Delta</math>CPD)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>1</td><td>1.5</td><td>1.5</td><td>1.5</td><td>1.5</td></tr> <tr><td>2</td><td>3.0</td><td>3.0</td><td>3.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>3</td><td>4.5</td><td>4.0</td><td>3.0</td><td>3.0</td></tr> <tr><td>4</td><td>5.5</td><td>4.5</td><td>3.0</td><td>2.5</td></tr> <tr><td>5</td><td>6.0</td><td>4.5</td><td>3.0</td><td>2.0</td></tr> <tr><td>6</td><td>6.5</td><td>4.5</td><td>3.0</td><td>1.5</td></tr> <tr><td>7</td><td>6.5</td><td>4.5</td><td>3.0</td><td>1.5</td></tr> </tbody> </table>	Days	CTR	T.1 ( $\Delta$ CPD)	T ( $\Delta$ CPD)	T.2 ( $\Delta$ CPD)	0	0	0	0	0	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	3.0	3.0	3.0	3.0	3	4.5	4.0	3.0	3.0	4	5.5	4.5	3.0	2.5	5	6.0	4.5	3.0	2.0	6	6.5	4.5	3.0	1.5	7	6.5	4.5	3.0	1.5
Days	CTR	T.1 ( $\Delta$ CPD)	T ( $\Delta$ CPD)	T.2 ( $\Delta$ CPD)																																														
0	0	0	0	0																																														
1	1.5	1.5	1.5	1.5																																														
2	3.0	3.0	3.0	3.0																																														
3	4.5	4.0	3.0	3.0																																														
4	5.5	4.5	3.0	2.5																																														
5	6.0	4.5	3.0	2.0																																														
6	6.5	4.5	3.0	1.5																																														
7	6.5	4.5	3.0	1.5																																														
M O L E C U L A R	p21 increase	+	+	P21 is a major Cyclin-dependent Kinase Inhibitor (CKI) induced during G1, S or G2/M cell cycle arrest and senescence.	P21-independent senescence (Pantoja & Serrano 1999; Groth <i>et al.</i> 2000), such as Ras overexpression in murine fibroblasts or fibroblasts expressing HPV-16 E6 (Dulic <i>et al.</i> 2000). Its levels can decrease after senescence establishment (Alcorta <i>et al.</i> 1996; Robles & Adami 1998; Goodwin <i>et al.</i> 2000).	P21 controls transient quiescence entry through suppression of CDK2 activity at the end of M phase (Spencer <i>et al.</i> 2013). It also can reach maximum levels early during cell cycle arrest (Blajeski <i>et al.</i> 2002; Li <i>et al.</i> 2012) and also increases during transient arrest (Barnouin <i>et al.</i> 2002).																																												
	p16 increase	+	+	P16 is a major CDK4/6 inhibitor induced during G1 cell cycle arrest and senescence. It is induced by telomere dysfunction (Jacobs & de Lange 2004) but increases only after p21 in replicative senescence (Alcorta <i>et al.</i> 1996; Stein <i>et al.</i> 1999). Not commonly expressed by quiescent or differentiated cells (Alcorta <i>et al.</i> 1996; Hara <i>et al.</i> 1996; Serrano <i>et al.</i> 1997; Stein <i>et al.</i> 1999).	There is some p16-independent mechanisms of senescence induction, such as through chromatin remodeling (Prieur <i>et al.</i> 2011) or in OIS induced by overexpression of Raf-1 (Olsen <i>et al.</i> 2002). Transiently induced after ionizing radiation, which induces senescence (Wang <i>et al.</i> 2006), P16 usually increases as a final	None found																																												
	pRB hipoph.	+	+	RB is a key controller of cell cycle through binding to E2F transcription factors, which are fundamental to G1 to S and G2 to M transitions, and DNA replication. When hiphosphorylated, pRB stays bound and inhibiting E2F, blocking cell cycle (Weinberg 1995; Talluri <i>et al.</i> 2010).	Despite being a key component of checkpoints, senescence can be induced in a Rb-independent way (Lehmann <i>et al.</i> 2008).	Fully reduced with only 24h of serum deprivation (Gao <i>et al.</i> 2004; Johnson <i>et al.</i> 2010) or after cyclin D-CDK4/6 inhibition (Fry <i>et al.</i> 2004), which lead to transitory G1 arrest. A conflicting context with high levels of hyperphosphorylated in senescent cells has being described (Dulic <i>et al.</i> 2000).																																												
	$\gamma$ H2A.X	+	+	H2A.X histone is the initial DNA damage sensor (for exogenous DNA injury or telomeres shortening), as well as being activated by ROS or oncogenic activation.	Increase already 24h after adenovirus infection, without inducing DNA damage. It is dispensable to AAV-foci formation and maintenance and for Chk1 increment, but is important for p21 increase and CC arrest (absence of H2AX lead to cell death by mitotic catastrophe) (Fragkos <i>et al.</i> 2009); increase transiently after DNA damage, followed by a long term reduction (Fig. S1A). P21 suppresses radiation-induced H2A.X phosphorylation (Gabai <i>et al.</i> 2010).	Transiently induced after DNA damage, followed by DNA repair and no cell death or proliferation arrest (Huo <i>et al.</i> 2011). Transiently induced early after TRAIL treatment (Solier <i>et al.</i> 2009). Increase in response to alterations in NaCl concentration and DNA damage in proliferative cells (Dmitrieva & Burg 2004; Dmitrieva <i>et al.</i> 2004) and early after adenovirus infection (Fragkos <i>et al.</i> 2009). Stains cardiomyocytes from cardiomyopathy (Siggins <i>et al.</i> 2012).																																												

(Table 1 - continuation)

	ASSAY *	Q	S	KEY CONCEPTS AND CHARACTERISTICS	FALSE NEGATIVES	FALSE POSITIVES
M E T A B O L I C	SA- $\beta$ -Gal	+	++	SA- $\beta$ -Gal is a lysosomal enzyme increased in senescent cells, both in vitro and in vivo (Dimri <i>et al.</i> 1995).	None found	Marks positively to cells contact-inhibited or starved from serum for 2 days (increase from less than 10% to 60% and 100% of positively stained cells, respectively; subculture of confluent cells reduced the percentage of staining to control levels) (Yang & Hu 2005); marks cells with increased lysosome mass (Kurz <i>et al.</i> 2000).
M O R P H O L O G I C	Nuclear Enlarg.	-	++	Occurs even in the absence of DNA breaks, as shown 3d after Sodium Butyrate treatment (Pospelova <i>et al.</i> 2009), 10d after overactivation of PI3K/Akt pathway (Aistle <i>et al.</i> 2012) and 4d after adenovirus infection (Fragkos <i>et al.</i> 2009) which also induced senescence. Not described <i>in vivo</i> .	None found	None found
	SAHF	-	++	Does not occur in reversible arrested cells (Narita <i>et al.</i> 2003); it is dispensable for senescence (Kosar <i>et al.</i> 2011). Also occurs in vivo (Braig <i>et al.</i> 2005).	None found	None found
	Cell Enlarg.	-	++	Not described <i>in vivo</i> .	None found	None found

\*Abbreviations: Q = QUIESCENCE; S = SENESCENCE; CPD, Cumulative Population Doubling; PDT, Population Doubling Time; Hipoph, hipophosphorylation; SA- $\beta$ -Gal, Senescence-Associated Acid Beta-Galactosidase; Nuclear enlarg. and Cell enlarg., nuclear and cellular enlargement, respectively; SAHF, Senescence-Associated Heterochromatin Foci.

However, few of these features are exclusive of senescent cells, challenging the distinction between senescence and transient cell cycle (CC) arrest (Blagosklonny 2011). Cell cycle distribution with propidium iodide or BrdU staining, for instance, do not allow this differentiation, since cells can enter in quiescence in any phase of CC (Wei *et al.* 1993) and both quiescent or senescent cells do not replicate the DNA. Growth curves, on the other hand, are fundamental to define senescence, but it is important to keep in mind that they represent an average of single cells (Table 1 - insert). Cellular and nuclear enlargement and SAHF formation seems to be the most specific markers to define senescence. Cells increase their area and nucleus during CC, but the nuclear area of quiescent fibroblasts is similar to those from G1 cells, while senescent cells enlarged it (Maeshima *et al.* 2006; Maeshima *et al.* 2010; Maeshima *et al.* 2011). Similarly, quiescent cells reduced the metabolism and cellular functions but do not increase cell size, in opposite to senescent cells (Blagosklonny 2011). Molecularly, the assessment of p21 or p16 levels can also lead to false results, the same occurring to SA- $\beta$ -gal despite its specificity and wide use (Table 1).

With this in mind, we performed the kinetics of senescence markers in human U87 glioma cells treated with the genotoxic agent Temozolomide (TMZ), which we and others have shown as inducing senescence (Hirose *et al.* 2005; Filippi-Chiela *et al.* 2013). Cells were treated for 3h with TMZ 100  $\mu$ M, followed by replating in Drug-Free Medium (DFM) (Fig. S1A). After 3, 5 and 7 days we assessed the levels of p21,  $\gamma$ H2A.X, pCdc2(Y15), cyclin D and pH3(S10) (Fig. S1B), Cumulative Population Doubling (CPD) (Fig. S1C), CC

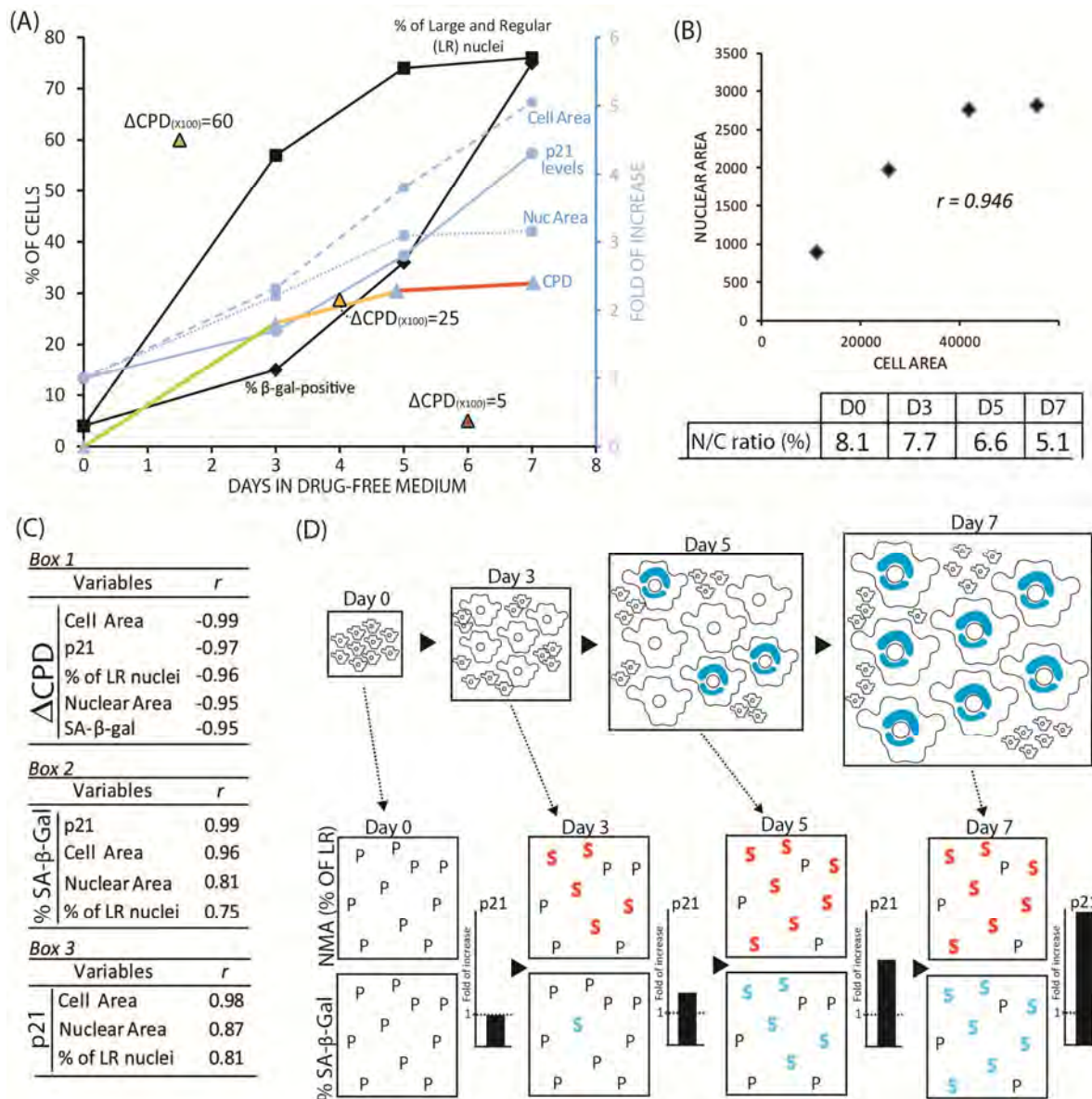
distribution (Fig. S1D), cell and nuclear area (Fig. S1E), SA- $\beta$ -gal (Fig. S1F), and nuclear morphometry (Fig. S1G).

We next defined the  $\Delta$ CPD, *i.e.* the variation of CPD for each interval of analysis, which represents the proliferative capacity of a given population (the closer the averaged  $\Delta$ CPD to zero, the higher the probability of an arrest in cell proliferation – see insert in Table 1).  $\Delta$ CPD confirmed the high reduction of population growth from day 3 onwards. In contrast, the averaged  $\Delta$ CPD to control cells was 0.82 during the same period (*not shown*). Senescence markers increased with different kinetics over 7 days (Fig. 1A). Nuclear area and cell area were altered with high correlation ( $r=0.95$ ), as previously observed in yeast ( $r=0.77$ ). The 'karyoplasmic ratio' (nuclear area *per* cell area ratio) varied from around 6 to 8%, as showed by others (Jorgensen *et al.* 2007; Neumann & Nurse 2007), reaching around 5% at day 7 (Fig. 1B). The percentage of large and regular (LR) nuclei and the fold of increase in nuclear and cell area increased early after DNA damage while p21 and SA- $\beta$ -gal increased later (Fig. 1A). Despite presenting different kinetics, all senescence markers presented high correlation with  $\Delta$ CPD (Fig. 1C). Similarly, in a model of senescence induced by DNA damage in breast cancer cells, cell enlargement occurred early, while SA- $\beta$ -gal increased only from day 3 onwards (Cho *et al.* 2011). Thus, it is plausible that this kinetic occurs in general in DNA damage-induced senescence. Furthermore, around 44% of late passage C6 glioma cells (LPC6), which present typical metabolic markers of cell aging (Parker *et al.* 1980), presented enlarged nuclei, in comparison to only 4% in early passage C6 cells. On the other hand, the percentage of SA- $\beta$ -gal cells was around 19% to LPC6 cells, which also presented increased cell area (Pereira *et al.* 2014). This is in agreement with our hypothesis that nuclear and cellular enlargements are initial markers of senescence.

In this sense, it is fundamental to keep in mind that cells can take several days to reach a full senescent phenotype (Stein *et al.* 1999), so that the experimental designs in senescence requires a careful planning. For example, if we had stopped our analysis at day 3 and assessed only CPD, SA- $\beta$ -gal or p21 levels we could erroneously assume that TMZ induced cell cycle arrest and only a slight increase in senescence (Fig. 1D). This would also occur to others (Huang *et al.* 2009; Cho *et al.* 2011). Moreover, some molecular markers, including p21, decline after senescence establishment, as well as some stimuli induce p21- or p16-independent senescence (Table 1). In fact, the molecular definition of senescence is complex. Based on a cell population model and mathematical estimations of senescence Lawless *et al* found that the best combination to predict senescence was the number of Ki67-negative cells containing 5 or more  $\gamma$ H2A.X foci (Lawless *et al.* 2010).

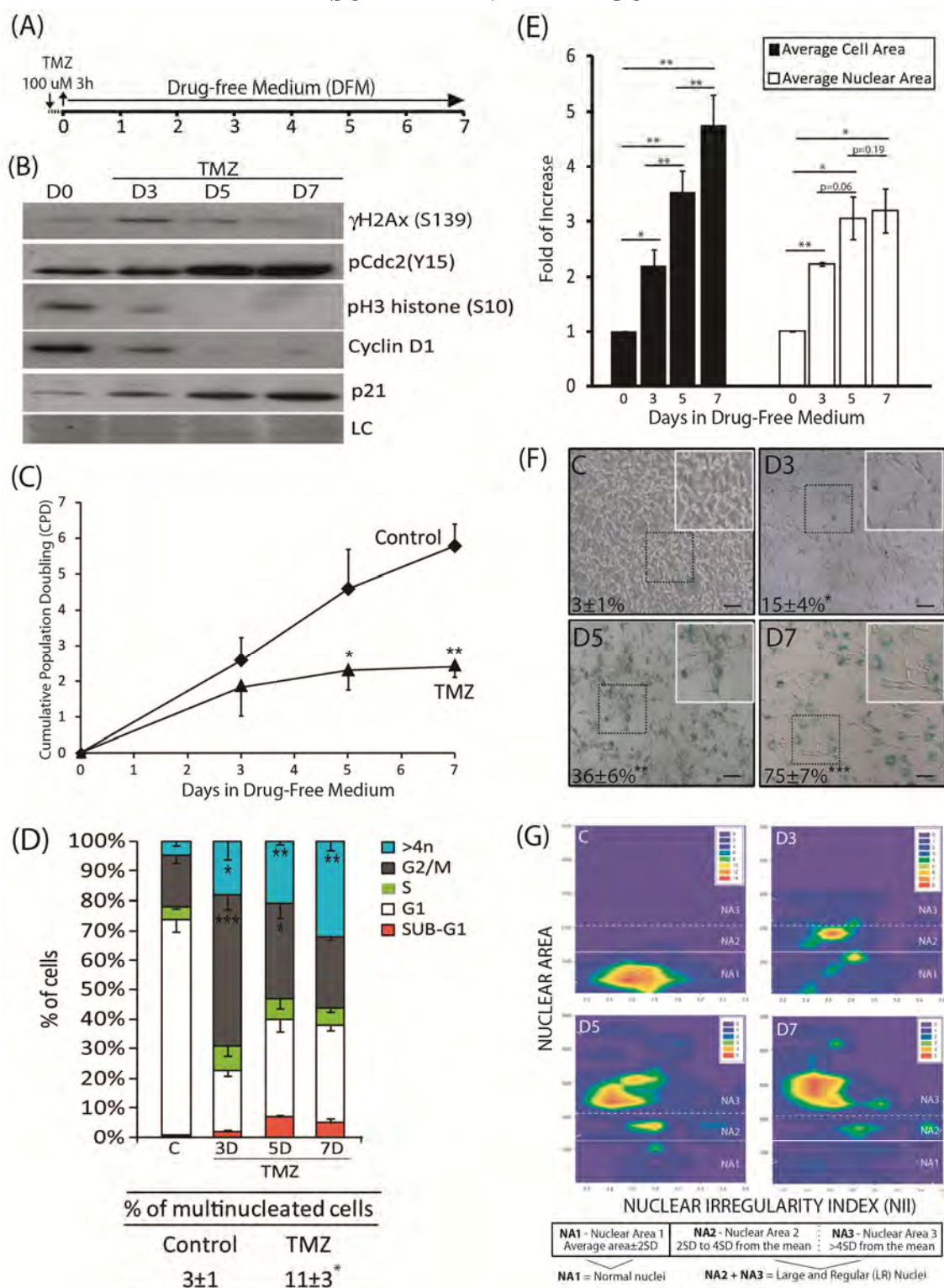
Thus, none of the abovementioned markers ensure senescence alone (Severino *et al.* 2000; Yang & Hu 2005), so that senescent markers may be evaluated in an integrated manner to avoid false results or data misinterpretation. We suggest that authors assess, in addition to growth curve, nuclear parameters as early alterations and SA- $\beta$ -gal as a late marker of senescence. Molecularly, p21 and p16 are the most valuable markers, but authors need to keep in mind the variations that can occur in them during senescence establishment.

**Acknowledgments:** This work was supported by CNPq, 472512/2011-0; ICGEB BRA11/01, Pronex-Fapergs 10/0044-3 and FAPERGS/PRONEN 11/2072-2. The authors declare no competing financial interests.



**Figure 1** Kinetics of senescence markers after DNA damage. (A) Kinetics of senescence hallmarks in U87 glioma cells treated with TMZ as shown in Fig. S1A. Color diamonds represent the delta Cumulative Population Doubling ( $\Delta\text{CPD}$ ) for each interval of CPD curve with similar color.  $\Delta\text{CPD}$  was multiplied by 100 to facilitate data visualization (real values were 0.6, 0.25 and 0.5). (B) (Nuclear area) / (cell area) correlation; *bottom* - percentage of nuclear area in relation to cell area. (C) *Pearson* coefficients concerning the correlation between markers with  $\Delta\text{CPD}$  (Box 1), % of SA- $\beta$ -gal cells (Box 2), and p21 levels (Box 3). (D) *Top* - representative increase of cell and nuclear area (representative of the real fold of increase, in scale). Blue region represents the positive staining for SA- $\beta$ -gal in percentage concerning the real values. *Bottom* - number of senescent cells (S) based in each marker (% of LR nuclei or % of SA- $\beta$ -gal+ cells); P = proliferative cells.

## SUPPLEMENTARY FIGURE



**Supp. Fig. 1** DNA damage induced by TMZ in glioma cells. (A) Cells were treated for 3h with TMZ 100  $\mu$ M, followed by replating in Drug-Free Medium (DFM). (B) At days 3, 5 and 7 we assessed p21, pCdc2 (Y15),  $\gamma$ H2A.X (S139), cyclin D1 and pH3 histone(S10) levels through western blot. (B) Cell cycle distribution at days 3, 5 and 7, and we measured the percentage of multinucleated cells. (C) Number of cells was acquired to the determination of cumulative population doubling (CPD), as described in material and methods. (D) Cell cycle distribution and % of multinucleated cells. (E) Cell and nuclear area. Values are given as fold of increase in relation to control. (F) Cells were also stained for SA- $\beta$ -gal. Numbers represent the percentage of SA- $\beta$ -gal-positive cells. (G) Data from Nuclear Morphometric Analysis are shown as a contour plot. Nuclear areas (NA) were defined based on the average of normal nuclei and thresholds determined by average area $\pm$ 2SD (NA1), 2SD to 4SD from the average (NA2) and more than 4SD from the mean (NA3). NII represents the index of nuclear irregularity, as a measurement of nuclear morphometric alterations that occur overtime. Values on heat maps legends represent the number of cells. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  in relation to control.



## SUPPORTING INFORMATION - EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Cell culture and treatments

Human GBM cell line U87 stably expressing the autophagic marker GFP-LC3 was kindly provided by Carlos F. M. Menck (University of São Paulo, Brazil). Cells were cultured in DMEM low glucose, supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37°C/5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). Temozolomide was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). The drug vehicle DMSO never exceeded 0.5% (v/v).

### Cumulative Population Doubling (CPD)

For cumulative population doubling (CPD), cells were treated with TMZ 100 µM for 3 h, followed by two washes and cell replating in Drug-Free Medium (DFM). After 3, 5 and 7 days in DFM cell number was determined and CPD was calculated as described previously (Zamin *et al.* 2009), through the equation  $PD = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$ , where  $N(t)$  is the number of cells per well at time of count, and  $N(t_0)$  is the initial number of cells. The sum of PDs was then plotted versus time of culture.

### Western Blot

Protein expression and phosphorylation analysis was performed as described (Zamin *et al.* 2006; Zamin *et al.* 2009), with minor modifications. Primary antibodies were purchased from Cell Signaling, Beverly, MA.

### Cell Cycle Analysis

For cell cycle analysis, cells were treated, followed by two washes and cells replating in DFM. After 3, 5 and 7 days in DFM, cells were harvested and fixed in ice-cold ethanol 70% (v/v in PBS) for at least 2 h. Fixed cells were washed with PBS and marked with a solution containing 50 µg/ml Propidium Iodide, 0.1% Triton X-100 and 50 µg/mL RNase for 30 min, in the dark, at room temperature. Marked cells were analyzed using the flow cytometer GUAVA EasyCyte software to evaluate DNA content of cells and, thus, cell cycle distribution of samples.

### Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal or β-gal) assay

Cells were treated, washed twice with PBS and replated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well, in a 12-wells plate. At the indicated time, cells were tested for senescence (Dimri *et al.* 1995). Briefly, cells were washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and incubated with fresh SA-beta-gal staining solution (1 mg/mL X-gal (Sigma), 40 mM citric acid/sodium phosphate (pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, and 2 mM MgCl<sub>2</sub>) for 8 h at 37°C. After, cell nuclei were stained with DAPI 300nM for 30 min in the dark. Results are presented as ratio of SA-β-gal-positive cells to total cells, for at least one hundred cells per treatment per experiment.

### Nuclear Morphometric Assay (NMA) and Contour Plot for NMA

Nuclear morphometry was analyzed using a tool developed by our group (Filippi-Chiela *et al.* 2012). Briefly, cells were treated with TMZ, fixed with 2% paraformaldehyde (v/v in PBS) for 30 min at room temperature and marked with DAPI 300 nM for 30 min at room temperature, followed by quantification of DAPI-stained nuclei using the Software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) or Image J plugin available at [www.ufrgs.br/labsinal/nma](http://www.ufrgs.br/labsinal/nma). Data are presented as a plot of Area versus Nuclear Irregularity Index (NII). Here, we also present a new, alternative presentation of NMA data through a contour plot graph using SigmaPlot (Systat Software, Inc., CA, USA).

### Nuclear and Cell Area Measurement

Nuclear and cell area were measured using the Image Pro Plus 6.0 Software through the magic wand tool to outline cells and nuclei to at least 50 cells per experiment.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted by TTEST for single comparisons of at least three independent experiments; 'p' value under 0.05 was considered significant. Correlation analysis was done using Pearson correlation using the PASW Statistics 18.

## REFERENCES

- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 13742-13747.
- Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK, Haupt Y, Hannan RD, Pearson RB (2012). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene.* **31**, 1949-1962.
- Barnouin K, Dubuisson ML, Child ES, Fernandez de Mattos S, Glassford J, Medema RH, Mann DJ, Lam EW (2002). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem.* **277**, 13761-13770.
- Blajeski AL, Phan VA, Kottke TJ, Kaufmann SH (2002). G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *J Clin Invest.* **110**, 91-99.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature.* **436**, 660-665.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 9363-9367.
- Dmitrieva NI, Burg MB (2004). Living with DNA breaks is an everyday reality for cells adapted to high NaCl. *Cell Cycle.* **3**, 561-563.
- Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB (2004). Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 2317-2322.
- Dulic V, Beney GE, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH (2000). Uncoupling between phenotypic senescence and cell cycle arrest in aging p21-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol.* **20**, 6741-6754.
- Fragkos M, Jurvansuu J, Beard P (2009). H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway. *Mol Cell Biol.* **29**, 2828-2840.
- Filippi-Chiela, E.C., M.M. Oliveira, B. Jurkovski, et al (2012). Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One.* **7**:e42522.
- Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, Albassam M, Zheng X, Leopold WR, Pryer NK, Toogood PL (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther.* **3**, 1427-1438.

- Gabai VL, Sherman MY, Yaglom JA (2010). HSP72 depletion suppresses gammaH2AX activation by genotoxic stresses via p53/p21 signaling. *Oncogene*. **29**, 1952-1962.
- Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH (2004). G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **287**, C281-291.
- Goodwin EC, Yang E, Lee CJ, Lee HW, DiMaio D, Hwang ES (2000). Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 10978-10983.
- Groth A, Weber JD, Willumsen BM, Sherr CJ, Roussel MF (2000). Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases. *J Biol Chem*. **275**, 27473-27480.
- Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*. **16**, 859-867.
- Huo X, Juergens S, Zhang X, Rezaei D, Yu C, Strauch ED, Wang JY, Cheng E, Meyer F, Wang DH, Zhang Q, Spechler SJ, Souza RF (2011). Deoxycholic acid causes DNA damage while inducing apoptotic resistance through NF-kappaB activation in benign Barrett's epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **301**, G278-286.
- Jacobs JJ, de Lange T (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol*. **14**, 2302-2308.
- Johnson N, Bentley J, Wang LZ, Newell DR, Robson CN, Shapiro GI, Curtin NJ (2010). Pre-clinical evaluation of cyclin-dependent kinase 2 and 1 inhibition in anti-estrogen-sensitive and resistant breast cancer cells. *Br J Cancer*. **102**, 342-350.
- Kosar M, Bartkova J, Hubackova S, Hodny Z, Lukas J, Bartek J (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). *Cell Cycle*. **10**, 457-468.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. **113 ( Pt 20)**, 3613-3622.
- Lehmann BD, Brooks AM, Paine MS, Chappell WH, McCubrey JA, Terrian DM (2008). Distinct roles for p107 and p130 in Rb-independent cellular senescence. *Cell Cycle*. **7**, 1262-1268.
- Li X, Wang J, Ye Z, Li JC (2012). Oridonin up-regulates expression of P21 and induces autophagy and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int J Biol Sci*. **8**, 901-912.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. **113**, 703-716.
- Olsen CL, Gardie B, Yaswen P, Stampfer MR (2002). Raf-1-induced growth arrest in human mammary epithelial cells is p16-independent and is overcome in immortal cells during conversion. *Oncogene*. **21**, 6328-6339.
- Pantoja C, Serrano M (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*. **18**, 4974-4982.
- Pospelova TV, Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV (2009). Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle*. **8**, 4112-4118.
- Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaître JM (2011). p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun*. **2**, 473.

- Robles SJ, Adami GR (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*. **16**, 1113-1123.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. **88**, 593-602.
- Siggins L, Figg N, Bennett M, Foo R (2012). Nutrient deprivation regulates DNA damage repair in cardiomyocytes via loss of the base-excision repair enzyme OGG1. *FASEB J*. **26**, 2117-2124.
- Solier S, Sordet O, Kohn KW, Pommier Y (2009). Death receptor-induced activation of the Chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol*. **29**, 68-82.
- Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC, Overton KW, Wang CL, Meyer T (2013). The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell*. **155**, 369-383.
- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. **19**, 2109-2117.
- Talluri S, Isaac CE, Ahmad M, Henley SA, Francis SM, Martens AL, Bremner R, Dick FA (2010). A G1 checkpoint mediated by the retinoblastoma protein that is dispensable in terminal differentiation but essential for senescence. *Mol Cell Biol*. **30**, 948-960.
- Wang Y, Schulte BA, LaRue AC, Ogawa M, Zhou D (2006). Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood*. **107**, 358-366.
- Weinberg RA (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. **81**, 323-330.
- Yang NC, Hu ML (2005). The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp Gerontol*. **40**, 813-819.
- Zamin, L.L., P. Dillenburg-Pilla, R. Argenta-Comiran, A.P. Horn, F. Simao, M. Nassif, D. Gerhardt, R.L. Frozza, and C. Salbego. (2006). Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis*. **24**:170-82.
- Zamin, L.L., E.C. Filippi-Chiela, P. Dillenburg-Pilla, F. Horn, C. Salbego, and G. Lenz. (2009). Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Sci*. **100**:1655-62.

## RESULTADOS ADICIONAIS E DISCUSSÃO INTEGRADA

A presente tese teve, como um dos objetivos centrais, avaliar o papel da autofagia na senescência induzida por dano ao DNA. Para isso, utilizamos células de gliomas tratadas com TMZ como modelo, levando em conta ainda a indução de morte celular neste contexto e após modulação da autofagia. Embasando o presente estudo e corroborando a importância do estudo da interação entre autofagia e senescência, no início de 2014 *Gewirtz* ressaltou que "nenhum trabalho apresentou acompanhamento temporal completo de autofagia e senescência induzidas por um determinado estímulo", bem como que "nenhum trabalho provou definitivamente que a senescência é estritamente dependente de autofagia prévia" (*Gewirtz*, 2014).

A partir dos resultados obtidos no capítulo III e incorporando os conceitos debatidos nos Capítulos IV e V, três hipóteses principais foram geradas na tentativa de explicar os mecanismos que medeiam a interação entre autofagia e senescência celular a partir do dano ao DNA, considerando ainda a indução de morte celular neste contexto: **(i) Hipótese oxidativa**, que sugere um papel central de espécies reativas na resposta à TMZ; **(ii) Hipótese Mitocondrial**, que coloca as mitocôndrias como componentes centrais na resposta à TMZ; e a **(iii) Hipótese da Proteína Atg5**, a qual descreve um possível papel da proteína Atg5 na modulação de autofagia, senescência e apoptose induzidas por TMZ. Estas hipóteses serão discutidas abaixo, juntamente com alguns resultados adicionais e outras seções discutindo os principais resultados obtidos no trabalho. Cada seção apresenta um resumo e, as seções referentes às hipóteses, apresentam as perspectivas.

### i. A Hipótese Oxidativa

#### Resumo

*TMZ induz, concomitante ao dano ao DNA, aumento dos níveis de ROS, os quais medeiam a autofagia e/ou a senescência induzidos pelo agente alquilante.*

No *Capítulo III* da presente tese demonstramos que o tratamento agudo com TMZ disparou autofagia crônica transiente e senescência a longo prazo em células de glioma. Este efeito foi acompanhado por uma ativação também transiente das vias AMPK/Ulk1 e p38 MAPK, enquanto a via Akt/PI3K/mTOR foi reprimida cronicamente.

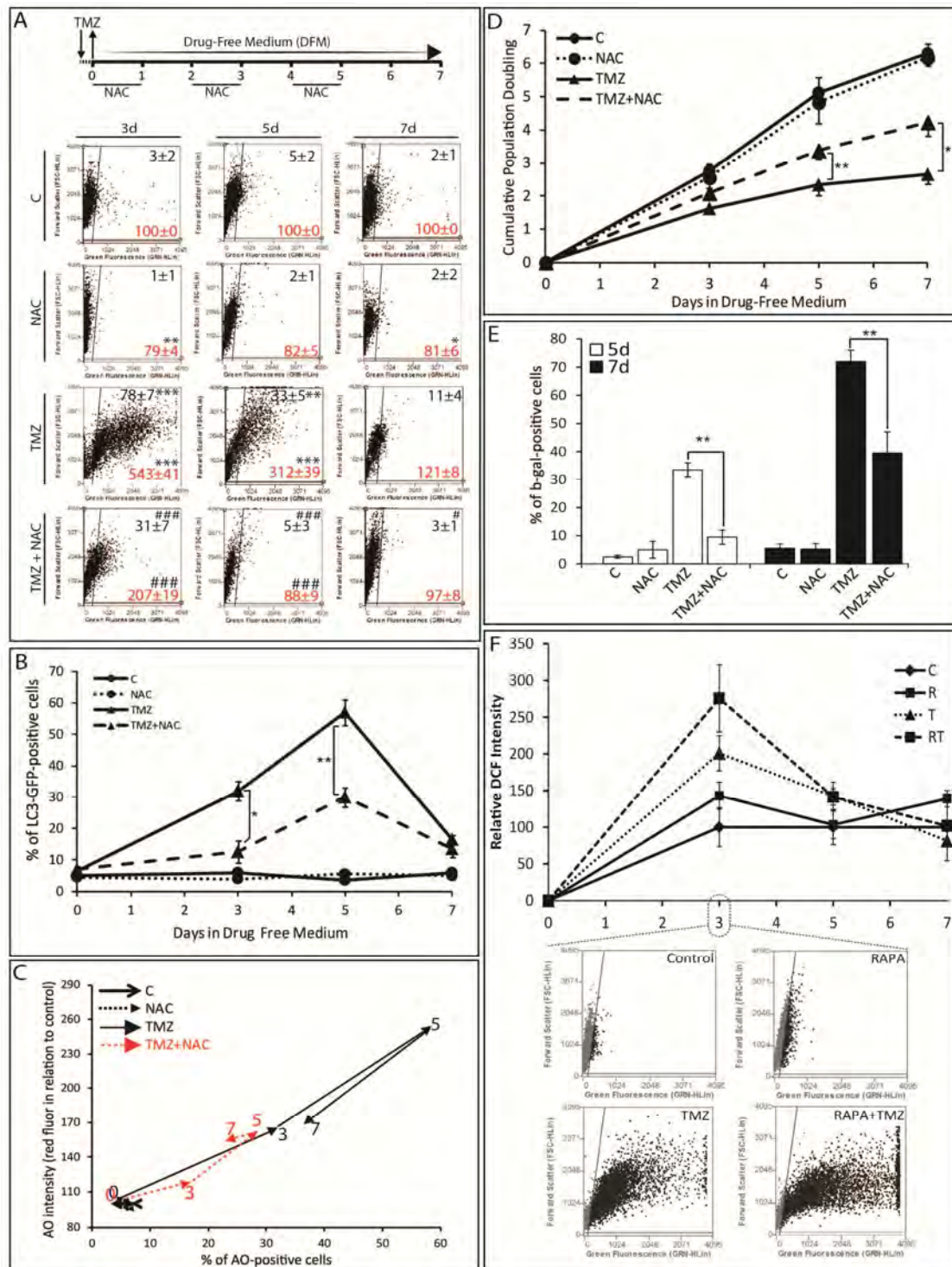
Diversos trabalhos têm demonstrado que indutores de dano ao DNA exercem toxicidade não apenas através da lesão ao genoma, mas também através da produção de ROS (*Li et al.*, 2001; *Bitto et al.*, 2010; *Kang et al.*, 2012; *Lv et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual estes agentes fazem isso, porém, é pouco conhecido, mas parece envolver a ativação da proteína Nox1 (NADPH-oxidase 1), uma das principais mediadoras intracelulares da produção de ROS, pela proteína H2A.X (*Kang et al.*, 2012). As espécies reativas podem alterar componentes celulares incluindo mitocôndrias, membranas celulares, proteínas e o próprio DNA. Neste contexto, autofagia é fundamental para eliminação de organelas e proteína oxidadas com o objetivo de manter a homeostase celular e impedir uma retroalimentação positiva de geração de ROS e aumento do dano celular (*Scherz-Shouval &*

Elazar, 2009). Da mesma forma, células em processo de senescência induzida por diferentes mecanismos, como replicação, superexpressão oncogênica ou outros tratamentos farmacológicos como Resveratrol, também apresentam produção aumentada de ROS em algum momento do processo, usualmente anterior à parada na proliferação (Lee *et al.*, 1999; Colavitti & Finkel, 2005; Heiss *et al.*, 2007; Kuilman *et al.*, 2010). Na senescência induzida por superexpressão de oncogenes, por exemplo, ROS exerce papel central (Lee *et al.*, 1999). Além disso, aumento de ROS pode levar à ativação de AMPK, independente do estado energético celular e da razão AMP/ATP. Da mesma forma, entre as consequências do aumento de ROS intracelulares estão o disparo da autofagia e a senescência.

Assim, testamos a hipótese de que TMZ estaria induzindo, além da DDR, aumento dos níveis intracelulares de ROS, e que estes poderiam estar mediando o efeito da TMZ. De fato, TMZ induziu um aumento transitório dos níveis intracelulares de ROS com pico no D3, como avaliado pela oxidação da molécula DCF e citometria de fluxo, (**Figura 9A**). A supressão do aumento de ROS utilizando o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) (**Figura 9A**) reduziu a porcentagem de células autofágicas (**Figura 9B e 9C**) e restaurou parcialmente a capacidade proliferativa das células (**Figura 9D**). Corroborando estes dados, a porcentagem de células senescentes também foi reduzida com a supressão de ROS (**Figura 9E**), sugerindo que ROS tem um papel importante na indução de autofagia e senescência induzida por TMZ em gliomas. Similar aos nossos resultados, em células de câncer de mama MCF7 o tratamento com Doxorubicina (Doxo), inibidora de topoisomerase II que leva a quebras no DNA, induziu autofagia e senescência em 72h de tratamento, e NAC também reduziu parcialmente a indução de ambos os mecanismos (Goehle *et al.*, 2012). Dessa forma, a resposta integrada de DDR e aumento de ROS parece ser responsável pela indução de autofagia e senescência após tratamento com diferentes tipos de indutores de dano ao DNA.

Quando analisamos os níveis de ROS em células expostas ao cotratamento de RAPA+TMZ, o qual aumentou a entrada em senescência e acelerou o aumento de p21 se comparado à TMZ sozinha, nós observamos que o cotratamento induziu níveis ainda maiores de ROS no dia 3 comparado à TMZ (**Figura 9F**), reforçando a hipótese de que ROS atue como intermediário da indução de autofagia e senescência por agentes indutores de dano ao DNA. Neste sentido, é plausível assumir que, no contexto do cotratamento de TMZ+RAPA, o aumento de ROS, em cooperação com a inibição de mTOR, esteja envolvido no aumento da autofagia e senescência induzida pelo cotratamento TMZ+RAPA.

Além disso, a cinética de indução da proteína p38 MAPK, importante sensor de estresse celular, foi muito semelhante à curva de indução de ROS, com pico no dia 3 seguido de redução. De modo similar, o tratamento de fibroblastos humanos diplóides W138 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disparou ROS e ativou p38. Ainda, estas células aumentaram a expressão de Atg5, a qual mediou tanto o aumento da autofagia quanto o aumento de p21, levando à senescência celular. Neste modelo, entretanto a indução tanto de autofagia quanto de senescência ocorreu de maneira mTOR-independente (Luo, 2011), o que não pode ser afirmado para os nossos dados. Porém, a favor destes resultados, aqui observamos que a autofagia e ROS seguem uma cinética muito semelhante à das vias AMPK/Ulk1 e p38, mas não a cinética de inibição de mTOR, já que no dia 4 ocorreu a redução orquestradas da autofagia mesmo no contexto da forte supressão da via Akt/mTOR. Por outro lado, mTOR apresenta uma cinética de repressão que se assemelha muito à indução de senescência.



**Figura 9 - Mecanismo de ação da TMZ testado para a hipótese oxidativa - ROS exerce papel na autofagia e senescência induzidas por TMZ. (A) Topo** - Células U87 GFP-LC3 foram tratadas com TMZ 100  $\mu$ M por 3h, seguido do replaqueamento em Meio Livre de Droga (DFM). Nos intervalos indicados, células foram tratadas com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC), 10 mM. **Abaixo** - níveis de ROS totais medidos pelo ensaio de DCF; basicamente, células foram recolhidas, lavadas 1x com CMF1x e incubadas com 10 $\mu$ M de DCF em CMF1x, por 30 min, a 37°C, seguido da leitura em citômetro de fluxo. Números em preto: porcentagem de células positivas; Em vermelho: intensidade de marcação com DCF em relação ao controle (média $\pm$ erro padrão); \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 e \*\*\* $p$ <0.001 com relação ao controle; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 e ### $p$ <0.001 em relação à TMZ. **(B)** Porcentagem de células GFP-LC3 positivas ao longo do tempo. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 em relação à TMZ. **(C)** Marcação com laranja de acridina. números representam os dias de análise. **(D)** Population Doubling Cumulative. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 em relação à TMZ. **(E)** Porcentagem de células positivas para a marcação com SA- $\beta$ -gal após 5d e 7d. \*\* $p$ <0.01 em relação à TMZ. **(F)** Células foram pré-tratadas por 24h com RAPA 100 nM seguido do tratamento com TMZ 100  $\mu$ M por 3h. Após, células foram replaqueadas em DFM. Nos dias 3, 5 e 7 os níveis de ROS intracelular foram medidos por DCF.

A regulação da autofagia por ROS é complexa e envolve a ativação de diversos genes autofágicos, como resumido de maneira completa na **Figura 10**. O aumento de ROS causa a ativação da via AMPK (**Figura 10 - quadro vermelho**), o que pode ocorrer de maneira independente da razão AMP/ATP (Emerling *et al.*, 2009; Mungai *et al.*, 2011). É através da via ROS→AMPK→Autofagia que ocorre parte da autofagia induzida durante a privação de nutrientes (Li *et al.*, 2013). Dessa forma, é plausível assumirmos que a ativação de AMPK por TMZ tenha ocorrido, ao menos em partes, em função do aumento de ROS. A ativação sustentada de AMPK após dano ao DNA também foi observada em células epiteliais expostas à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yao *et al.*, 2013), em um mecanismo que envolve ativação do eixo H2A.X/ATM e aumento de ROS, disparando autofagia de maneira mTOR-independente (Singh *et al.*, 2012). Neste mecanismo, pode-se ainda ter uma retroalimentação positiva, em que ROS ativa ainda mais a via de DDR envolvendo ATM/LKB1 (**Figura 10 - quadro cinza**), o que poderia explicar os efeitos crônicos após exposição aguda à indutores de dano ao DNA. Neste contexto, autofagia parece ser fundamental à eliminação de componentes celulares danificados, gerando um contexto permissivo à entrada em senescência a longo prazo e evitando apoptose nestas células.

Outra ligação importante entre ROS e autofagia ocorre através da via de proliferação e sobrevivência celular PI3K/Akt (**Figura 10 - quadro preto**). ROS pode atuar inibindo a proteína PTEN, principal proteína repressora da via PI3K/Akt, levando à ativação da mesma e, potencialmente, à proliferação celular. Porém, as células U87 são mutadas para a proteína PTEN, de modo que a redução da via PI3K/Akt observada aqui deve ser mediada pela DDR com supressão de mTORC2, e não pelo efeito de ROS sobre a proteína PTEN.

E, finalmente, um dos mecanismos mais complexos e interessantes na interação entre ROS e autofagia envolve a proteína Atg4 (**Figura 10 - quadro amarelo**). Em condição de privação de nutrientes, ROS medeia, pelo menos parcialmente, a ativação de autofagia. Porém, ROS também inibe a proteína Atg4 neste contexto, a qual exerce um papel complexo no processo autofágico. Atg4 é uma protease que está envolvida tanto na clivagem da pró-LC3 recém sintetizada em LC3 I, a qual é posteriormente lipidada para gerar a forma LC3 II quando da ativação da autofagia. Porém, Atg4 também está envolvida em remover o fosfolípídeo fosfatidiletanolamina (PE) da LC3 II, suprimindo a propriedade desta de se ligar no fagóforo e mediar o recrutamento de componentes celulares e fechamento do autofagossomo (Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Durante a privação de nutrientes ocorre a formação de autofagossomos e aumento da forma lipidada de LC3, porém, este aumento não é devido ao aumento da expressão desta proteína. Na verdade o que ocorre é que ROS estabilizam LC3 II por inibição direta de Atg4, fazendo com que Atg4 não remova o PE da LC3 II. Dessa forma, a via 'privação de nutrientes'→ROS→inibição de Atg4→aumento de LC3 II→autofagia é complementar à ativação de AMPK na indução de autofagia por ROS. De fato, nós observamos níveis aumentados de LC3 II no dia 3, simultaneamente ao pico de ROS. Entre os dias 3 e 5, por outro lado, tanto ROS quanto os níveis de LC3 II despencaram, talvez pela de-repressão da proteína Atg4.





## ii. A Hipótese Mitocondrial

### Resumo

*O aumento de ROS ou dano ao mtDNA induzidos pela TMZ poderiam gerar um ciclo vicioso de dano oxidativo celular, levando à alterações na rede mitocondrial por disparo de mecanismos compensatórios ou mitofagia (Figura 11).*

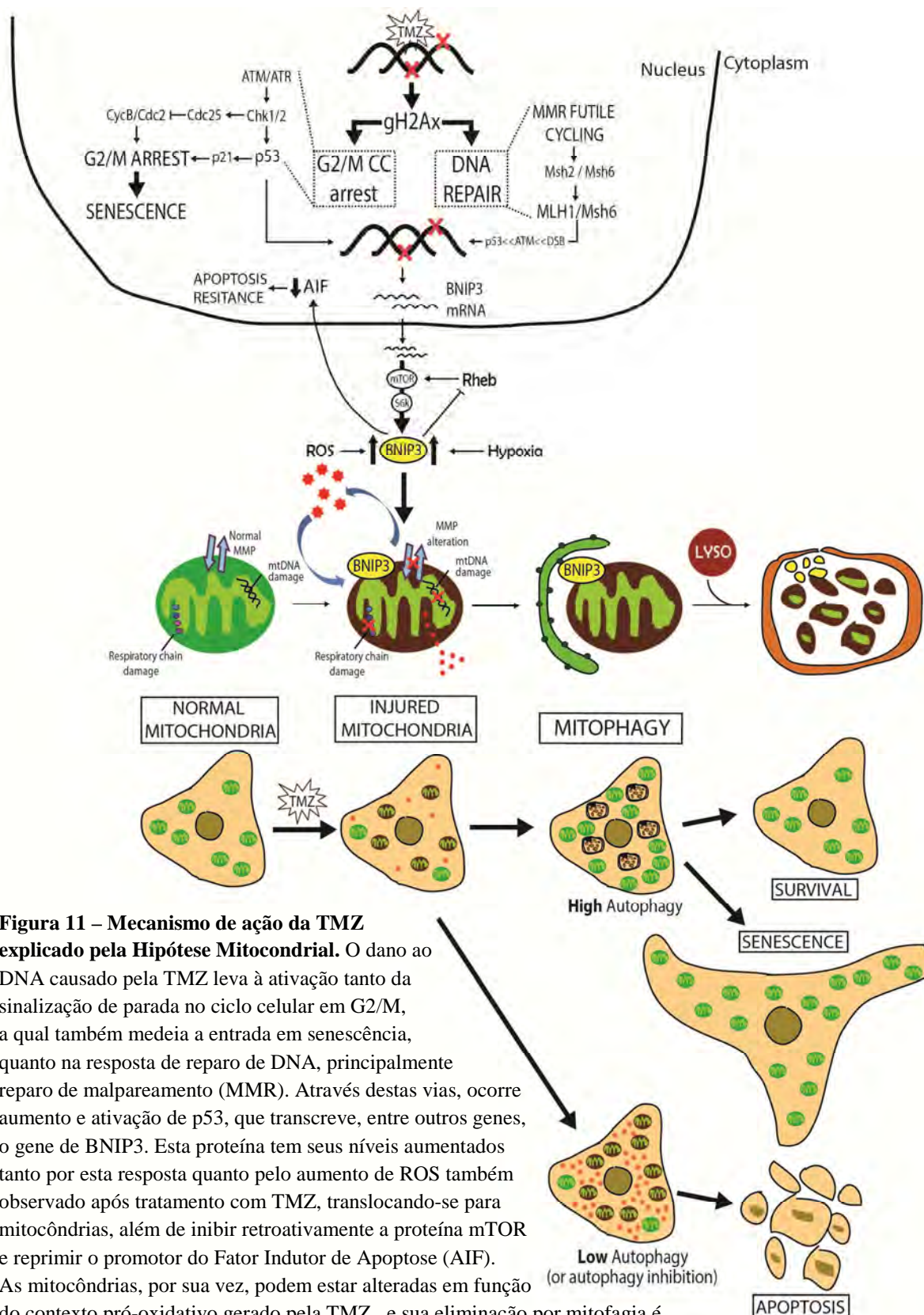
Entres os alvos de ROS com maior impacto à homeostase celular estão as mitocôndrias. A injúria oxidativa pode resultar em alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, desacoplamento da cadeia respiratória e dano ao DNA mitocondrial (mtDNA) (Lenaz *et al.*, 2002; Lenaz, 2012). Estas alterações podem levar ao aumento da produção de ROS em uma retroalimentação positiva. Em casos mais severos de injúria mitocondrial, ao extravasamento de moléculas exclusivamente intramitocondriais para o meio intracelular, especialmente citocromo C, disparando morte celular apoptótica. Dessa forma, mitocôndrias danificadas são extremamente letais às células e precisam ser eliminadas a fim de manter a homeostase celular, e o principal mecanismo de eliminação de mitocôndrias danificadas é a mitofagia (Zhang, 2013). Dessa forma, é possível que o aumento dos níveis de ROS observados aqui tenha causado dano nas mitocôndrias celulares, levando à ativação de mitofagia citoprotetora às células, uma vez que não foi observado apoptose em células tratadas apenas com TMZ.

Entre os alvos de ROS envolvidos em autofagia está BNIP3 (**Figura 10 - quadro verde**), proteína pró-apotótica da família Bcl2 importante para o turnover basal mitocondrial (Gustafsson, 2011), bem como para o aumento da mitofagia induzido por DDR e hipóxia (Band *et al.*, 2009) (**Figura 11**). A proteína BNIP3 se localiza na membrana de mitocôndrias, inclusive em organelas sem alteração no potencial de membrana, levando ao aumento da produção de ROS ou abertura de poros mitocondriais (Quinsay *et al.*, 2010), contribuindo para a remoção mitofágica das mesmas por interagir com a proteína LC3 (Aistle *et al.*, 2012). O gene BNIP3 é induzido em situações de estresse pela proteína p53, a qual é aumentada por TMZ em células U87 (Hirose *et al.*, 2001b). O controle da tradução do mRNA de BNIP3, por outro lado, é mais complexa e não esclarecida, e parece envolver a proteína mTOR uma vez que a inibição de mTOR reduz este processo (Zeng & Kinsella, 2010). Em condições de aumento dos níveis de BNIP3, ocorre maior interação da proteína com a membrana mitocondrial, levando à alteração da permeabilidade e, conseqüentemente, do potencial da membrana e subsequente aumento de ROS intracelular (Kubli *et al.*, 2008), (Zeng & Kinsella, 2010). Como consequência, pode ocorrer a ativação da mitofagia para eliminação destas organelas e sobrevivência celular. Porém, em níveis elevados, o aumento de mitocôndrias alteradas poderia levar à morte celular, como em células deficientes à autofagia ou com excesso de dano mitocondrial.

Neste sentido, sabe-se que o tipo de reparo induzido por TMZ (MMR - *Mismatch Repair*) também pode levar à mitofagia através de BNIP3 (**Figura 11**). Em células de câncer de cólon tratadas com os agentes indutores de MMR 6-tioguanina e 5-fluoruracil ocorreu o disparo de mitofagia via aumento de BNIP3 mediado pela proteína de reparo MLH1 (Zeng & Kinsella, 2010) e por p53 (Zeng *et al.*, 2007). De fato, já foi descrito que MLH1 tem papel na

autofagia induzida por TMZ a partir do dano ao DNA (Knizhnik *et al.*, 2013), mas se a autofagia induzida por TMZ é mitofagia e se este mecanismo é uma resposta padrão às drogas que ativam MMR segue incerto. Com base nestes dados e nos resultados apresentados na seção anterior, nós geramos uma hipótese de que o aumento de ROS induzido por TMZ poderia estar danificando mitocôndrias e causando, conseqüentemente, mau funcionamento mitocondrial e mitofagia em células de glioma (**Figura 11**). Esta hipótese também justificaria a redução dos níveis de ATP apesar dos altos níveis de autofagia observados, bem como o fato de altos níveis de autofagia (mitofagia, neste caso) permitirem às células entrarem em senescência e não morrerem por apoptose.

Além disso, outros dois mecanismos envolvendo a proteína BNIP3 são importantes (**Figura 11**). BNIP3 inibe a atividade de mTOR através da interação com a proteína Rheb (Li *et al.*, 2007), ativadora de mTOR. Como a via mTOR/S6k parece estar envolvida na tradução do mRNA de BNIP3, a qual leva à mitofagia, é plausível assumir que este mecanismo de retroalimentação negativa atue no sentido de frear a degradação mitocondrial, a fim de manter a homeostase energética celular. De fato, a via da mTOR tem função central no controle do metabolismo celular através de vários mecanismos, entre os quais deve estar o controle de qualidade mitocondrial e mitofagia. Aqui, de acordo com esta hipótese, observamos redução da atividade de mTOR a longo prazo, o que poderia estar ocorrendo via aumento de BNIP3. Além disso, BNIP3 também atua no núcleo celular, reprimindo o promotor de AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) em células de glioma, contribuindo para resistência à apoptose por estas células, como observado aqui para o tratamento com TMZ. De fato, inúmeros tipos tumorais sólidos resistentes à apoptose, destacando-se gliomas, apresentam níveis elevados de BNIP3 (Faragher *et al.*, 2011). Todas estas evidências sugerem que BNIP3 possa estar envolvida na resposta à TMZ.

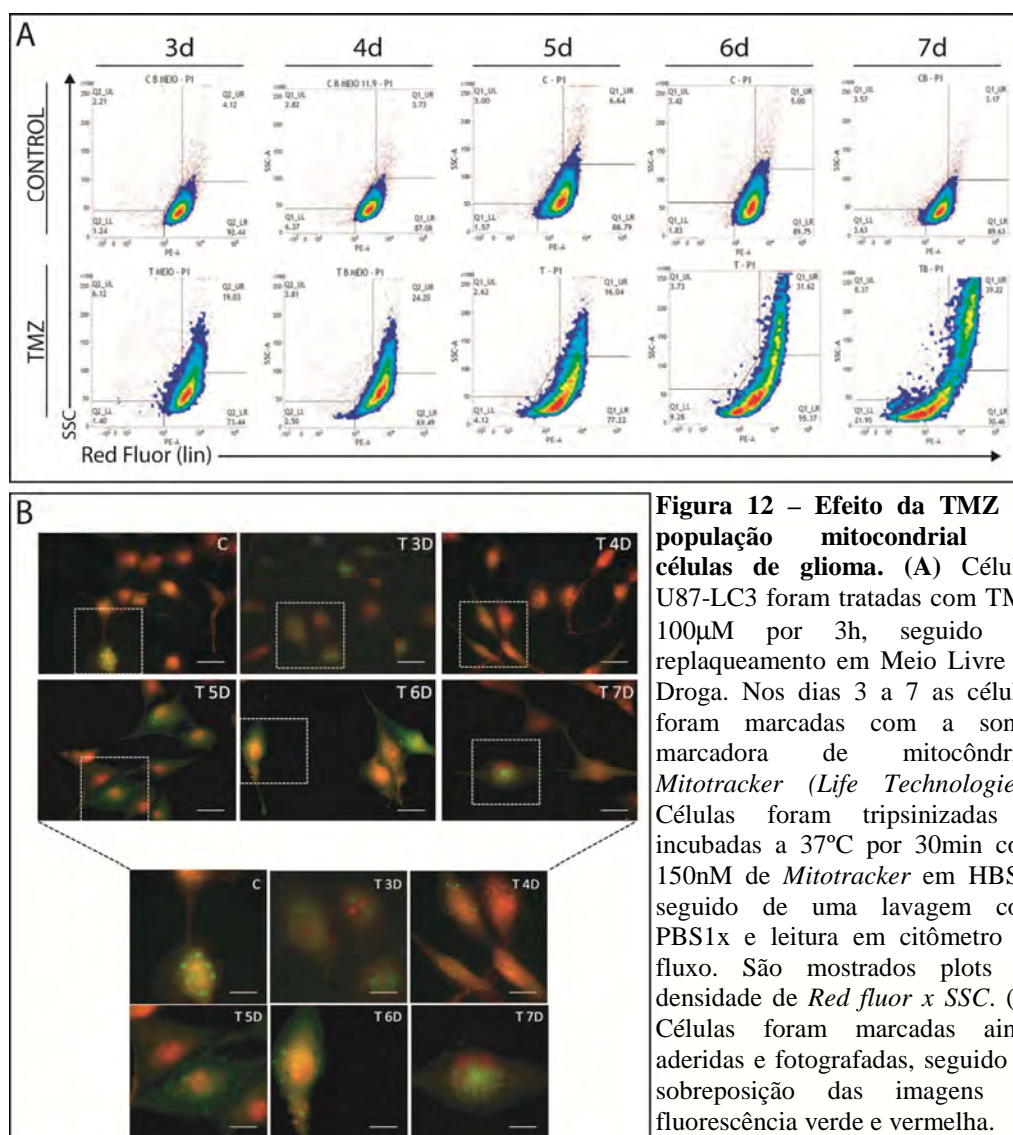


**Figura 11 – Mecanismo de ação da TMZ explicado pela Hipótese Mitocondrial.** O dano ao DNA causado pela TMZ leva à ativação tanto da sinalização de parada no ciclo celular em G2/M, a qual também medeia a entrada em senescência, quanto na resposta de reparo de DNA, principalmente reparo de malpareamento (MMR). Através destas vias, ocorre aumento e ativação de p53, que transcreve, entre outros genes, o gene de BNIP3. Esta proteína tem seus níveis aumentados tanto por esta resposta quanto pelo aumento de ROS também observado após tratamento com TMZ, translocando-se para mitocôndrias, além de inibir retroativamente a proteína mTOR e reprimir o promotor do Fator Indutor de Apoptose (AIF). As mitocôndrias, por sua vez, podem estar alteradas em função do contexto pró-oxidativo gerado pela TMZ, e sua eliminação por mitofagia é fundamental para evitar a apoptose celular e permitir que as células sobrevivam ou entrem em senescência (parte inferior da figura). Detalhes são descritos no texto.

Baseado nesta hipótese, nós avaliamos a massa mitocondrial intracelular das células tratadas com TMZ através da marcação de mitocôndrias com a sonda fluorescente vermelha *Mitotracker*, que fica retida no meio intramitocondrial - independentes da funcionalidade da

organela. A partir do dia 3, ao contrário da redução na massa mitocondrial esperada em caso de ativação de mitofagia, nós observamos aumento da quantidade total de mitocôndrias e aumento da complexidade celular (observado pelo parâmetro *side scatter* na citometria de fluxo) (**Figura 12A**). Este feito é semelhante ao que ocorre em OIS, durante a qual há elevação dos níveis de ROS e aumento da massa mitocondrial. Porém, estas mitocôndrias apresentam perda de potencial de membrana, e como consequência, células superexpressando Ras apresentam níveis reduzidos de ATP e ativação de AMPK, levando a um aumento compensatório da massa mitocondrial. Estes resultados sugerem que OIS e senescência induzida por dano ao DNA envolvem mecanismos semelhantes considerando ROS, AMPK e alterações mitocondriais (Moiseeva *et al.*, 2009).

Seguindo o experimento, do dia 3 ao dia 5 a quantidade de mitocôndrias das células com aumento de massa mitocondrial se manteve estável. Porém, do dia 5 ao dia 7 ocorreu um segundo momento de aumento (**Figura 12A**). Em paralelo, a partir do dia 5 ocorreu o incremento concomitante de uma população de células com quantidade reduzida de mitocôndrias e baixa complexidade intracelular (**Figura 12A**). Para avaliarmos se TMZ estava induzindo mitofagia nestas células, nós sobreposamos imagens de GFP-LC3 com *Mitotracker*. Porém, não observamos co-localização destes dois marcadores, sugerindo que TMZ não induz mitofagia nestas células (**Figura 12B**).

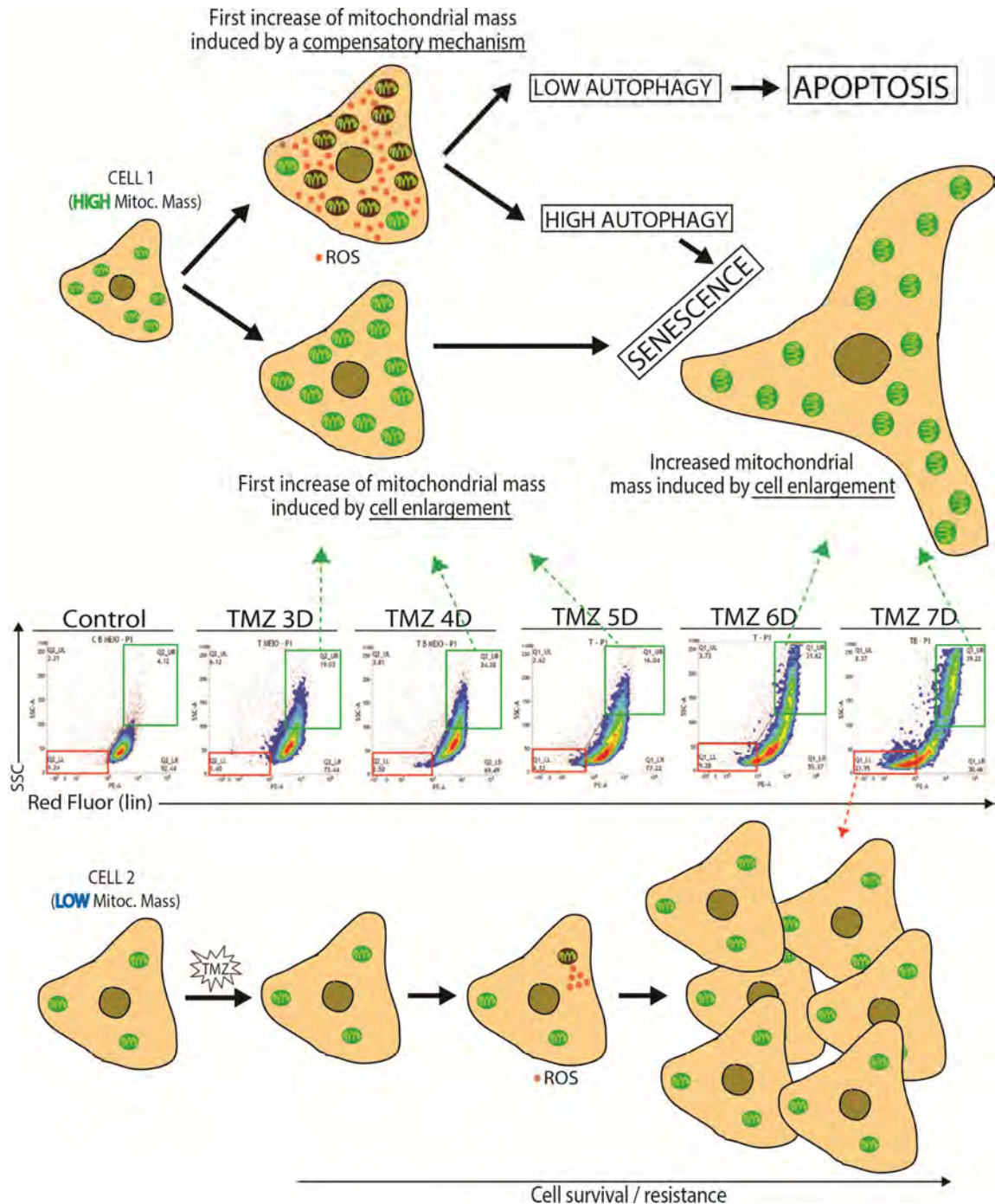


**Figura 12 – Efeito da TMZ na população mitocondrial de células de glioma. (A)** Células U87-LC3 foram tratadas com TMZ 100 $\mu$ M por 3h, seguido do replaqueamento em Meio Livre de Droga. Nos dias 3 a 7 as células foram marcadas com a sonda marcadora de mitocôndrias *Mitotracker* (Life Technologies). Células foram tripsinizadas e incubadas a 37°C por 30min com 150nM de *Mitotracker* em HBSS, seguido de uma lavagem com PBS1x e leitura em citômetro de fluxo. São mostrados plots de densidade de *Red fluor* x *SSC*. **(B)** Células foram marcadas ainda aderidas e fotografadas, seguido da sobreposição das imagens de fluorescência verde e vermelha.

A cinética de alterações da massa mitocondrial nos levou a sugestão dos mecanismos mostrados na **Figura 13**. Primeiramente, o aumento inicial da quantidade de mitocôndrias no dia 3 nos levou a formular duas hipóteses (**Figura 13 - parte superior**). A primeira é de que esse aumento seja devido ao aumento do tamanho celular causado pela entrada em senescência. Células eucarióticas possuem um controle fino da quantidade de organelas intracelulares, e o aumento do tamanho celular que ocorre na senescência sinaliza para a produção de novas organelas pela célula (Posakony *et al.*, 1977; James & Bohman, 1981; Nisoli *et al.*, 2005). Aqui, no dia 3 nós observamos um aumento médio de 1.7x da área de células tratadas com TMZ e positivas para  $\beta$ -gal, comparadas a células controle. Em acordo com este aumento, observamos um aumento de 1.65x na quantidade de mitocôndrias na população de células com quantidade aumentada de mitocôndrias no dia 3, sugerindo que este aumento possa ter sido causado pelo aumento do tamanho celular. A segunda hipótese é que as células tenham aumentado a massa mitocondrial no dia 3 em resposta compensatória ao aumento de ROS intracelular, como também sugerido para OIS (Moiseeva *et al.*, 2009). De fato, células epiteliais pulmonares MRC5 expostas à  $H_2O_2$  em doses baixas aumentam a quantidade de mtDNA e a massa de mitocôndrias funcionais, efeito mediado por ROS (Lee *et al.*, 2000). Além disso, células híbridas nas quais foram inseridas mitocôndrias carregando uma deleção de aproximadamente 5.000 pares de base apresentaram maiores níveis de ROS intracelular e atividade comprometida da cadeia transportadora de elétrons. Como mecanismo compensatório, estas células também apresentaram quantidade maior de mitocôndrias, tanto em condições basais quanto em resposta ao tratamento oxidativo (Wei *et al.*, 2001).

Já o aumento da massa mitocôndria do dia 5 ao dia 7 deve ter ocorrido devido ao aumento da área celular em função da senescência, como mostrado em outros tipos de senescência, como replicativa, induzidas por ROS e OIS (Lee *et al.*, 2002; Moiseeva *et al.*, 2009; Passos *et al.*, 2010, (Cho *et al.*, 2011) (**Figura 13 - parte superior**).

Considerando a população de células com quantidade reduzida de mitocôndrias que surge a partir do dia 5 e a ausência de mitofagia, nós sugerimos que (**a**) existam duas subpopulações de células, uma que aumenta e outra que diminui a quantidade de mitocôndrias; ou (**b**) as mesmas células passam por um estado celular com redução seguido de aumento da quantidade de mitocôndrias ou vice-versa; ou (**c**) existe o enriquecimento de populações distintas ao longo do tempo do experimento. A ausência de mitofagia ao longo de todo o experimento favorece a hipótese do enriquecimento da população de células com quantidade reduzida de mitocôndrias do dia 5 em diante, o que pode ser representativo de células resistentes à TMZ (**Figura 13 - abaixo**). Corroborando esta hipótese, células com quantidade reduzida de cópias de mtDNA, o que sugere menor quantidade de mitocôndrias, são mais resistentes à TMZ. Além disso, a aquisição de resistência à TMZ por células de glioma leva a um remodelamento da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Oliva *et al.*, 2010). Efeito semelhante, de eliminação de células com elevado número de mitocôndrias, parece ser induzido por Resveratrol (Rsv) em células de câncer de cólon (Prabhu *et al.*, 2013), nas quais também há aumento de ROS e senescência mediada por ATM (Heiss *et al.*, 2007). Finalmente, Kubli e Gustafsson sugerem que o desfecho entre sobreviver ou morrer a um estresse mitocondrial depende da capacidade das células em realizar autofagia para eliminar mitocôndrias danificadas. Os autores sugerem que as mitocôndrias são a origem dos sinais de morte e, nesse sentido, a eliminação das mesmas permitira a sobrevivência celular (Kubli & Gustafsson, 2012).



**Figura 13 – Tratamento com TMZ é acompanhado por alterações na massa mitocondrial celular.** Ao longo da análise utilizando *Mitotracker* (Fig. 12), duas populações com massa mitocondrial distintas emergiram. Uma delas com maior quantidade de massa mitocondrial e elevado SSC (marcado em verde nos plots de densidade centrais) e outra com reduzida massa mitocondrial e baixo SSC (marcado em vermelho nos plots de densidade centrais). **Acima** - A população de células que apresentou aumento da massa mitocondrial após tratamento com TMZ passou por dois estágios de aumento da quantidade de mitocôndrias: o primeiro (dias 3 a 5) pode ter sido devido ou ao aumento da área celular observado já no dia 3, ou devido a uma adaptação metabólica compensatória sofrida pelas células que apresentavam injúria mitocondrial causada pelo aumento de ROS (mitocôndrias marrons; pontos vermelhos na célula indicam ROS e moléculas pró-apoptóticas). Neste último caso, baixos níveis de autofagia poderiam levar à apoptose, enquanto altos níveis permitiriam a entrada em senescência. O segundo aumento de massa mitocondrial (dias 6 e 7) deve ter ocorrido em função do aumento da área celular causado pela entrada em senescência. **Abaixo** - já a população de células com reduzida massa mitocondrial deve ter sido enriquecida por ser mais resistente à TMZ, exatamente por ter baixa quantidade de mitocôndrias. Para certificação destas hipóteses será realizado o *sorting* destas populações celulares.

Corroborando os principais aspectos da hipótese mitocondrial, em células de câncer de mama expostas ao tratamento agudo com Doxo, *Cho e col* observaram um aumento inicial da massa mitocondrial até o dia 3, seguido de um platô até o dia 7 e, após, um segundo aumento tardio da quantidade de mitocôndrias intracelulares entre os dias 7 e 8, em um perfil muito semelhante ao observado aqui. Como sugerido pela nossa hipótese porém ainda não testado no nosso modelo, as mitocôndrias das células MCF7 tratadas com Doxo apresentaram alterações no potencial de membrana, provavelmente em função das espécies reativas geradas (Cho *et al.*, 2011). Finalmente, em fibroblastos primários a senescência replicativa foi acompanhada por aumento da massa mitocondrial total, e estas organelas também apresentavam alterações do potencial de membrana. Nestas células, o silenciamento de Atg7 e Atg12 aumentou a produção de ROS, reduziu a funcionalidade mitocondrial (ou enriqueceu a população celular com baixa quantidade de mitocôndrias, como proposto aqui) e induziu aumento da massa mitocondrial total. O bloqueio de ROS reverteu parcialmente este quadro, fortalecendo a hipótese de que as alterações na quantidade de mitocôndrias sejam um mecanismo compensatório (Kang *et al.*, 2011a).

Molecularmente, a biogênese de mitocôndrias é mediada pelo fator de transcrição PGC1alfa em células eucariotas (Wu *et al.*, 1999), o qual pode ser induzido por ROS (Austin & St-Pierre, 2012), p38 (Puigserver *et al.*, 2001) ou AMPK (Jager *et al.*, 2007). Neste contexto oxidativo, PGC1alfa também induz o aumento de enzimas antioxidantes, minimizando os danos induzidos pelas espécies reativas (Austin & St-Pierre, 2012). Dessa forma, a atividade de PGC1alfa atua no equilíbrio entre o aumento da quantidade de mitocôndrias, que pode levar a um aumento da produção de ROS gerados pela respiração mitocondrial mas, por outro lado, atua controlando o aumento dos níveis destas espécies reativas, evitando uma retroalimentação positiva potencialmente letal às células. De fato, a expressão de PGC1alfa é uma resposta adaptativa para permitir a sobrevivência celular em condições de estresse oxidativo (Valle *et al.*, 2005; St-Pierre *et al.*, 2006). Dessa forma, é plausível assumirmos que o aumento de ROS, p38 e AMPK induzidos pelo tratamento com TMZ tenha levado ao aumento dos níveis e atividade de PGC1alfa, levando à biogênese mitocondrial e, em paralelo, contribuindo para a supressão dos níveis de ROS intracelulares, como observado a partir do dia 3. Importante, nem sempre o efeito antioxidante de PGC1alfa é suficiente para manter a viabilidade celular: a indução de PGC1alfa levou a um aumento de ROS intracelular e sensibilizou células de câncer de mama à Doxorubicina (Skildum *et al.*, 2011). Finalmente, um terceiro mecanismo importante envolvendo PGC1alfa é a formação de um complexo com p53, ativando a transcrição mediada por esta última (Sen *et al.*, 2011). Dessa forma, PGC1alfa pode atuar como uma proteína central para a célula em um contexto de aumento de ROS, podendo levar à desfechos como adaptação metabólica, apoptose ou senescência (Cioce & Blandino, 2011).

Disfunções mitocondriais, tanto em quantidade quanto em funcionalidade, são comuns em doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Taylor e Goldman 2011), bem como em diferentes tipos tumorais (Carew & Huang, 2002). Estas alterações podem atuar ou favorecendo a resistência a estresse metabólico e energético, como parte fundamental da reprogramação metabólica que ocorre em células tumorais, ou contribuir para sensibilização celular à morte celular induzida por estresse oxidativo ou indução de apoptose pela via mitocondrial (Modica-Napolitano & Singh, 2004; Carew *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2012). Nesse sentido, autores tem sugerido que afetar o funcionamento mitocondrial (Galluzzi *et al.*,



2006; Fulda *et al.*, 2010), assim como terapias indutoras de mitofagia massiva (Gargini *et al.*, 2011) podem ser ferramentas importantes no combate a cânceres resistentes.

#### Perspectivas

- *Avaliar os níveis de BNIP3 e a sublocalização celular da mesma.*
- *Microscopia confocal para mitofagia.*
- *Avaliar a funcionalidade mitocondrial (marcadores específicos fluorescentes).*
- *Separar populações mitocondriais através de sorting em citometria de fluxo (em andamento).*
- *Medir os níveis de ATP celulares em presença de inibidores e ativadores de autofagia.*

### iii. A Hipótese da Proteína Atg5

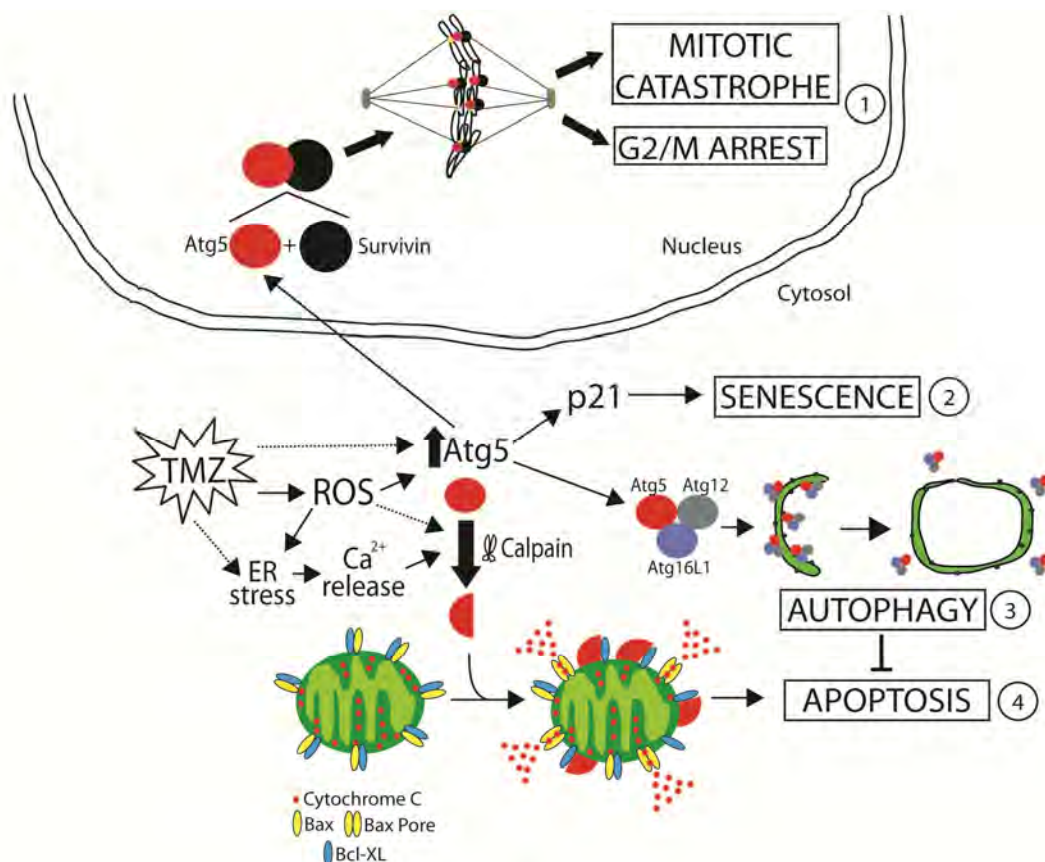
#### Resumo

*De acordo com essa teoria, TMZ induziria aumento de Atg5, o qual sabe-se que transloca para o núcleo, liga-se à survivina e induz catástrofe mitótica, bem como reprime a expressão o Fator Indutor de Apoptose (AIF). Em paralelo, Atg5 é clivada por calpaína e interage com proteínas mitocondriais, atuando na interface de autofagia e apoptose (Figura 14).*

A proteína Atg5 exerce um papel importante no início do processo autofágico. Atg5 é conjugada à Atg12 e, subsequentemente, o conjugado Atg5-Atg12 liga-se à proteína Atg16L e este complexo dirige o alongamento da membrana do profagóforo, até o fechamento do autofagossomo, como descrito na Tabela 1 (Introdução - Seção 1). A superexpressão de Atg5, por si só, é capaz de induzir autofagia, inclusive em modelo *in vivo* (Pyo *et al.*, 2013).

Recentemente, porém, um papel 'não-autofágico' importante foi descrito para a proteína Atg5. O dano ao DNA induzido por etoposídeo, cisplatina, taxol ou nocodazol elevou os níveis da proteína Atg5, a qual sofreu translocação para o núcleo, onde passou a interagir com a proteína survivina, levando à catástrofe mitótica independente da autofagia. Além disso, a superexpressão de Atg5, por si só, levou à parada em fase G2/M, sem dano direto ao genoma (Maskey *et al.*, 2013). À semelhança destes indutores de dano ao DNA, TMZ poderia estar aumentando Atg5 e esta mediando parte do efeito da droga (**Figura 14**), hipótese reforçada pelo fato de a literatura mostrar que TMZ induz catástrofe mitótica em células tumorais (Hirose *et al.*, 2001a; Filippi-Chiela *et al.*, 2013a). De fato, no Capítulo III nós demonstramos que, após 7 dias do tratamento com TMZ, ocorre o aumento da população de células multinucleadas, bem como um incremento da população hiperdiploide, sinais típicos de catástrofe mitótica (Castedo *et al.*, 2004; Vakifahmetoglu *et al.*, 2008). Além disso, Atg5 medeia a senescência induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do aumento de p21. TMZ também induziu ROS e aumento de p21, mas os mediadores dessa ligação não foram investigados aqui, e Atg5 surge como potencial mediador dessa interação (**Figura 14**).

A proteína Atg5 também exerce papel citoplasmático não autofágico. A proteína Atg5 pode ser clivada por calpaína (Yousefi *et al.*, 2006), a qual tem sua expressão aumentada por ROS e/ou estresse do retículo endoplasmático seguido da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ . O fragmento de Atg5 gerado pela clivagem interage com a proteína Bcl-Xl na membrana mitocondrial, sequestrando-a e liberando Bax para formar o poro mitocondrial, levando à liberação de citocromo c e apoptose. Em paralelo, o 'sequestro' de Bcl-XL pela proteína Atg5 truncada libera a proteína beclina-1 para atuar no mecanismo de autofagia. Além disso, a inibição de calpaína através de RNAi, por si só, é capaz de induzir autofagia (Xia *et al.*, 2010), o que é corroborado pela observação que a inibição de calpaína ou shRNA para Bax promovem um aumento ainda maior da autofagia, demonstrando a importância deste mecanismo na manutenção da autofagia basal em níveis baixos. Além disso, a inibição da autofagia concomitante à inibição da apoptose atenuaram significativamente a toxicidade da Tricoconina VI (Shi *et al.*, 2013), a qual induz influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, demonstrando que, de fato, ambos os mecanismos são disparados e interagem após aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Corroborando estes dados, a redução de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular previne a clivagem de Atg5, direcionando esta para o enriquecimento do complexo Atg5-Atg12 e autofagia (Xia *et al.*, 2010). Assim, este mecanismo de clivagem de Atg5 por calpaína parece ser importante no controle basal da autofagia e na interação entre autofagia e apoptose em condições de estresse. Finalmente, o silenciamento de Atg5 resulta em resistência a quimioterápicos, enquanto a superexpressão sensibiliza células tumorais a quimioterápicos, sugerindo que o papel de Atg5 na apoptose seja dominante sobre o efeito citoprotetor de autofagia (Yousefi *et al.*, 2006).



**Figura 14 – Hipótese da proteína Atg5.** TMZ induziria aumento da proteína Atg5, tanto diretamente (via DDR) quanto por meio do aumento de ROS. A proteína Atg5 transloca-se para o núcleo, onde interage com survivina e leva à catástrofe mitótica e parada do ciclo celular em fase G2/M (①). Além disso, Atg5 pode mediar o aumento de p21 por mecanismo ainda incerto, favorecendo a entrada em senescência (②). Atg5 também forma um complexo com Atg12 e Atg16L, o qual dirige o fechamento do autofagossomo (③). Em

(continuação legenda Figura 14)

muitos casos, essa autofagia é citoprotetora e suprime a entrada em apoptose. Finalmente, o contexto de aumento de ROS, somado à estresse do retículo plasmático e aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular podem ativar a proteína calpaína, a qual cliva a proteína Atg5. A proteína Atg5 clivada interage com a proteína antiapoptótica Bcl-XL na membrana da mitocôndria, liberando Bax para formação do poro mitocondrial, com consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas (principalmente citocromo C, levando à apoptose (4)).

#### Perspectivas

- *Analisar os níveis de Atg5 após tratamento com TMZ e outros compostos genotóxicos.*
- *Silenciar a proteína Atg5 em células de glioma e avaliar a consequência frente ao tratamento com indutores de dano ao DNA, bem como analisar morfometria nuclear destas células.*
- *Realizar imunohistoquímica para localização subcelular de Atg5.*

#### **iv. Dano ao DNA: um sinal (agudo), múltiplas respostas integradas (crônicas)**

#### Resumo

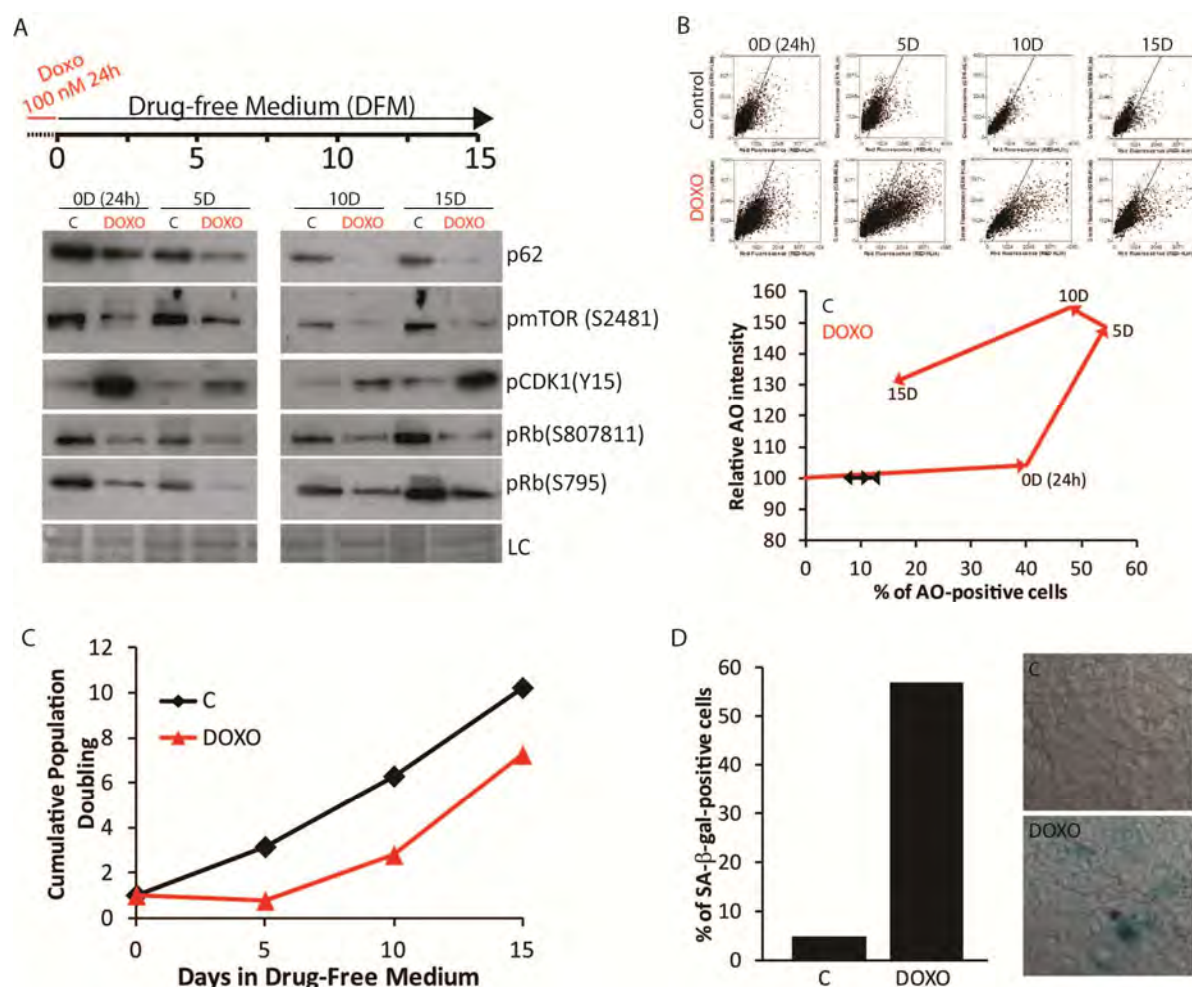
*À semelhança de células de glioma tratadas com TMZ, células de câncer de mama tratadas agudamente com Doxorubicina também dispararam resposta prolongada de autofagia e senescência, acompanhadas por repressão crônica da via da mTOR e de sinais de proliferação.*

A multiplicidade de respostas celulares disparadas pela TMZ vem sendo demonstrada há mais de uma década (Hirose *et al.*, 2001a; Hirose *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2005; Knizhnik *et al.*, 2013). Entender como estes mecanismos se conectam é fundamental para buscar compostos adjuvantes à TMZ, bem como entender mecanismos de resistência e recorrência tumorais. Neste sentido, é importante destacar o fato de um sinal citotóxico bastante agudo (TMZ 3h) ter disparado uma sinalização persistente, como observado para a inibição da via Akt/PI3K/mTOR após 7 dias. Por outro lado, o tratamento agudo (24h) com RAPA, apesar do forte efeito de indução de autofagia durante a presença da droga, não gerou uma resposta crônica de autofagia ou indução de senescência após a retirada da mesma.

Para avaliar se esta resposta crônica após contato agudo é disparada por outro composto genotóxico e em outro tipo celular, células de câncer de mama MCF7 foram tratadas com o inibidor de topoisomerase II e indutor de quebras no DNA Doxorubicina (Doxo) por 24h a 100 nM, seguido do replaqueamento das células em DFM (**Figura 15A, topo**). Corroborando os dados da TMZ, este tratamento também levou à supressão da via da mTOR, aumentou os níveis da forma inibitória de Cdc2, fosforilada na tirosina 15, e reduziu os níveis das formas fosforiladas da proteína Rb (**Figura 15A, abaixo**), sugerindo parada massiva na proliferação celular. A análise de CPD apontou para uma estabilização do número de células até o dia 5 porém, do dia 5 em diante, a população de células tratadas voltou a aumentar (**Figura 15B**). Similar à TMZ, observamos um aumento da intensidade e

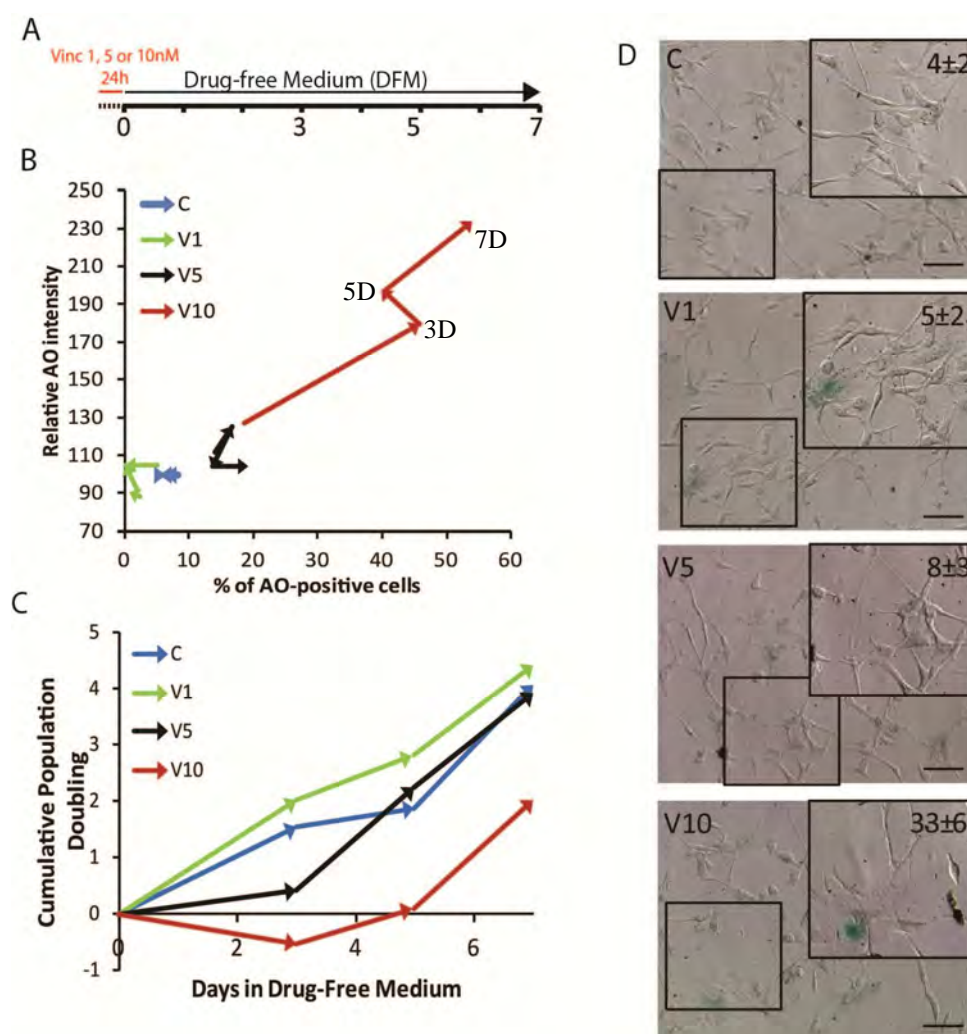
porcentagem de células positivamente marcadas para AO até o dia 5. Do dia 5 ao dia 10 foi observada uma redução da porcentagem de células positivas concomitante ao aumento da intensidade de AO naquelas células ainda positivas para AO. Do dia 10 ao dia 15, finalmente, autofagia foi reduzida (**Figura 15C**). A indução crônica de autofagia foi confirmada pela redução dos níveis de p62 (**Figura 15A**). Finalmente, observamos um incremento da porcentagem de células positivamente marcadas para SA- $\beta$ -gal no dia 15 (**Figura 15D**), demonstrando a indução de senescência em uma subpopulação celular.

Estes dados sugerem que autofagia crônica e senescência são induzidos por agentes indutores de diferentes tipos de dano ao DNA, uma vez que Doxo induz quebras simples e duplas, enquanto TMZ induz malpareamento de bases. Estes dados corroboram resultados obtidos por Goehre e col (2012), entretanto neste trabalho os autores realizaram experimentos curtos (até 72h), com uma dose dez vezes superior à utilizada no presente trabalho (1000 nM) e com presença constante da droga, demonstrando que esta resposta crônica ocorre mesmo em doses subletais agudas. De fato, nós mostramos que a sinalização celular que se mostra alterada após 5 dias do tratamento se mantém até o 15º dia, mesmo na ausência da droga, aspecto clinicamente relevante.



**Figura 15 - Indução crônica transitória de autofagia e senescência a longo prazo em células de câncer de mama tratadas com Doxorubicina.** Células foram tratadas com Doxorubicina (Doxo) 100nM por 24h, seguido da remoção da droga e replaqueamento em Meio Livre de Droga. Após 5, 10 e 15 dia foram realizados os experimentos descritos a seguir, através das metodologias descritas no capítulo III. **(A)** Western blot para as proteínas indicadas. **(B)** Laranja de Acridina (AO) - acima: *red fluor x green fluor* plots; abaixo - curva de porcentagem de células versus intensidade de marcação de AO. **(C)** Cumulative Population Doubling. **(D)** Marcação para SA- $\beta$ -gal no dia 15; (n=1).

Finalmente, avaliamos o efeito a longo prazo de um agente citotóxico não indutor de dano direto ao DNA, o inibidor de microtúbulos Vincristina (VCR) em células de glioma U87 (**Figura 16**, abaixo). Os tratamentos com as doses de 1 e 5 nM por 24h, seguido do replaqueamento em DFM (**Figura 16A**) foram inertes a longo prazo no que diz respeito à indução de autofagia (**Figura 16B**), proliferação celular (**Figura 16C**) e senescência (**Figura 16D**). Por outro lado, à semelhança do efeito da TMZ e Doxo, 10 nM de VCR induziu tanto aumento da marcação com AO (**Figura 16B**) quanto aumento da porcentagem de células SA- $\beta$ -gal positivas (**Figura 16D**). Provavelmente o efeito semelhante seja causado por sinalização de dano ao DNA, já que o tratamento com VCR pode levar à catástrofe mitótica, a qual gera injúria ao DNA e ativação de DDR (Filippi-Chiela, 2014, em preparação).



**Figura 16 - Indução crônica transitória de autofagia e senescência a longo prazo por Vincristina de modo dose-dependente em células de glioma U87. (A)** Células U87 foram tratadas com Vincristina (VCR) por 24h nas doses de 1, 5 e 10nM, seguido do replaqueamento em Meio Livre de Droga. **(B)** Marcação com laranja de acridina (AO). **(C)** Curvas de Population Doubling Cumulativo. **(D)** Marcação para SA- $\beta$ -gal no dia 7. Números indicam a porcentagem de células positivamente marcadas; (n=1).

Indutores de dano ao DNA compreendem agentes alquilantes, inibidores de topoisomerasas, agentes intercalantes de DNA, entre outros, e constituem o grupo mais amplo de quimioterápicos utilizados. Apesar da eficiência e da ampla utilização, alguns tipos tumorais são intrinsecamente resistentes a estes agentes (Cheung-Ong *et al.*, 2013). Neste

sentido, se esta resposta de indução e manutenção crônica de autofagia citoprotetora após injúria genômica se confirmar para outros indutores de dano ao DNA, a modulação da autofagia surge como uma abordagem com grande potencial para aumentar a sensibilidade de células tumorais a estes compostos, como discutido na seção a seguir.

### Perspectivas

1. *Concluir os experimentos com Doxo em células de câncer de mama e VCR em células de glioma e avaliar o papel da autofagia na senescência e morte celular.*
2. *Avaliar o papel da autofagia induzida por outros compostos citotóxicos indutores de senescência, bem como em outros tipos tumorais, especialmente os resistentes à apoptose.*

## v. Modulação da autofagia na terapia anti-câncer

### Resumo

*O desenho racional de terapias incluindo moduladores de autofagia combinados à quimioterápicos já utilizados pode contribuir para aumento da eficácia terapêutica.*

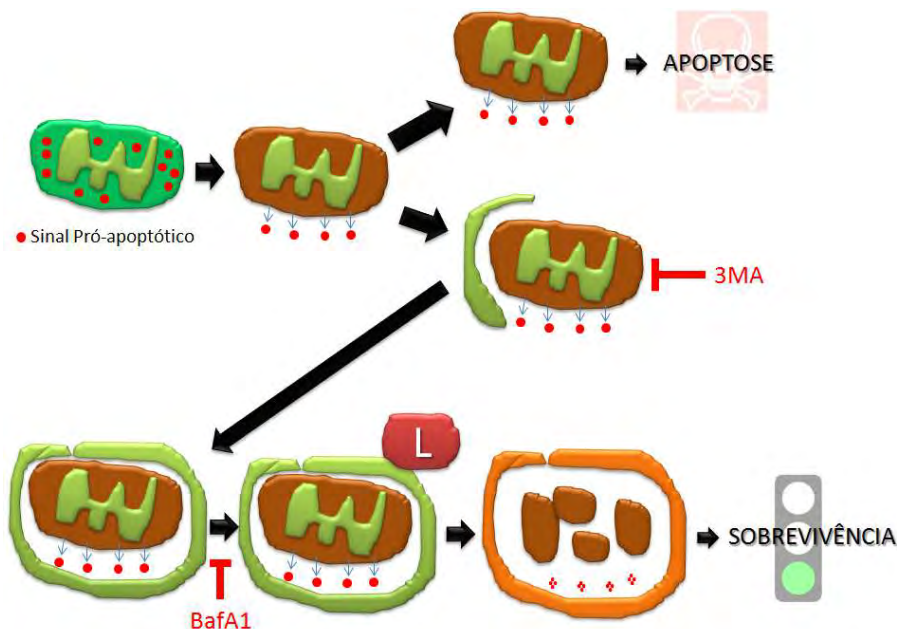
Com base em estudos *in vitro* e modelos animais a abordagem que parece ser a mais eficiente considerando a modulação da autofagia em terapia tem sido a combinação de um agente indutor de autofagia somado a um inibidor da fusão do autofagossomo com o lisossomo (Sui *et al.*, 2013). Entre estes agentes tem se destacado a cloroquina (CQ) e hidroxicloroquina (HCQ), inibidores da acidificação lisossomal. Através dessa estratégia, as células formam uma grande quantidade de autofagossomos, que se acumulam na célula mas não fusionam com lisossomos, levando a duas consequências: **i.** o consumo de componentes celulares sem o retorno de nenhum benefício estrutural ou energético às células; **ii.** aumento dos níveis de ROS, o que pode acabar afetando componentes celulares fundamentais à homeostase (**veja a Figura 10 - quadro roxo**).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm apresentado resultados promissores utilizando a abordagem citada acima (Amaravadi *et al.*, 2007). Atualmente existem 41 *trials* registrados no site *clinicaltrials.gov* testando HCQ combinada a algum quimioterápico em câncer. Destes, 70% estão em fase de recrutamento e apenas 1 (fase I) teve os resultados publicados, demonstrando a segurança do uso de HCQ combinada à Erlotinib em pacientes com tumor pulmonar de não pequenas células avançado (Goldberg *et al.*, 2012). Para CQ em câncer existem 11 *trials* clínicos registrados, dos quais 60% estão em fase de recrutamento e nenhum deles tem resultados publicados até o momento. Em um ensaio piloto, porém, Eldredge e col demonstraram que curtos tratamentos com CQ combinados à radioterapia foram bem tolerados em pacientes com glioma. Entretanto, devido ao baixo número de pacientes, nenhuma conclusão acerca da eficiência do tratamento foi possível (Eldredge *et al.*, 2013).

Neste sentido, dois aspectos importantes precisam ser destacados em se tratando de inibição da autofagia em câncer. O primeiro se refere ao fato da autofagia ser importante para a função do sistema imune no combate ao câncer (Weiner & Lotze, 2012; Ma *et al.*, 2013). A

inibição da autofagia em células de câncer pulmonar humano A549 e H460, bem como em células de adenocarcinoma de cólon murino CT26, sensibilizou as mesmas à radiação ionizante, levando à morte celular e perda da clonogenicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* em animais imunodeficientes. Porém, em animais imunocompetentes, a radioterapia disparou uma resposta imune antitumoral dependente da liberação de ATP mediada por autofagia por células tumorais. Este ATP, por sua vez, foi responsável por recrutar células imunes para a região tumoral (Ko *et al.*, 2014). Este aspecto poderia explicar, também, o fato de animais mutados para genes autofágicos apresentam incidência maior de tumores, bem como porque tumores mutados para genes autofágicos respondem pior a algumas terapias. Dessa forma, a presença de inibidores de autofagia pode reduzir a eficiência terapêutica no tratamento de tumores nos quais a autofagia contribui para a atividade antitumoral do sistema imune.

O segundo aspecto importante diz respeito à etapa de inibição da autofagia, bem como o momento em que autofagia deve ser inibida no contexto de um cotratamento. Demonstramos aqui que a inibição da etapa inicial da autofagia através do tratamento com 3-MA reprimiu autofagia e induziu apoptose em células tratadas com TMZ, enquanto a inibição da etapa de fusão do autofagossomo com o lisossomo através de BafA1 no dia 3 não levou à apoptose. Nós hipotetizamos que a inibição da autofagia na etapa posterior à formação do autofagossomo, com BafA1, não induziu apoptose porque componentes pró-apoptóticos presentes no meio intracelular, como mitocôndrias danificadas, foram englobados por autofagossomos, suprimindo a liberação de sinais pró-apoptóticos. Por outro lado, o 3-MA atua reprimindo a formação do autofagossomo e, desta forma, os sinais pró-apoptóticos seguem sendo liberados para o meio intracelular, promovendo a apoptose (**Figura 17**).



**Figura 17 – Efeito da inibição da autofagia em diferentes etapas do mecanismo.** A inibição da autofagia em diferentes etapas do mecanismo pode acarretar diferentes desfechos em células com mitocôndrias danificadas. A mitofagia de organelas danificadas (marcadas em marrom, em comparação com organelas saudáveis, em verde) impede que haja a liberação de fatores pró-apoptóticos para o meio intracelular, permitindo a sobrevivência celular (desfecho inferior). Células deficientes em autofagia ou com níveis elevados de mitocôndrias injuriadas entram em apoptose (desfecho superior). Neste sentido, a inibição da etapa inicial da autofagia utilizando 3-MA dispara apoptose por não sequestrar as mitocôndrias injuriadas. Por outro lado, o tratamento com Bafilomicina A1 (BafA1) impede apenas que ocorra a fusão do autofagossomo com o lisossomo, mas permite o englobamento das mitocôndrias injuriadas, reprimindo a apoptose.

Desfechos diferentes após a inibição da autofagia em diferentes etapas do mecanismo também foram observados em células leucêmicas tratadas com o análogo de nucleosídeo citarabina (AraC), utilizado em leucemia aguda mieloide e linfoma de não-Hodgkin (Wang *et al.*, 1997). AraC é fosforilado por deoxicitidina cinase (dCK) e pirimidina cinases, gerando um nucleotídeo derivado de AraC, o qual inibe a DNA polimerase e é incorporado ao DNA (Major *et al.*, 1981; Gunji *et al.*, 1991), tanto nuclear quanto mitocondrial (Zhu *et al.*, 2000). O dano ao mtDNA é potencializado pelo fato de análogos de nucleosídeos serem fosforilados tanto dentro da mitocôndria quanto no citosol, sendo posteriormente transportados para dentro da organela (Chen *et al.*, 1991; Chen & Cheng, 1992; Bridges *et al.*, 1999). Estes compostos acumulam-se no meio intramitocondrial, uma vez que não parece existir transportadores para exportação dos mesmos pela organela, levando a dano cumulativo ao mtDNA (Zhu *et al.*, 2000). Como consequência, além do dano ao DNA nuclear e ativação de DDR, AraC causa alterações da permeabilidade da mitocôndria, perda do potencial de membrana mitocondrial e apoptose pela via mitocondrial (Kim *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2007), efeito que pode ser mediado pelo aumento de ROS intracelular (Geller *et al.*, 2001; Iacobini *et al.*, 2001). Este mecanismo de ação múltiplo (DDR, ROS e alterações mitocondriais) se assemelha muito ao mecanismo da TMZ, como descrito aqui. Também à semelhança do tratamento com TMZ, autofagia suprime a apoptose induzida por AraC, e o bloqueio da autofagia com 3MA leva à apoptose, enquanto a supressão da fase tardia da autofagia com CQ não induz morte celular apoptótica (Palmeira-Dos-Santos *et al.*, 2014).

De fato, a capacidade de remover mitocôndrias danificadas em um contexto de estresse mitocondrial parece ser fundamental para a sobrevivência celular (Kubli & Gustafsson, 2012). Neste sentido, translacionalmente, a combinação de agentes indutores de dano ao DNA com 3-MA apresenta um potencial terapêutico maior do que a combinação com agentes supressores da etapa final da autofagia. Esta hipótese é corroborada pelos dados de CPD comparando-se 3-MA com BafA1. Por outro lado, o tratamento com BafA1, CQ ou HCQ também acarreta morte celular apoptótica em um contexto de ausência de nutrientes (Boya *et al.*, 2005), em níveis inclusive maiores do que aqueles induzidos por 3MA. Porém, em privação de nutrientes não é descrita a ocorrência de dano mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos, de modo que a hipótese acima permanece válida para tratamentos que induzem a liberação de fatores pró-apoptóticos devido à indução de dano à mitocôndria.

Considerando a ativação da autofagia como adjuvante a terapias clássicas, Back e col demonstraram que a sobrevivência de células de carcinoma de células escamosas à Doxo é mediado pela ação de mTOR sobre a proteína sirtuina-1, levando ao aumento da atividade da via de proliferação celular NF- $\kappa$ B e supressão de proteínas anti-apoptóticas. Neste modelo, o tratamento com RAPA sensibilizou as células à apoptose (Back *et al.*, 2011). Aqui, demonstramos que RAPA aumentou a senescência induzida por TMZ, enquanto o tratamento com RAPA no dia 5 também levou à redução do número de células, à semelhança dos resultados de Bock e col descritos acima. Por outro lado, o tratamento com RAPA *reduziu* a senescência induzida por butirato de sódio e superexpressão de p21 em células de fibrosarcoma humano HT1080 apenas quando adicionada até 3 dias após a indução de p21 (Demidenko *et al.*, 2009). Após isso, o tratamento com RAPA não teve efeito sobre a indução de senescência, muito provavelmente porque as células já se apresentavam senescentes a partir do 3º dia. Este resultado, juntamente com os nossos, mostra a importância do protocolo de tratamento considerando moduladores de autofagia. Os resultados das nossas curvas de



CPD com RAPA sugerem que o tratamento no dia 5 levou as células tratadas com TMZ à apoptose, enquanto o pré-tratamento com RAPA seguido de TMZ aumentou (ou antecipou) a entrada em senescência por inibição prematura da proteína mTOR e de seus alvos. Porém, é importante destacar que não é possível afirmar que os efeitos observados para a RAPA no nosso modelo sejam mediados pela autofagia, uma vez que mTOR controla a expressão de inúmeras proteínas, incluindo proteínas de ciclo celular (como ciclina D), de resposta a estresse celular (como HIF-1) e fatores de crescimento (como VEGF) (Hudson *et al.*, 2002).

Neste sentido, é importante destacar que RAPA também pode suprimir o recrutamento das proteínas Rad51 e BRCA1, componentes chave no reparo de quebras duplas no DNA (Chen *et al.*, 2011), bem como o reparo por excisão de nucleotídeos em leveduras, de maneira mTOR-independente (Limson *et al.*, 2010). Dessa forma, RAPA pode sensibilizar células tumorais a agentes genotóxicos através da supressão do reparo de DNA levando, por exemplo, à catástrofe mitótica ou apoptose. De fato, a combinação de uma agente indutor de dano ao DNA combinado a moduladores de DDR tem demonstrado potencial terapêutico em células de tumores resistentes como gliomas (Hirose *et al.*, 2001a; Filippi-Chiela *et al.*, 2013a). Por outro lado, pode acabar reduzindo a capacidade de reparo de células normais expostas, por exemplo, à radiação UV. Este aspecto merece atenção ao uso clínico da RAPA.

Nessa mesma linha, outro aspecto importante refere-se ao fato desse composto atuar como supressor do sistema imune, motivo pelo qual RAPA é utilizada em pacientes (transplantados ou com doenças autoimunes). Assim como descrito acima, o sistema imune é fundamental para o combate a pré-tumores e eliminação de células tumorais, bem como contribui no mecanismo de toxicidade de diversas terapias antitumorais. Assim, a repressão do sistema imune causada pela RAPA pode acabar interferindo na eficácia terapêutica naqueles tumores onde o sistema imune tem papel importante.

Porém, o papel de supressão do sistema imune parece não interferir na eficácia de derivados da RAPA, uma vez que o uso clínico de rapálogos (composto derivado da RAPA) em câncer vem crescendo. *Temsirolimus* (CCI-779) é aprovado para uso em carcinoma renal (<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/temsirolimus>), enquanto *Everolimus* (RAD-001) é aprovado em câncer de mama, pâncreas, carcinoma renal e astrocitoma de células gigantes (<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/everolimus>). Ensaios clínicos para avaliar o a segurança ou efeito, em câncer, da combinação de quimioterápicos com rapálogos, estão depositados no *clinicaltrials.gov*. Em glioblastoma são 30 *trials* clínicos em andamento. Destes, 5 tem publicações disponíveis. Três deles são estudos de fase I que comprovam a segurança do uso de sirolimus e everolimus em pacientes em combinação com TMZ e radiação ou gefitinib (Reardon *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2012; Chinnaiyan *et al.*, 2013). Os outros 2 estudos são de fase II, porém, a adição de sirolimus combinado a erlotinib, (inibidor de EGFR) ou TMZ + bevacizumab (anti-VEGF), apesar de bem tolerada, não resultou em aumento da eficácia terapêutica (Reardon *et al.*, 2010; Hainsworth *et al.*, 2012).

#### Perspectivas

1. *Produzir células estavelmente silenciadas para Atg4, Atg5, Atg7 e Atg6 e avaliar a resposta destas células à TMZ e outros quimioterápicos – em andamento.*
2. *Realizar ensaio clonogênico após tratamento com RAPA+TMZ+3MA com as linhagens de glioma humano sensíveis (U87, U251, U343) e resistentes (U138) à TMZ – em andamento.*

### Resumo

*As células apresentaram uma resposta bastante heterogênea considerando a cinética de autofagia e aquisição de fenótipo senescente, sem correlação entre marcadores dos mecanismos. Apesar desta heterogeneidade, 95% das células reduziram autofagia entre os dias 4 e 4.5. Células com níveis reduzidos de autofagia apresentaram uma probabilidade maior de entrar em apoptose.*

Estudos populacionais de células *in vitro* podem mascarar a presença de subpopulações celulares ou respostas disparadas por determinados grupos de células, aspecto crítico principalmente considerando populações celulares heterogêneas como linhagens celulares tumorais. Esta ampla heterogeneidade faz com que um tratamento único dispare múltiplas respostas. Neste sentido, estudos de células únicas contribuem para o entendimento dos mecanismos que compõem uma resposta média populacional, bem como para a observação de efeitos celulares específicos e análise da interação entre diferentes mecanismos na mesma célula. Entretanto, trabalhos que se apropriam do acompanhamento das mesmas células ao longo do tempo ainda são escassos. Na presente tese, realizamos o acompanhamento de células únicas no período crítico que envolve a transição populacional de um estado autofágico para um estado senescente. Mesmo sabendo que o acompanhamento das células únicas ocorreu apenas por um período específico de tempo ao longo do experimento, através desta abordagem nós fomos capazes de responder algumas questões importantes na interação entre autofagia, senescência e morte celular:

*a. A redução da autofagia é necessária para entrada em senescência? Existe um padrão de resposta de autofagia e/ou senescência celular?*

**R.:** Inicialmente, tentamos realizar a separação das curvas de cada célula através da análise de ligação e a montagem de dendogramas. Porém, provavelmente devido à alta heterogeneidade de resposta das células ou 'n' pequeno não foi possível separar as células em perfis definidos. Posteriormente, observamos 3 perfis diferentes considerando o maior intervalo de redução da autofagia e o maior aumento de área celular, cada um correspondendo a aproximadamente 1/3 das células. As células reduziram autofagia antes, em concomitância ou após a aquisição de fenótipo senescente, demonstrando que não é necessário que a autofagia reduza para que a célula adquira esse fenótipo, nem que a redução da autofagia ocorre somente após a entrada da célula em estado senescente.

*b. A quantidade de autofagia pode prever o destino da célula ou revelar o histórico recente da célula?*

**R.:** Pares ou grupos de células foram selecionados em pontos específicos do experimento e acompanhadas: células que partiram com características semelhantes no dia 3 não necessariamente seguiram caminhos semelhantes, da mesma forma que células que atingiram o dia 4 com características similares não necessariamente seguiram para o mesmo desfecho no dia 4.5. Finalmente, células que chegaram ao dia 4.5 com características similares não necessariamente apresentaram históricos similares de autofagia ou área nuclear/celular.

Por outro lado, em contraponto a esta heterogeneidade, do dia 4 ao dia 4.5 mais de 90% das células reduziram autofagia. É importante destacar que este mecanismo orquestrado de redução da autofagia ocorre independente da proteína mTOR, a qual se manteve inibida até o dia 7, e independente da aquisição ou não do fenótipo senescente, uma vez que mesmo células que permaneceram com áreas nuclear e celular baixa reduziram bruscamente a área de GFP-LC3 no dia 4. Uma hipótese plausível neste caso é a de que as células senescentes poderiam estar liberando para o meio extracelular, entre os componentes do fenótipo secretor associado à senescência (SASP), alguma molécula parácrina mediadora da redução orquestrada da autofagia observada no dia 4. De fato, como sugerido no Capítulo V, a partir do dia 3 a população de células tratadas com TMZ já apresenta um perfil senescente.

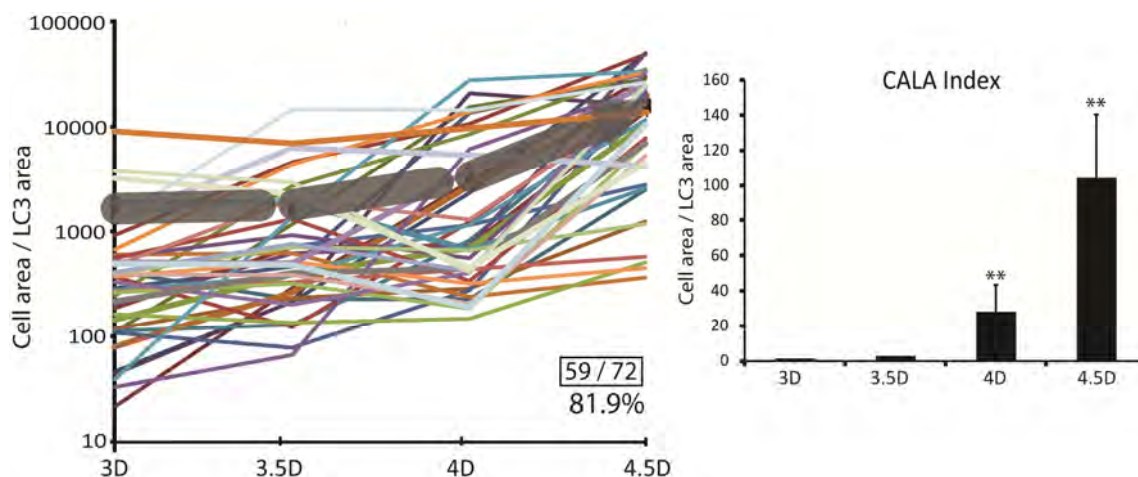
*c. Existe correlação entre níveis de autofagia ou pico máximo de indução de autofagia e aquisição de fenótipo senescente?*

R.: A nível populacional, a média da área de GFP-LC3 e a porcentagem média de células GFP-LC3-positivas correlacionaram negativamente com o aumento médio da área celular. Esta correlação se mostrou forte tanto considerando as variações médias do dia 0 ao dia 7 quanto o intervalo do experimento de células únicas (dia 3 ao dia 4.5). Entretanto, a nível celular não foi encontrada nenhuma correlação entre variação da área celular e área total de GFP-LC3 ou pico máximo de área de GFP-LC3. Dessa forma, pode-se concluir que a média populacional não representa o que acontece com as células individualmente, as quais compõem diferentes subgrupos com respostas semelhantes, como sugerido na resposta à pergunta (a) acima.

Em resumo, nossos dados de células únicas reforçam fortemente a hipótese de que autofagia e senescência são induzidas por dano ao DNA de modo paralelo, independente e com cinéticas diferentes. Esta diferente cinética de ocorrência de cada mecanismo a nível populacional é responsável por gerar o perfil de transição de autofagia para senescência, como havia sido hipotetizado por Gewritz (Gewirtz, 2014). Senescência é a resposta terminal de células expostas ao estresse da injúria genômica e que sobreviveram em função da autofagia citoprotetora disparada após o dano ao DNA. Corroborando esta hipótese, recentemente Xu et al (2013) e col avaliaram, através do acompanhamento de células únicas, a dinâmica diferencial de autofagia e morte celular em fibroblastos expostos ao agente staurosporina (STS). Células com densidade elevada de autofagossomos resistiram à morte celular apoptótica induzida por STS, enquanto células que sofreram apoptose apresentavam área de autofagossomos reduzida ao longo do experimento. Estes dados corroboram nossos resultados mostrando que células com área reduzida de GFP-LC3 no dia 3 apresentam uma probabilidade maior de morrerem ou não conseguirem entrar em senescência, e que a inibição de autofagia desvia as células para apoptose.

Terapeuticamente, sabe-se que apenas uma subpopulação restrita de células mantém a capacidade proliferativa após um tratamento indutor de dano ao DNA em glioblastoma, levando à recorrência (Chen et al., 2012). Recentemente, demonstramos que a porcentagem de células de glioma U87 que mantém a capacidade clonogênica *in vitro* após tratamento agudo com TMZ é de aproximadamente 12% (Filippi-Chiela e col, 2013). Aqui, nós observamos que 82% das células acompanhadas apresentaram aumento de um índice que representa a passagem de um estado celular autofágico para um estado senescente, o “Cell

**Área / LC3-GFP Área” Index (CALA Index) (Figura 18).** Em paralelo, 8% das células sofreram alterações morfológicas típicas de apoptose durante o acompanhamento de células únicas. Dessa forma, é plausível que os 10% de células restantes, não-apoptóticas e não-CALA-positivas (células que não adquirem um fenótipo senescente e não autofágico após o tratamento com TMZ), correspondam aos 10-12% de células, o mesmo número que mantém a capacidade clonogênica após o tratamento com TMZ.



**Figura 18 – Índice da razão da área celular pela área de GFP-LC3 em células tratadas com TMZ.** Nós geramos um índice chamado CALA (Cell Area / LC3-GFP Area) para cada célula acompanhada ao longo da análise de células únicas, exceto para as células apoptóticas. Este índice representa a passagem de um estado celular autofágico não senescente para um estado celular não mais autofágico e com fenótipo senescente. À esquerda é mostrada a dinâmica deste índice para cada célula ao longo dos tempos do experimento, bem como a média de todas as células (linha cinza grossa). Observe que o eixo y está em escala logarítmica. Os números dentro do quadro preto representam o número de células CALA-positivas em relação ao total de células e, abaixo, a porcentagem referente. À direita é mostrada a média do CALA  $\pm$  erro padrão para cada tempo de análise. \*\*  $p < 0.01$  em relação ao tempo 3D.

### Perspectivas

1. Realizar o acompanhamento de células únicas após tratamento com outros indutores de dano ao DNA, senescência e autofagia, tais como Doxo e Carmustina (utilizado em clínica contra gliomas).
2. Acompanhar as células resistentes à TMZ a partir do dia 7, tratadas ou não com 3MA ou RAPA.

## CONCLUSÕES

Como principais conclusões dos capítulos que compõem a tese, podemos destacar:

### **CAPÍTULOS I - *Artigo original (publicado - PlosOne) - Nuclear Morphometric Analysis (NMA)***

Conclusão: Através da análise da morfometria nuclear, pode-se ter uma ideia inicial sobre o efeito que um determinado tratamento exerce sobre uma população celular. Através deste método é possível avaliar apoptose, senescência e irregularidades nucleares, como aquelas apresentadas por células em processo de catástrofe mitótica.

### **CAPÍTULO II - *Artigo de Revisão (publicado - Cell Death and Differentiation) - Autophagy and Genomic Integrity***

Conclusão: Autofagia é induzida por dano ao DNA através de inúmeras vias de sinalização intracelular. Esta autofagia pode favorecer tanto a sobrevivência celular, bem como contribuir para a toxicidade de um determinado tratamento citotóxico. De qualquer forma, a modulação da autofagia no contexto de dano ao DNA parece ser uma boa estratégia terapêutica.

### **CAPÍTULO III - *Artigo Original (submetido ao periódico Autophagy) - Single cell analysis changes the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage.***

Conclusão: Dano ao DNA induzido por TMZ dispara autofagia transiente e senescência a longo prazo, mediados por ativação das vias AMPK/ULK1 e p38 (autofagia) e supressão da via Akt/mTOR e aumento de p21 (senescência). Apesar da forte correlação negativa entre autofagia e senescência a nível populacional, em função da diferente cinética de indução a nível de células únicas esta correlação não ocorre, e autofagia e senescência parecem ser interdependentes. Na verdade, autofagia permite a senescência celular a longo prazo por reprimir a indução de apoptose.

### **CAPÍTULO IV - *Comentário (a ser submetido ao periódico Autophagy): Sleep or let die: two sides of the same coin in the inhibition of autophagy***

Conclusão: Estudos que tem como objetivo investigar o papel da autofagia induzida por um determinado tratamento usualmente apropriam-se de inibidores do mecanismo. Entretanto, autofagia modula inúmeros mecanismos celulares e, conseqüentemente, sua inibição interfere no destino celular. Aqui, sugerimos que os estudos que integram autofagia e apoptose, necrose, senescência e ciclo celular com inibidores de autofagia sejam bem planejados e contemplem todos os mecanismos, para evitar viés de análise e interpretações equivocadas.

### **CAPÍTULO V - *Short take (a ser submetido ao periódico Aging Cell): Kinetic Analysis Of Morphological Alterations In DNA Damage-Induced Senescence In vitro***

Conclusão: Durante o desenvolvimento do capítulo III, observamos que marcadores de senescência celular *In vitro* (como aumento da área nuclear e celular, aumento da atividade da enzima SA- $\beta$ -Gal e dos níveis de p21) apresentam cinéticas de ocorrência diferentes ao longo do estabelecimento do mecanismo. Aqui, nós descrevemos a cinética de acontecimento destes marcadores no modelo de senescência induzida por TMZ em células de glioma, e encontramos que o núcleo celular aumenta de tamanho no início do estabelecimento do fenótipo senescente, correlacionando fortemente com a curva de proliferação. Por outro lado,

a marcação com SA- $\beta$ -Gal e níveis de p21 aumentam tardiamente e correlacionam menos com a curva de proliferação.

## PERSPECTIVAS

As principais perspectivas da presente tese foram apresentadas ao final de cada hipótese na seção Discussão Integrada, e estão agrupadas aqui

### Perspectivas - Hipótese Oxidativa

- *Investigar quais alvos de ROS estão sendo modulados no contexto do tratamento com TMZ.*
- *Testar se este mecanismo ocorre também para outros indutores de dano ao DNA e em outros tipos tumorais, bem como por outros mecanismos de indução de senescência.*

### Perspectivas - Hipótese Mitocondrial

- *Avaliar os níveis e sublocalização de BNIP3, e microscopia confocal para mitofagia.*
- *Avaliar a funcionalidade mitocondrial (marcadores específicos fluorescentes).*
- *Separar populações mitocondriais através de sorting em citometria de fluxo (em andamento).*

### Perspectivas - Hipótese da proteína Atg5

- *Analisar os níveis de Atg5 após tratamento com TMZ e outros compostos genotóxicos.*
- *Silenciar a proteína Atg5 em células de glioma e avaliar a consequência frente ao tratamento com indutores de dano ao DNA, bem como analisar morfometria nuclear destas células.*
- *Realizar imunohistoquímica para localização subcelular de Atg5.*

### Perspectivas - Outros modelos

- *Concluir os experimentos com Doxo em células de câncer de mama e VCR em células de glioma e avaliar o papel da autofagia na senescência e morte celular.*
- *Avaliar o papel da autofagia induzida por outros compostos citotóxicos indutores de senescência, bem como em outros tipos tumorais, especialmente os resistentes à apoptose.*

### Perspectivas - Autofagia e terapia

- *Produzir células estavelmente silenciadas para Atg4, Atg5, Atg7 e Atg6 e avaliar a resposta destas células à TMZ e outros quimioterápicos – em andamento.*
- *Realizar ensaio clonogênico após tratamento com RAPA+TMZ+3MA com as linhagens de glioma humano sensíveis (U87, U251, U343) e resistentes (U138) à TMZ – em andamento.*

### Perspectivas - Células únicas

- *Realizar o acompanhamento de células únicas após tratamento com outros indutores de dano ao DNA, senescência e autofagia, tais como Doxo e Carmustina (utilizado em clínica contra gliomas).*
- *Acompanhar as células resistentes à TMZ a partir do dia 7, tratadas ou não com 3MA ou RAPA.*

## FIGURAS SUPLEMENTARES

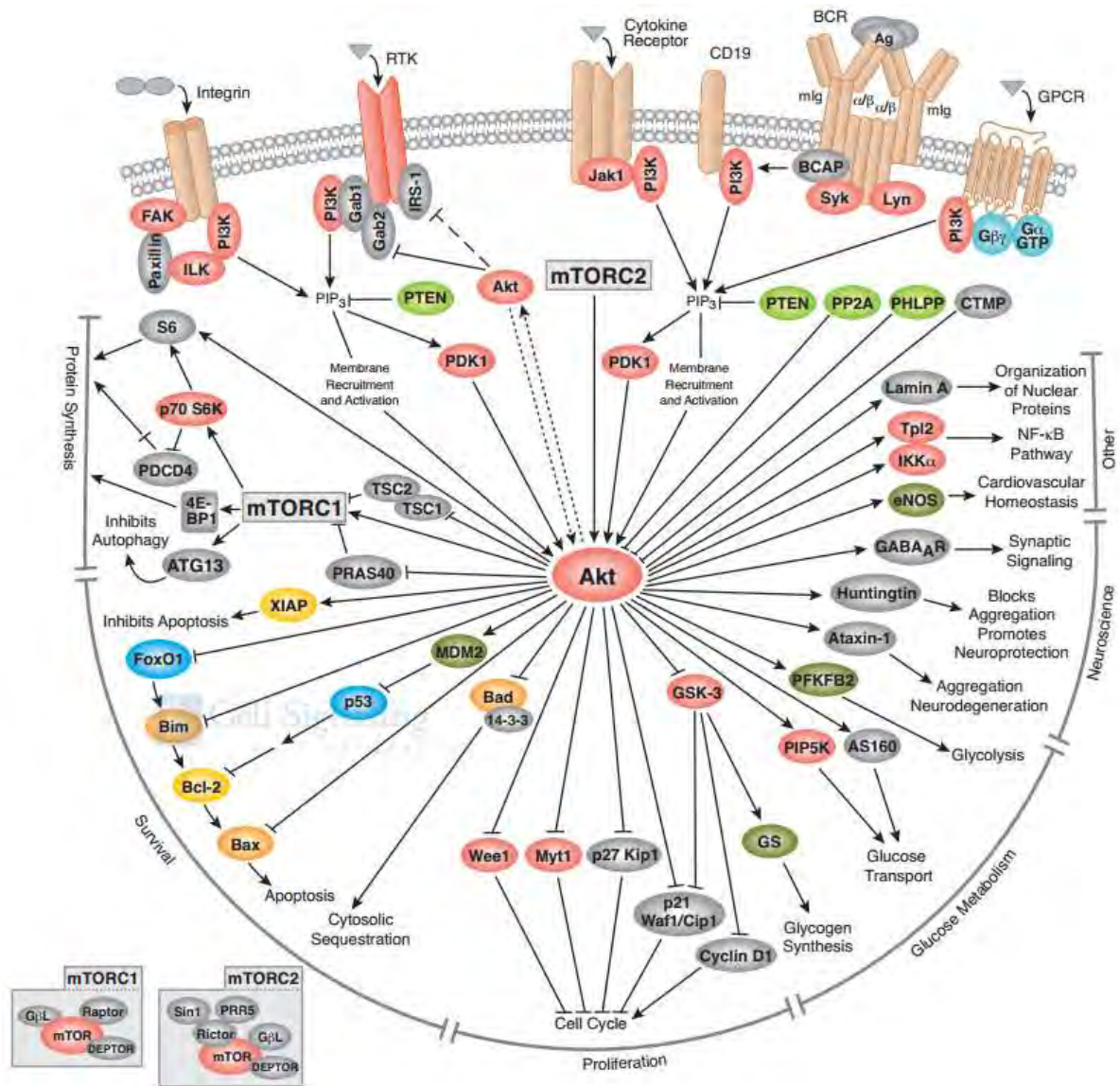
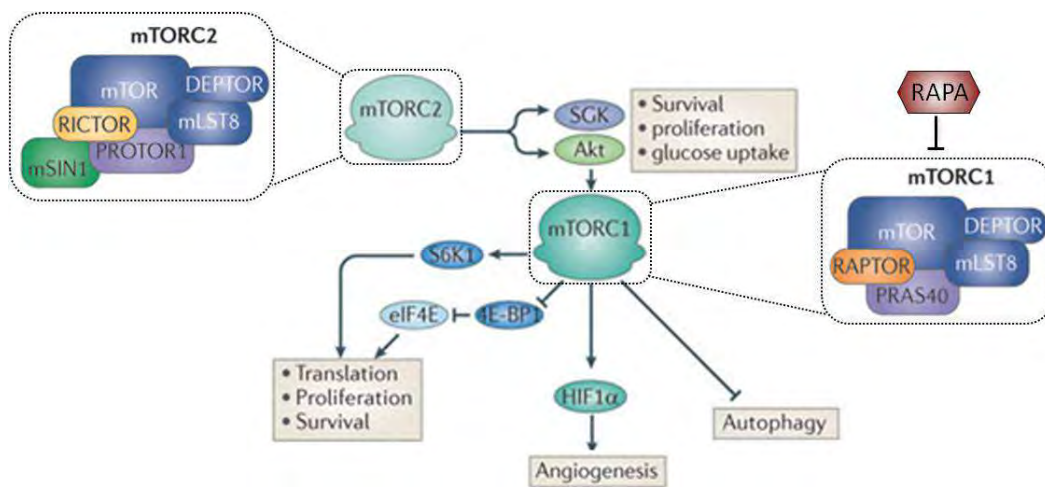
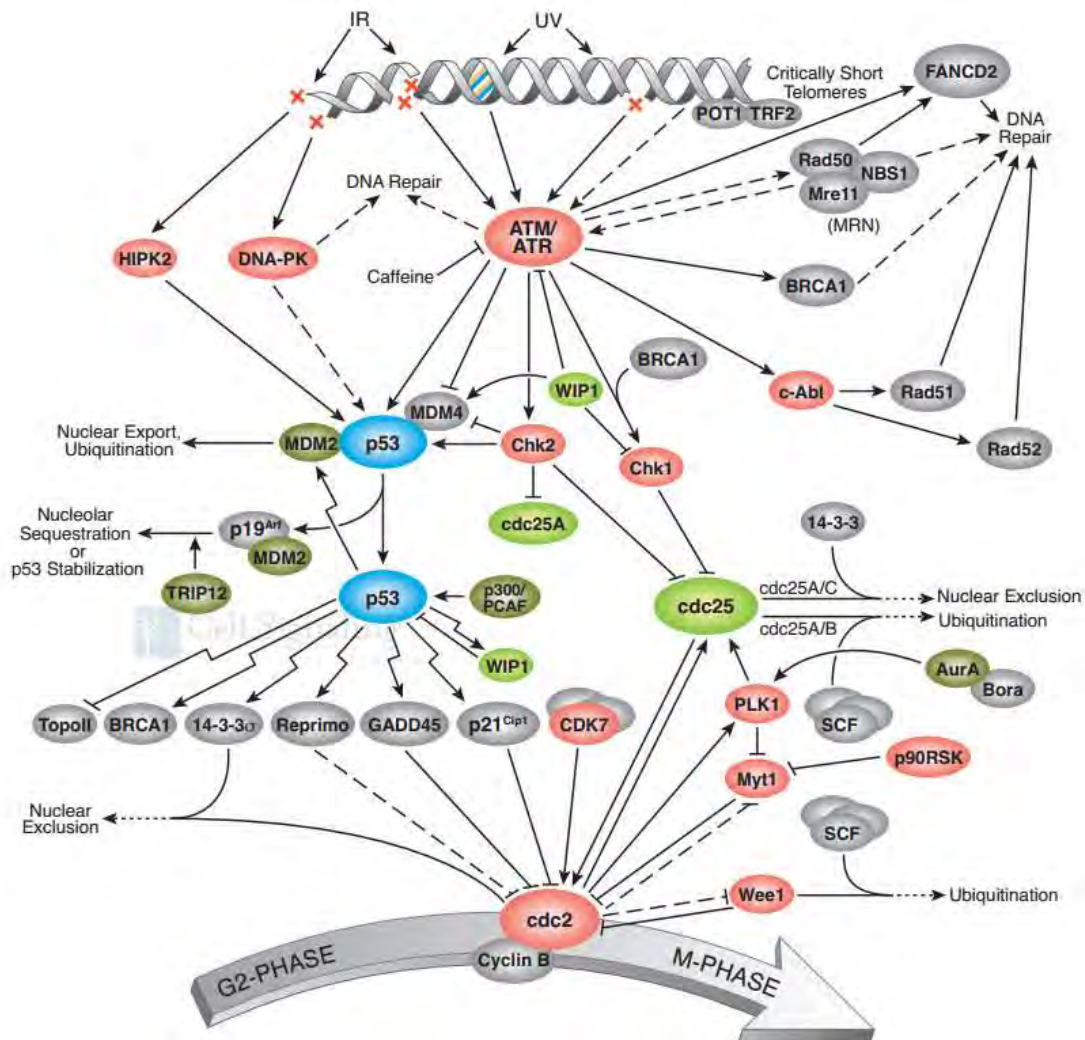


Figura Suplementar 1 - Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. Obtida de [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com), em 12/04/2014.



**Figura Suplementar 2 - Complexos mTOR1 e mTOR2 e principais sinalizações associada.** Adaptado de *mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing* e *Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights* (Zoncu et al., 2011).





**Figura Suplementar 3 - Sinalização reguladora do ponto de checagem de G2/M.**  
 Obtido de [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com), em 12/04/2014

## REFERENCIAS

- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC & Levine B (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* **59**, 59-65.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D & Barrett JC (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13742-13747.
- Alers S, Löffler AS, Wesselborg S & Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* **32**, 2-11.
- Alexander K & Hinds PW (2001) Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol Cell Biol* **21**, 3616-3631.
- Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, Thomas-Tikhonenko A & Thompson CB (2007) Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* **117**, 326-336.
- Astle MV, Hannan KM, Ng PY, Lee RS, George AJ, Hsu AK, Haupt Y, Hannan RD & Pearson RB (2012) AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* **31**, 1949-1962.
- Austin S & St-Pierre J (2012) PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci* **125**, 4963-4971.
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G & Ktistakis NT (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701.
- Back JH, Rezvani HR, Zhu Y, Guyonnet-Duperat V, Athar M, Ratner D & Kim AL (2011) Cancer cell survival following DNA damage-mediated premature senescence is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of sirtuin 1. *J Biol Chem* **286**, 19100-19108.
- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 505-510.
- Band M, Joel A, Hernandez A & Avivi A (2009) Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: in vivo comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *FASEB J* **23**, 2327-2335.
- Bardeesy N & Sharpless NE (2006) RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 451-453.
- Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, Andersen CL, Dyrskjot L, Orntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J & Gorgoulis VG (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-637.
- Basit F, Cristofanon S & Fulda S (2013) Obatoclastax (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell Death Differ* **20**, 1161-1173.
- Beier D, Rohrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, Proescholdt M, Brawanski A, Bogdahn U, Trampe-Kieslich A, Giebel B, Wischhusen J, Reifenberger G, Hau P & Beier CP (2008) Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* **68**, 5706-5715.
- Beis I & Newsholme EA (1975) The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* **152**, 23-32.

- Bennett DC (2003) Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* **22**, 3063-3069.
- Bhaskar PT & Hay N (2007) The two TORCs and Akt. *Dev Cell* **12**, 487-502.
- Biasoli D, Kahn SA, Cornelio TA, Furtado M, Campanati L, Chneiweiss H, Moura-Neto V & Borges HL (2013) Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. *Cell Death Dis* **4**, e767.
- Bito T, Sumita N, Masaki T, Shirakawa T, Ueda M, Yoshiki R, Tokura Y & Nishigori C (2010) Ultraviolet light induces Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage. *Exp Dermatol* **19**, 654-660.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S & Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P & Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**, 1025-1040.
- Boya P, Reggiori F & Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* **15**, 713-720.
- Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, Schlegelberger B, Stein H, Dorken B, Jenuwein T & Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**, 660-665.
- Bridges EG, Jiang Z & Cheng YC (1999) Characterization of a dCTP transport activity reconstituted from human mitochondria. *J Biol Chem* **274**, 4620-4625.
- Brown JP, Wei W & Sedivy JM (1997) Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**, 831-834.
- Burton DG (2009) Cellular senescence, ageing and disease. *Age (Dordr)* **31**, 1-9.
- Campisi J (1997) The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* **33**, 703-709.
- Campisi J (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **11**, S27-31.
- Cantley LC & Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-4245.
- Cao X, Liu B, Cao W, Zhang W, Zhang F, Zhao H, Meng R, Zhang L, Niu R, Hao X & Zhang B (2013) Autophagy inhibition enhances apigenin-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Chin J Cancer Res* **25**, 212-222.
- Carew JS & Huang P (2002) Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* **1**, 9.
- Carew JS, Medina EC, Esquivel JA, 2nd, Mahalingam D, Swords R, Kelly K, Zhang H, Huang P, Mita AC, Mita MM, Giles FJ & Nawrocki ST (2010) Autophagy inhibition enhances vorinostat-induced apoptosis via ubiquitinated protein accumulation. *J Cell Mol Med* **14**, 2448-2459.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R & Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825-2837.
- Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C & Maity A (2012) Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol* **82**, 1230-1240.
- Chan EY, Kir S & Tooze SA (2007) siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* **282**, 25464-25474.
- Chan EY, Longatti A, McKnight NC & Tooze SA (2009) Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* **29**, 157-171.

- Chen CH & Cheng YC (1992) The role of cytoplasmic deoxycytidine kinase in the mitochondrial effects of the anti-human immunodeficiency virus compound, 2',3'-dideoxycytidine. *J Biol Chem* **267**, 2856-2859.
- Chen CH, Vazquez-Padua M & Cheng YC (1991) Effect of anti-human immunodeficiency virus nucleoside analogs on mitochondrial DNA and its implication for delayed toxicity. *Mol Pharmacol* **39**, 625-628.
- Chen H, Ma Z, Vanderwaal RP, Feng Z, Gonzalez-Suarez I, Wang S, Zhang J, Roti Roti JL & Gonzalo S (2011) The mTOR inhibitor rapamycin suppresses DNA double-strand break repair. *Radiat Res* **175**, 214-224.
- Chen N & Debnath J (2010) Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* **584**, 1427-1435.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM & Sherr CJ (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* **18**, 1571-1583.
- Cheung-Ong K, Giaever G & Nislow C (2013) DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol* **20**, 648-659.
- Cheung M & Testa JR (2013) Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy. *Curr Cancer Drug Targets* **13**, 234-244.
- Chiao MT, Cheng WY, Yang YC, Shen CC & Ko JL (2013) Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) causes tumor growth slowdown and triggers autophagy in glioblastoma stem cells. *Autophagy* **9**, 1509-1526.
- Chinnaiyan P, Won M, Wen PY, Rojiani AM, Wendland M, Dipetrillo TA, Corn BW & Mehta MP (2013) RTOG 0913: a phase 1 study of daily everolimus (RAD001) in combination with radiation therapy and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **86**, 880-884.
- Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L & Cloughesy T (2014) Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**, 709-722.
- Cho DH, Jo YK, Kim SC, Park IJ & Kim JC (2012) Down-regulated expression of ATG5 in colorectal cancer. *Anticancer Res* **32**, 4091-4096.
- Cho S, Park J & Hwang ES (2011) Kinetics of the cell biological changes occurring in the progression of DNA damage-induced senescence. *Mol Cells* **31**, 539-546.
- Christov KT, Shilkaitis AL, Kim ES, Steele VE & Lubet RA (2003) Chemopreventive agents induce a senescence-like phenotype in rat mammary tumours. *Eur J Cancer* **39**, 230-239.
- Cioce M & Blandino G (2011) PGC1alpha confers specificity-metabolic stress and p53-dependent transcription. *Mol Cell* **44**, 515-516.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL & Wahl GM (2006) Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**, 9339-9344.
- Cohen MH, Johnson JR & Pazdur R (2005) Food and Drug Administration Drug approval summary: temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* **11**, 6767-6771.
- Colavitti R & Finkel T (2005) Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life* **57**, 277-281.
- Collado M & Serrano M (2006) The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* **6**, 472-476.
- Collado M & Serrano M (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* **10**, 51-57.
- Collins CJ & Sedivy JM (2003) Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* **2**, 145-150.

- Cook KL, Soto-Pantoja DR, Abu-Asab M, Clarke PA, Roberts DD & Clarke R (2014) Mitochondria directly donate their membrane to form autophagosomes during a novel mechanism of parkin-associated mitophagy. *Cell Biosci* **4**, 16.
- Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A & Campisi J (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* **5**, 99-118.
- Coppe JP, Kauser K, Campisi J & Beausejour CM (2006) Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* **281**, 29568-29574.
- Crichton D, O'Prey J, Bell HS & Ryan KM (2007) p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ* **14**, 1071-1079.
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T & Ryan KM (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**, 121-134.
- Cuervo AM (2010) The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat Cell Biol* **12**, 735-737.
- d'Adda di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* **8**, 512-522.
- Darefsky AS, King JT, Jr. & Dubrow R (2012) Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: a population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. *Cancer* **118**, 2163-2172.
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J & Desprez PY (2010) Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 273-283.
- Debnath J (2008) Detachment-induced autophagy during anoikis and lumen formation in epithelial acini. *Autophagy* **4**, 351-353.
- Demidenko ZN, Zubova SG, Bukreeva EI, Pospelov VA, Pospelova TV & Blagosklonny MV (2009) Rapamycin decelerates cellular senescence. *Cell Cycle* **8**, 1888-1895.
- Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, D'Amelio M, Nardacci R, Romagnoli A, Piacentini M, Cecconi F & Fimia GM (2010) The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* **191**, 155-168.
- Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG & d'Adda di Fagagna F (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638-642.
- Dimri GP & Campisi J (1994) Molecular and cell biology of replicative senescence. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 67-73.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O & et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367.
- Eby KG, Rosenbluth JM, Mays DJ, Marshall CB, Barton CE, Sinha S, Johnson KN, Tang L & Pietsenpol JA (2010) ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Mol Cancer* **9**, 95.
- Egan D, Kim J, Shaw RJ & Guan KL (2011a) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**, 643-644.
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M & Shaw RJ (2011b) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456-461.
- Eldredge HB, Denittis A, Duhadaway JB, Chernick M, Metz R & Prendergast GC (2013) Concurrent Whole Brain Radiotherapy and Short-Course Chloroquine in Patients with Brain Metastases: A Pilot Trial. *J Radiat Oncol* **2**.

- Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutlu GM, Viollet B, Budinger GR & Chandel NS (2009) Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* **46**, 1386-1391.
- Erusalimsky JD & Kurz DJ (2005) Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol* **40**, 634-642.
- Faragher RG, Burton DG, Majecka P, Fong NS, Davis T, Sheerin A & Ostler EL (2011) Resveratrol, but not dihydroresveratrol, induces premature senescence in primary human fibroblasts. *Age (Dordr)*.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ & Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8204-8209.
- Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD & Lenz G (2012) Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* **7**, e42522.
- Filippi-Chiela EC, Thome MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, Zamin LL & Lenz G (2013a) Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* **13**, 147.
- Filippi-Chiela EC, Vessoni AT, Menck CF & Lenz G (2013b) Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ* **20**, 1444-1454.
- Filippi-Chiela EC, Villodre ES, Zamin LL & Lenz G (2011) Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One* **6**, e20849.
- Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Lenz G (2013) Recent Patents on Morphometric Analysis of Eukaryotic Cells. *Rec Patents on Med Imag* **3**, 123-134.
- Flatt PM, Tang LJ, Scatena CD, Szak ST & Pietenpol JA (2000) p53 regulation of G(2) checkpoint is retinoblastoma protein dependent. *Mol Cell Biol* **20**, 4210-4223.
- Fu J, Liu ZG, Liu XM, Chen FR, Shi HL, Pangjesse CS, Ng HK & Chen ZP (2009) Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. *Chin Med J (Engl)* **122**, 1255-1259.
- Fulda S, Galluzzi L & Kroemer G (2010) Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 447-464.
- Funayama R & Ishikawa F (2007) Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* **116**, 431-440.
- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E & Debnath J (2008) Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* **19**, 797-806.
- Galluzzi L, Kepp O & Kroemer G (2010) TP53 and MTOR crosstalk to regulate cellular senescence. *Aging (Albany NY)* **2**, 535-537.
- Galluzzi L, Larochette N, Zamzami N & Kroemer G (2006) Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* **25**, 4812-4830.
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S & Jiang X (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **284**, 12297-12305.
- Gao W, Shen Z, Shang L & Wang X (2011) Upregulation of human autophagy-initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA-damage-induced cell death. *Cell Death Differ* **18**, 1598-1607.
- Gargini R, Garcia-Escudero V & Izquierdo M (2011) Therapy mediated by mitophagy abrogates tumor progression. *Autophagy* **7**, 466-476.
- Gdynia G, Keith M, Kopitz J, Bergmann M, Fassl A, Weber AN, George J, Kees T, Zentgraf HW, Wiestler OD, Schirmacher P & Roth W (2010) Danger signaling protein HMGB1 induces a distinct form of cell death accompanied by formation of giant mitochondria. *Cancer Res* **70**, 8558-8568.

- Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL, Morris EJ & Grandison L (2001) Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside. *J Neurochem* **78**, 265-275.
- Gewirtz DA (2013) Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy* **9**, 808-812.
- Gewirtz DA (2014) Autophagy and senescence in cancer therapy. *J Cell Physiol* **229**, 6-9.
- Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, Colman H, Chakravarti A, Pugh S, Won M, Jeraj R, Brown PD, Jaeckle KA, Schiff D, Stieber VW, Brachman DG, Werner-Wasik M, Tremont-Lukats IW, Sulman EP, Aldape KD, Curran WJ, Jr. & Mehta MP (2014) A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* **370**, 699-708.
- Goehe RW, Di X, Sharma K, Bristol ML, Henderson SC, Valerie K, Rodier F, Davalos AR & Gewirtz DA (2012) The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther* **343**, 763-778.
- Goldberg SB, Supko JG, Neal JW, Muzikansky A, Digumarthy S, Fidas P, Temel JS, Heist RS, Shaw AT, McCarthy PO, Lynch TJ, Sharma S, Settleman JE & Sequist LV (2012) A phase I study of erlotinib and hydroxychloroquine in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **7**, 1602-1608.
- Gordon RR & Nelson PS (2012) Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resist Updat* **15**, 123-131.
- Granger MP, Wright WE & Shay JW (2002) Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* **41**, 29-40.
- Gunji H, Kharbanda S & Kufe D (1991) Induction of internucleosomal DNA fragmentation in human myeloid leukemia cells by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* **51**, 741-743.
- Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, Collier HA, Dipaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD & White E (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* **25**, 460-470.
- Gustafsson AB (2011) Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr Cardiol* **32**, 267-274.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE & Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**, 214-226.
- Haferkamp S, Tran SL, Becker TM, Scurr LL, Kefford RF & Rizos H (2009) The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence. *Aging (Albany NY)* **1**, 542-556.
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N & Hay N (2005) Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* **280**, 32081-32089.
- Hainsworth JD, Shih KC, Shepard GC, Tillinghast GW, Brinker BT & Spigel DR (2012) Phase II study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and bevacizumab followed by bevacizumab/everolimus as first-line treatment for patients with glioblastoma. *Clin Adv Hematol Oncol* **10**, 240-246.
- Hampel B, Wagner M, Teis D, Zwerschke W, Huber LA & Jansen-Durr P (2005) Apoptosis resistance of senescent human fibroblasts is correlated with the absence of nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* **4**, 325-330.
- Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin XM & Rabinowich H (2008) Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem* **283**, 19665-19677.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S, Natsume T, Guan JL & Mizushima N (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* **181**, 497-510.
- Harley CB (1997) Human ageing and telomeres. *Ciba Found Symp* **211**, 129-139; discussion 139-144.
- Harley CB (2008) Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **8**, 167-179.
- Harley CB, Futcher AB & Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
- Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**, 614-636.
- Hayflick L & Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
- Heiss EH, Schilder YD & Dirsch VM (2007) Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* **282**, 26759-26766.
- Hirose Y, Berger MS & Pieper RO (2001a) Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**, 5843-5849.
- Hirose Y, Berger MS & Pieper RO (2001b) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* **61**, 1957-1963.
- Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva OK, Berger MS & Pieper RO (2005) Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. *Cancer Res* **65**, 4861-4869.
- Hirose Y, Katayama M, Stokoe D, Haas-Kogan DA, Berger MS & Pieper RO (2003) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. *Mol Cell Biol* **23**, 8306-8315.
- Hoare M & Narita M (2013) Transmitting senescence to the cell neighbourhood. *Nat Cell Biol* **15**, 887-889.
- Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T & Mizushima N (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**, 973-979.
- Hou W, Han J, Lu C, Goldstein LA & Rabinowich H (2010) Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* **6**, 891-900.
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ & Abraham RT (2002) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* **22**, 7004-7014.
- Iacobini M, Menichelli A, Palumbo G, Multari G, Werner B & Del Principe D (2001) Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells. *Biochem Pharmacol* **61**, 1033-1040.
- Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K & Komatsu M (2011) Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* **193**, 275-284.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J & Guan KL (2002) TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* **4**, 648-657.
- Itahana K, Dimri G & Campisi J (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* **268**, 2784-2791.
- Iwasa H, Han J & Ishikawa F (2003) Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 131-144.
- Jackson SP & Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078.



- Jager S, Handschin C, St-Pierre J & Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12017-12022.
- James TW & Bohman R (1981) Proliferation of mitochondria during the cell cycle of the human cell line (HL-60). *J Cell Biol* **89**, 256-260.
- Jia K & Levine B (2007) Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in *C. elegans*. *Autophagy* **3**, 597-599.
- Jiang P & Mizushima N (2014) Autophagy and human diseases. *Cell Res* **24**, 69-79.
- Jimenez C, Hernandez C, Pimentel B & Carrera AC (2002) The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. *J Biol Chem* **277**, 41556-41562.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *Embo J* **19**, 5720-5728.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y & Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**, 2805-2812.
- Kang C, You YJ & Avery L (2007) Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev* **21**, 2161-2171.
- Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR & Park SC (2011a) Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One* **6**, e23367.
- Kang MA, So EY, Simons AL, Spitz DR & Ouchi T (2012) DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell Death Dis* **3**, e249.
- Kang R, Zeh HJ, Lotze MT & Tang D (2011b) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* **18**, 571-580.
- Katayama T, Nakanishi K, Nishihara H, Kamiyama N, Nakagawa T, Kamiyama T, Iseki K, Tanaka S & Todo S (2007) Type I interferon prolongs cell cycle progression via p21WAF1/CIP1 induction in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **31**, 613-620.
- Kawasome H, Papst P, Webb S, Keller GM, Johnson GL, Gelfand EW & Terada N (1998) Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5033-5038.
- Kim CN, Wang X, Huang Y, Ibrado AM, Liu L, Fang G & Bhalla K (1997) Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* **57**, 3115-3120.
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141.
- Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski KH, Christmann M & Kaina B (2013) Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* **8**, e55665.
- Ko A, Kanehisa A, Martins I, Senovilla L, Chargari C, Dugue D, Marino G, Kepp O, Michaud M, Perfettini JL, Kroemer G & Deutsch E (2014) Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ* **21**, 92-99.
- Komatsu M & Ichimura Y (2010) Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett* **584**, 1374-1378.
- Kondo Y & Kondo S (2006) Autophagy and cancer therapy. *Autophagy* **2**, 85-90.
- Kongara S & Karantza V (2012) The interplay between autophagy and ROS in tumorigenesis. *Front Oncol* **2**, 171.
- Koul D, Fu J, Shen R, LaFortune TA, Wang S, Tiao N, Kim YW, Liu JL, Ramnarian D, Yuan Y, Garcia-Echeverria C, Maira SM & Yung WK (2012) Antitumor activity of NVP-

- BKM120--a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. *Clin Cancer Res* **18**, 184-195.
- Kraft C, Reggiori F & Peter M (2009) Selective types of autophagy in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1404-1412.
- Kristensen AR, Schandorff S, Hoyer-Hansen M, Nielsen MO, Jaattela M, Dengjel J & Andersen JS (2008) Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy. *Mol Cell Proteomics* **7**, 2419-2428.
- Kroemer G & Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 1004-1010.
- Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY & Campisi J (2001) Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12072-12077.
- Kruyt FA & Schuringa JJ (2010) Apoptosis and cancer stem cells: Implications for apoptosis targeted therapy. *Biochem Pharmacol* **80**, 423-430.
- Kubli DA & Gustafsson AB (2012) Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* **111**, 1208-1221.
- Kubli DA, Quinsay MN, Huang C, Lee Y & Gustafsson AB (2008) Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H2025-2031.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ & Peeper DS (2010) The essence of senescence. *Genes Dev* **24**, 2463-2479.
- Kuilman T & Peeper DS (2009) Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer* **9**, 81-94.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhashi T & Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036.
- Lawless C, Wang C, Jurk D, Merz A, Zglinicki T & Passos JF (2010) Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol* **45**, 772-778.
- Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX, Ferrans VJ, Howard BH & Finkel T (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* **274**, 7936-7940.
- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW & Wei YH (2000) Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* **348 Pt 2**, 425-432.
- Lefranc F, Rynkowski M, DeWitte O & Kiss R (2009) Present and potential future adjuvant issues in high-grade astrocytic glioma treatment. *Adv Tech Stand Neurosurg* **34**, 3-35.
- Lenaz G (2012) Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? *Adv Exp Med Biol* **942**, 93-136.
- Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Merlo Pich M, Paolucci U, Parenti Castelli G & Ventura B (2002) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* **959**, 199-213.
- Leontieva OV & Blagosklonny MV (2010) DNA damaging agents and p53 do not cause senescence in quiescent cells, while consecutive re-activation of mTOR is associated with conversion to senescence. *Aging (Albany NY)* **2**, 924-935.
- Levine B & Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**, 2679-2688.
- Li D, Morimoto K, Takeshita T & Lu Y (2001) Arsenic induces DNA damage via reactive oxygen species in human cells. *Environ Health Prev Med* **6**, 27-32.
- Li L, Chen Y & Gibson SB (2013) Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal* **25**, 50-65.

- Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M & Guan KL (2007) Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J Biol Chem* **282**, 35803-35813.
- Liang XH, 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.
- Liu Y & Bassham DC (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 215-237.
- Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, Mikkelsen T & Brodie C (2009) The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer* **125**, 717-722.
- Lorenzini A, Tresini M, Mawal-Dewan M, Frisoni L, Zhang H, Allen RG, Sell C & Cristofalo VJ (2002) Role of the Raf/MEK/ERK and the PI3K/Akt(PKB) pathways in fibroblast senescence. *Exp Gerontol* **37**, 1149-1156.
- Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, Peters G & Bartek J (1995) Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**, 503-506.
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T & Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248.
- Luo J, Manning BD & Cantley LC (2003) Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 257-262.
- Luo Y, Zou P, Zou J, Wang J, Zhou D & Liu L (2011) Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPKalpha dependent manner. *Exp Gerontol* **46**, 860-867.
- Lupertz R, Watjen W, Kahl R & Chovolou Y (2010) Dose- and time-dependent effects of doxorubicin on cytotoxicity, cell cycle and apoptotic cell death in human colon cancer cells. *Toxicology* **271**, 115-121.
- Lv L, Zheng L, Dong D, Xu L, Yin L, Xu Y, Qi Y, Han X & Peng J (2013) Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: a potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme. *Food Chem Toxicol* **59**, 657-669.
- Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L & Kroemer G (2013) Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* **39**, 211-227.
- Macip S, Igarashi M, Fang L, Chen A, Pan ZQ, Lee SW & Aaronson SA (2002) Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *Embo J* **21**, 2180-2188.
- Maes H, Rubio N, Garg AD & Agostinis P (2013) Autophagy: shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* **19**, 428-446.
- Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O & Kroemer G (2007a) BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* **3**, 374-376.
- Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA & Kroemer G (2010) Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 181-185.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A & Kroemer G (2007b) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741-752.
- Major PP, Egan EM, Beardsley GP, Minden MD & Kufe DW (1981) Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3235-3239.
- Manning BD & Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261-1274.

- Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH & Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 81-94.
- Marino G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N & Lopez-Otin C (2007) Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* **282**, 18573-18583.
- Marquez RT & Xu L (2012) Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* **2**, 214-221.
- Martinou JC & Youle RJ (2011) Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* **21**, 92-101.
- Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS & Doetsch PW (2013) Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. *PLoS One* **8**, e81162.
- Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Zlobec I, Perren A, Friis R & Simon HU (2013) ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy. *Nat Commun* **4**, 2130.
- Mason WP, Macneil M, Kavan P, Easaw J, Macdonald D, Thiessen B, Urva S, Lwin Z, McIntosh L & Eisenhauer E (2012) A phase I study of temozolomide and everolimus (RAD001) in patients with newly diagnosed and progressive glioblastoma either receiving or not receiving enzyme-inducing anticonvulsants: an NCIC CTG study. *Invest New Drugs* **30**, 2344-2351.
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V & White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**, 1062-1075.
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S & White E (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* **21**, 1367-1381.
- Mathew R & White E (2011) Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**, 389-396.
- Mathon NF & Lloyd AC (2001) Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 203-213.
- Matsuura K, Wakasugi M, Yamashita K & Matsunaga T (2008) Cleavage-mediated activation of Chk1 during apoptosis. *J Biol Chem* **283**, 25485-25491.
- McPhee CK & Baehrecke EH (2009) Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1452-1460.
- Meijer AJ & Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2445-2462.
- Menendez JA, Vellon L, Oliveras-Ferraros C, Cufi S & Vazquez-Martin A (2011) mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle* **10**, 3658-3677.
- Mercer CA, Kaliappan A & Dennis PB (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**, 649-662.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ & Peeper DS (2005) BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720-724.
- Mihaylova MM & Shaw RJ (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**, 1016-1023.
- Minina EA, Sanchez-Vera V, Moschou PN, Suarez MF, Sundberg E, Weih M & Bozhkov PV (2013) Autophagy mediates caloric restriction-induced lifespan extension in *Arabidopsis*. *Aging Cell* **12**, 327-329.
- Mitsui Y & Schneider EL (1976) Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. *Exp Cell Res* **100**, 147-152.

- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T & Ohsumi Y (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* **273**, 33889-33892.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T & Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**, 1101-1111.
- Modica-Napolitano JS & Singh KK (2004) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* **4**, 755-762.
- Moiseeva O, Bourdeau V, Roux A, Deschenes-Simard X & Ferbeyre G (2009) Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* **29**, 4495-4507.
- Moscat J & Diaz-Meco MT (2009) p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* **137**, 1001-1004.
- Muller M (2009) Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal* **11**, 59-98.
- Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK & Schumacker PT (2011) Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol* **31**, 3531-3545.
- Nagahama H, Hatakeyama S, Nakayama K, Nagata M & Tomita K (2001) Spatial and temporal expression patterns of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 during mouse development. *Anat Embryol (Berl)* **203**, 77-87.
- Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A & Pandolfi PP (2011) Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **11**, 503-511.
- Nave BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR & Shepherd PR (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* **344 Pt 2**, 427-431.
- Nevins JR (2001) The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**, 699-703.
- Nishida K, Yamaguchi O & Otsu K (2008) Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res* **103**, 343-351.
- Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S & Carruba MO (2005) Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* **310**, 314-317.
- Noble JR, Rogan EM, Neumann AA, Maclean K, Bryan TM & Reddel RR (1996) Association of extended in vitro proliferative potential with loss of p16INK4 expression. *Oncogene* **13**, 1259-1268.
- Ogrunc M, Di Micco R, Lontos M, Bombardelli L, Mione M, Fumagalli M, Gorgoulis VG & d'Adda di Fagagna F (2014) Oncogene-induced reactive oxygen species fuel hyperproliferation and DNA damage response activation. *Cell Death Differ*.
- Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, 3rd, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-Usmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A & Griguer CE (2010) Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **285**, 39759-39767.
- Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Deveci R, Karacali S & Gozuacik D (2012) Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis* **17**, 810-820.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C & Barnholtz-Sloan JS (2013) CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol* **15 Suppl 2**, ii1-56.

- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M & Werner C (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* **22**, 377-384.
- Palmeira-Dos-Santos C, Pereira GJ, Barbosa CM, Jurkiewicz A, Smaili SS & Bincoletto C (2014) Comparative study of autophagy inhibition by 3MA and CQ on Cytarabine-induced death of leukaemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Pan H, Cai N, Li M, Liu GH & Izpisua Belmonte JC Autophagic control of cell 'stemness'. *EMBO Mol Med* **5**, 327-331.
- Pan X, Zhang X, Sun H, Zhang J, Yan M & Zhang H (2013) Autophagy inhibition promotes 5-fluorouracil-induced apoptosis by stimulating ROS formation in human non-small cell lung cancer A549 cells. *PLoS One* **8**, e56679.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G & Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**, 24131-24145.
- Patschan S, Chen J, Polotskaia A, Mendeleev N, Cheng J, Patschan D & Goligorsky MS (2008) Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H1119-1129.
- Pattingre S & Levine B (2006) Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* **66**, 2885-2888.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC, Jr. & Sonenberg N (1994a) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* **371**, 762-767.
- Pause A, Methot N, Svitkin Y, Merrick WC & Sonenberg N (1994b) Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *Embo J* **13**, 1205-1215.
- Peterson RT, Beal PA, Comb MJ & Schreiber SL (2000) FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* **275**, 7416-7423.
- Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S, Mourmouras V, Rubino G & Miracco C (2009) The prognostic role of Beclin 1 protein expression in high-grade gliomas. *Autophagy* **5**, 930-936.
- Posakony JW, England JM & Attardi G (1977) Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol* **74**, 468-491.
- Pospelova TV, Leontieva OV, Bykova TV, Zubova SG, Pospelov VA & Blagosklonny MV (2012) Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. *Cell Cycle* **11**, 2402-2407.
- Prabhu V, Srivastava P, Yadav N, Amadori M, Schneider A, Seshadri A, Pitarresi J, Scott R, Zhang H, Koochekpour S, Gogada R & Chandra D (2013) Resveratrol depletes mitochondrial DNA and inhibition of autophagy enhances resveratrol-induced caspase activation. *Mitochondrion* **13**, 493-499.
- Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB & Spiegelman BM (2001) Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell* **8**, 971-982.
- Puissant A, Fenouille N & Auberger P (2012) When autophagy meets cancer through p62/SQSTM1. *Am J Cancer Res* **2**, 397-413.
- Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, Nah J, Hong SH, Kam TI, Jung S & Jung YK (2013) Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun* **4**, 2300.
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G & Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1820.

- Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y & Gustafsson AB (2010) Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* **6**, 855-862.
- Ramsey LA, Ross BS & Fischer RG (1999) Phytoestrogens and the management of menopause. *Adv Nurse Pract* **7**, 26-30.
- Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Norfleet JA, McLendon RE, Sampson JH & Friedman HS (2010) Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* **96**, 219-230.
- Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A, Sathornsumetee S, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, McLendon RE, Provenzale JM, Sampson JH, Smith RP, Swaisland AJ, Ochs JS, Lyons P, Tourt-Uhlig S, Bigner DD, Friedman HS & Rich JN (2006) Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* **12**, 860-868.
- Reiter AK, Anthony TG, Anthony JC, Jefferson LS & Kimball SR (2004) The mTOR signaling pathway mediates control of ribosomal protein mRNA translation in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2169-2179.
- Robles SJ & Adami GR (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**, 1113-1123.
- Rodier F & Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**, 547-556.
- Rosner M, Fuchs C, Siegel N, Valli A & Hengstschlager M (2009) Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle. *Hum Mol Genet* **18**, 3298-3310.
- Russell RC, Yuan HX & Guan KL (2014) Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res* **24**, 42-57.
- Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, Kirisako H, Ishii J, Noda NN, Inagaki F, Nakatogawa H & Ohsumi Y (2013) Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 433-439.
- Salmena L, Carracedo A & Pandolfi PP (2008) Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**, 403-414.
- Sasaki M, Kumazaki T, Takano H, Nishiyama M & Mitsui Y (2001) Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mech Ageing Dev* **122**, 1695-1706.
- Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y & Nakanuma Y (2010) Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest* **90**, 835-843.
- Sato M & Sato K (2011) Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* **334**, 1141-1144.
- Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P & Ghidoni R (2008) Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* **15**, 1318-1329.
- Scherz-Shouval R & Elazar Z (2009) Monitoring starvation-induced reactive oxygen species formation. *Methods Enzymol* **452**, 119-130.
- Scherz-Shouval R & Elazar Z (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* **36**, 30-38.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L & Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo J* **26**, 1749-1760.
- Sen N, Satija YK & Das S (2011) PGC-1alpha, a key modulator of p53, promotes cell survival upon metabolic stress. *Mol Cell* **44**, 621-634.
- Serrano M (2011) Cancer: final act of senescence. *Nature* **479**, 481-482.

- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D & Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602.
- Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L & Wang X (2011) Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4788-4793.
- Shang L & Wang X (2011) AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy* **7**, 924-926.
- Sharpless NE (2005) INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res* **576**, 22-38.
- Shay JW & Wright WE (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 72-76.
- Shay JW & Wright WE (2007) Hallmarks of telomeres in ageing research. *J Pathol* **211**, 114-123.
- Shi M, Zhang T, Sun L, Luo Y, Liu DH, Xie ST, Song XY, Wang GF, Chen XL, Zhou BC & Zhang YZ (2013) Calpain, Atg5 and Bak play important roles in the crosstalk between apoptosis and autophagy induced by influx of extracellular calcium. *Apoptosis* **18**, 435-451.
- Shin S, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J & Yoon SO (2011) Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E1204-1213.
- Shintani T & Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**, 990-995.
- Singh K, Matsuyama S, Drazba JA & Almasan A (2012) Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. *Autophagy* **8**, 236-251.
- Singh SK, Clarke ID, Hide T & Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* **23**, 7267-7273.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J & Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-5828.
- Skildum A, Dornfeld K & Wallace K (2011) Mitochondrial amplification selectively increases doxorubicin sensitivity in breast cancer cells with acquired antiestrogen resistance. *Breast Cancer Res Treat* **129**, 785-797.
- Song YJ, Zhang SS, Guo XL, Sun K, Han ZP, Li R, Zhao QD, Deng WJ, Xie XQ, Zhang JW, Wu MC & Wei LX (2013) Autophagy contributes to the survival of CD133+ liver cancer stem cells in the hypoxic and nutrient-deprived tumor microenvironment. *Cancer Lett* **339**, 70-81.
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R & Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* **127**, 397-408.
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nurnberg B & et al. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**, 690-693.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E & Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996.
- Subramani S & Malhotra V (2013) Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep* **14**, 143-151.
- Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C & Pan H (2013) Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* **4**, e838.



- Sun LL, Sun LR & Wang GY (2007) [Mitochondrial membrane potential at HL-60 cell apoptosis induced by cytarabine]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **15**, 1196-1199.
- Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S & Zhong Q (2008) Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19211-19216.
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K & Mizushima N (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* **25**, 795-800.
- Talluri S, Isaac CE, Ahmad M, Henley SA, Francis SM, Martens AL, Bremner R & Dick FA (2010) A G1 checkpoint mediated by the retinoblastoma protein that is dispensable in terminal differentiation but essential for senescence. *Mol Cell Biol* **30**, 948-960.
- Tang JY, Fang YY, Hsi E, Huang YC, Hsu NC, Yang WC, Chang HW, Chai CY & Chu PY (2013) Immunopositivity of Beclin-1 and ATG5 as indicators of survival and disease recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* **33**, 5611-5616.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T & Kominami E (2002) 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* **277**, 13739-13744.
- Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F & Kroemer G (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**, 676-687.
- Tian S, Lin J, Jun Zhou J, Wang X, Li Y, Ren X, Yu W, Zhong W, Xiao J, Sheng F, Chen Y, Jin C, Li S, Zheng Z & Xia B (2010) Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. *Autophagy* **6**, 1032-1041.
- Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP & Stassi G (2007) Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* **1**, 389-402.
- Tooze SA & Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**, 831-835.
- Toussaint O, Medrano EE & von Zglinicki T (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* **35**, 927-945.
- Tsukamoto S, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A & Mizushima N (2008) Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science* **321**, 117-120.
- Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM & Wahl GM (2002) c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* **9**, 1031-1044.
- Vakifahmetoglu H, Olsson M & Zhivotovsky B (2008) Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15**, 1153-1162.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S & Monsalve M (2005) PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **66**, 562-573.
- van der Vaart A & Reggiori F (2010) The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes. *Autophagy* **6**, 800-801.
- Vargas J, Feltes BC, Poloni Jde F, Lenz G & Bonatto D (2012) Senescence; an endogenous anticancer mechanism. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 2616-2643.
- Velikkakath AK, Nishimura T, Oita E, Ishihara N & Mizushima N (2012) Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell* **23**, 896-909.

- Vescovi AL, Galli R & Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**, 425-436.
- Vessoni AT, Muotri AR & Okamoto OK (2012) Autophagy in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells Dev* **21**, 513-520.
- Volinia S, Dhand R, Vanhaesebroeck B, MacDougall LK, Stein R, Zvelebil MJ, Domin J, Panaretou C & Waterfield MD (1995) A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *Embo J* **14**, 3339-3348.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F & Jackson SP (2005) Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* **126**, 111-117.
- Wang WS, Tzeng CH, Chiou TJ, Liu JH, Hsieh RK, Yen CC & Chen PM (1997) High-dose cytarabine and mitoxantrone as salvage therapy for refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Jpn J Clin Oncol* **27**, 154-157.
- Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY & Pang CY (2001) Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci* **928**, 97-112.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weiner LM & Lotze MT (2012) Tumor-cell death, autophagy, and immunity. *N Engl J Med* **366**, 1156-1158.
- Weintraub SJ, Chow KN, Luo RX, Zhang SH, He S & Dean DC (1995) Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**, 812-815.
- Wilkinson ST, Tome ME & Briehl MM (2012) Mitochondrial adaptations to oxidative stress confer resistance to apoptosis in lymphoma cells. *Int J Mol Sci* **13**, 10212-10228.
- Wirawan EVW, L.; Kersse, K; Cornelis, S.; Claerhout, S.; Vanoverberghe, I.; Roelandt, R.; De Rycke, R.; Verspurten, J.; Declercq, W.; Agostinis, P.; Vanden-Berghe, T.; Lippens, S.; Vandenabeele, P. (2010) Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death and Disease* **1**.
- Wu SY, Lan SH, Cheng DE, Chen WK, Shen CH, Lee YR, Zuchini R & Liu HS (2011) Ras-related tumorigenesis is suppressed by BNIP3-mediated autophagy through inhibition of cell proliferation. *Neoplasia* **13**, 1171-1182.
- Wu WK, Coffelt SB, Cho CH, Wang XJ, Lee CW, Chan FK, Yu J & Sung JJ (2012) The autophagic paradox in cancer therapy. *Oncogene* **31**, 939-953.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC & Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115-124.
- Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D & Yuan J (2010) Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5. *Autophagy* **6**, 61-66.
- Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernandez E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C & Lowe SW (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656-660.
- Yang G, Rosen DG, Zhang Z, Bast RC, Jr., Mills GB, Colacino JA, Mercado-Urbe I & Liu J (2006) The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16472-16477.
- Yang Z & Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 124-131.
- Yao J, Bi HE, Sheng Y, Cheng LB, Wendu RL, Wang CH, Cao GF & Jiang Q (2013) Ultraviolet (UV) and Hydrogen Peroxide Activate Ceramide-ER Stress-AMPK Signaling Axis to Promote Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cell Apoptosis. *Int J Mol Sci* **14**, 10355-10368.

- Yoo BH, Wu X, Li Y, Haniff M, Sasazuki T, Shirasawa S, Eskelinen EL & Rosen KV (2006) Oncogenic ras-induced down-regulation of autophagy mediator Beclin-1 is required for malignant transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **285**, 5438-5449.
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Kochl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J & Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **119**, 3888-3900.
- Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S & Watt FM (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798-803.
- Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T & Simon HU (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1124-1132.
- Yu Y, Yang L, Zhao M, Zhu S, Kang R, Vernon P, Tang D & Cao L (2012) Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **26**, 1752-1760.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ & Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15077-15082.
- Zeng X & Kinsella TJ (2010) BNIP3 is essential for mediating 6-thioguanine- and 5-fluorouracil-induced autophagy following DNA mismatch repair processing. *Cell Res* **20**, 665-675.
- Zeng X, Yan T, Schupp JE, Seo Y & Kinsella TJ (2007) DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine--induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin Cancer Res* **13**, 1315-1321.
- Zhang J (2013) Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol* **1**, 19-23.
- Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD & Adams PD (2005) Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* **8**, 19-30.
- Zhang YB, Zhao W & Zeng RX (2013) Autophagic degradation of caspase-8 protects U87MG cells against H2O2-induced oxidative stress. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**, 4095-4099.
- Zhou S, Zhao L, Kuang M, Zhang B, Liang Z, Yi T, Wei Y & Zhao X (2012) Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett* **323**, 115-127.
- Zhou W, Yue C, Deng J, Hu R, Xu J, Feng L, Lan Q, Zhang W, Ji D, Wu J, Liu Q & Liu A (2013) Autophagic protein Beclin 1 serves as an independent positive prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *PLoS One* **8**, e80338.
- Zhu C, Johansson M & Karlsson A (2000) Incorporation of nucleoside analogs into nuclear or mitochondrial DNA is determined by the intracellular phosphorylation site. *J Biol Chem* **275**, 26727-26731.
- Zhuang W, Li B, Long L, Chen L, Huang Q & Liang Z (2011) Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int J Cancer* **129**, 2720-2731.
- Zoncu R, Efeyan A & Sabatini DM (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 21-35.

## ANEXO I

### Supporting Methods from Nuclear Morphometric Analysis (Capítulo I)

## Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of apoptosis, mitosis, senescence and mitotic catastrophe

Eduardo C. Filippi-Chiela<sup>1</sup>, Manuel M. Oliveira<sup>3</sup>, Bruno Jurkovski<sup>3</sup>, Sidia Maria Callegari-Jacques<sup>4</sup>, Vinicius Duval da Silva<sup>5</sup>; Guido Lenz<sup>1,2,\*</sup>

### Supporting Methods

---

This supporting file describes the instructions of using Image J, IPP and Spreadsheets to perform the NMA analysis.

- A. Image J Plugin Manual
- B. Image Pro-Plus Manual
- C. Spreadsheet manual

#### **A. Image J Plugin Manual**

##### **1 Introduction**

The NII Plugin of the Image J Software was developed to extract the morphometric information about nuclei to be used in the NMA tool. The analysis uses measures of nuclear area and of four parameters of irregularity, named Aspect, Area/Box, Radius Ratio and Roundness. These four parameters are used to generate a Nuclear Irregularity Index (NII) which, added to area measurement, classify the nuclei in normal (N), irregular (I), small and regular (SR), small (S), small and irregular (SI), large and regular) or large and irregular (LR)

Images of nuclei stained with DAPI (with more than 300 dpi; preferentially in .tiff uncompressed format) are necessary to guarantee the quality of the nuclear analysis. This manual describes the steps for using the NII Plugin in the NMA.

## 2 First Steps

### 2.1 Getting Image J

Install ImageJ (version 1.4.4), (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) and NII plugin ([www.ufrgs.br/labsinal/NMA](http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA)).

### 2.2 Installing NII Plugin

After installing ImageJ, create a new folder named NII, into ImageJ's plugin folder, and simple paste the NII\_Plugin to this folder. The next time ImageJ is opened, the plugin will appear in its plugin list (**Figure 1**).

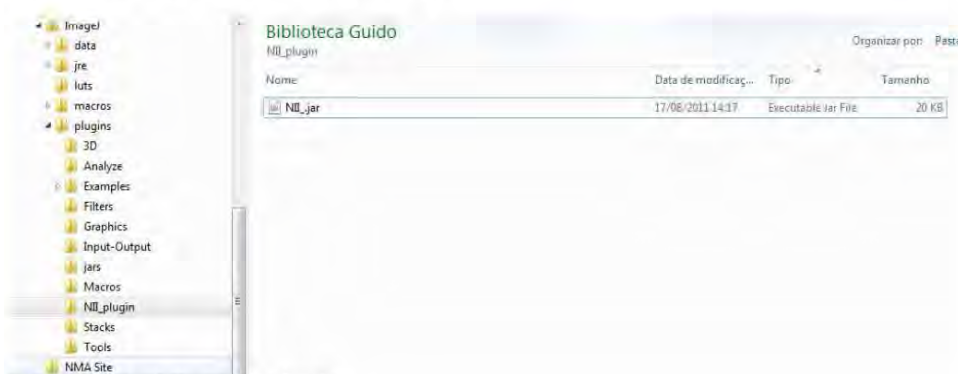


Figure 1. Instalng NII\_plugin

### 2.3 Running the plugin

Open a TIFF image by choosing Open in the File menu (or pressing *Ctrl+O*) in ImageJ. Then just choose NII\_Plugin in the Plugins menu opens a setting part on the right of the figure (**Figure 2**) and automatically outlines the nuclei.

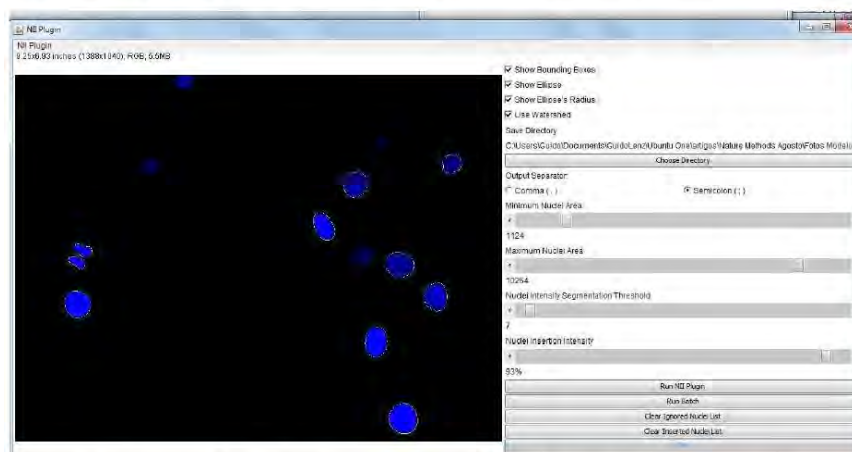


Figure 2. Opening NII\_plugin with the options for the image analysis.

### 3 The Plugin

This section presents the characteristics of the plugin specifically designed to NMA using ImageJ. Next section (*section 4 – “Analyzing”*) describes the steps to execute NMA using the plugin.

#### 3.1 Running Parameters

- **Choose Directory** in which the outputs will be saved.
- **Use Watershed:** if this option is checked, the plugin will try to separate some of the nuclei that are touching each other. It may, however, improperly separate a very irregular nucleus, so the user has to take care when using this option (mainly for batch processing).
- **Minimum Nuclei Area:** the minimum area (in pixels) of a nucleus to be considered by the program.
- **Maximum Nuclei Area:** the maximum area (in pixels) of a nucleus in order to be considered.
- **Nuclei Intensity Segmentation Threshold:** this is the first option that is altered to modulate the sensitivity of marking and to adjust the nuclear surrounding line in the correct limit (*i.e.* the threshold used to discretize the grayscale image to a binary one). The smaller the threshold, less intense nucleus will be considered in the analysis (and the greater will be its area).
- **Nuclei Insertion Intensity:** this is the percentage of the Segmentation Threshold used when inserting a blob manually.

#### 3.2 Adding and Removing a Single Nuclei Manually

General marking of nuclei is obtained by using the ‘Nuclei Intensity Segmentation Threshold’, as described above. To add a nucleus that wasn’t detected by the program, just click inside its area with the Left Button of the mouse while pressing the **Shift key** and for removing a selected nuclei, hold the **Ctrl key** (for Mac users, use the 64 bits image J and the control key to remove and shift key to include nuclei). If necessary, it’s possible to remove all inserted nuclei or re-insert all removed nuclei just clicking the Clear Inserted Nuclei List or Clear Ignored Nuclei List buttons.

#### 3.3 The Output

After running the plugin for an image, three files will be generated: 1. copy of the original image with the ID of the considered blobs and the additional information selected by the user in the interface (*section 3.4, below*); 2. a binary image containing only the blobs that were processed by the plugin. Both will be saved as a .png file which will be suffixed with `_NII` and `_NII_Binary`; 3. a Comma Separated Values (.csv) file that can be opened with any program that manipulates spreadsheets, such as Microsoft Office Excel or OpenOffice Calc. The user can choose between a comma (,) or a semicolon (;) separator in the interface depending on the settings of the computer. The values stored for each nucleus in the table are the components of the Nuclear Irregularity Index (NII), as follows:

- **Area:** area of each nucleus.
- **Aspect:** ratio between the nucleus' major and minor radius.
- **Area/Box:** ratio between the area of the nucleus and the area of its bounding box.
- **Radius Ratio:** ratio between the maximum and the minimum radius of the object.
- **Roundness (Border):** roundness computed using the Border Perimeter<sup>1</sup>. It is determined by the formula:  $\text{perimeter}^2 / (4 * \pi * \text{area})$ ,  $\pi$  being the mathematical constant.

These variables are used to yield the NII, and are the fundamental measurements of NMA. They are based on the following information, obtained for each nuclei after running the NMA plugin:

- **Roundness (Ellipse):** roundness computed using the Ellipse Perimeter, with the same formula of the variable named *roundness (border)*, cited above.
- **Bounding Box Area:** area of the smallest box that can wrap the nucleus.
- **Centroid Coordinates:** (x,y) coordinates of the nucleus center of mass.
- **Minimum Radius:** minimum distance from the centroid to a border of the nucleus.
- **Maximum Radius:** maximum distance from the centroid to a border of the nucleus.
- **Perimeter (Border):** perimeter measure computed using the nucleus border.
- **Perimeter (Ellipse):** perimeter measure computed using the ellipse's perimeter formula.
- **Aspect Equivalent Ellipse:** similar to Aspect but uses the radius of an ellipse with the same area as the nucleus.
- **The parameters used in the computation of data:** minimum nuclei area, maximum nuclei area, nuclei intensity segmentation threshold (described in 3.1).

### 3.4 Output Options (exemplified in section 4)

- **Show Bounding Boxes:** shows the bounding boxes of each nucleus in the output images.
- **Show Ellipse:** shows the ellipses that circulate each nucleus in the output images.
- **Show Ellipse's Radius:** shows the ellipse's radius of each nucleus in the output images.
- **Save Directory:** the directory in which the output files will be created.
- **Output Separator:** the character used to separate values in the generated table.

### 3.5 Configuration File

The first time the plugin is executed, it will generate a `niiConfig.txt` file in the `NII_Plugin` folder. This file contains some parameters of the plugin, and can be changed if necessary. These parameters are:

---

<sup>1</sup> We calculate two different roundness measurements, one considering the border perimeter and another considering the perimeter of the correspondent ellipse. By comparison with IPP, we concluded that border perimeter is the one used by IPP to calculate roundness.

- **minArea.maxValue**: the minimum value that the Minimum Nuclei Area scrollbar can have.
- **maxArea.maxValue**: the maximum value that the Maximum Nuclei Area scrollbar can have.
- **window.width**: the plugin window width.
- **window.height**: the plugin window height.

If for some reason the file gets corrupted or if you want to restore its default values, just remove it from the NII\_Plugin folder the next time the NII Plugin executes it will create the original file again.

### ***3.6 Batch Processing***

To run the plugin for a batch of files, the user is prompted to define in which directory the input files are. The plugin will then run, with the same characteristics, for every image contained in that directory. The valid image formats are: tif (preferable but not restrict to), jpg, jpeg, bmp, png, gif. Like the execution for a single file, the outputs will be saved in the directory specified by the Save Directory option.

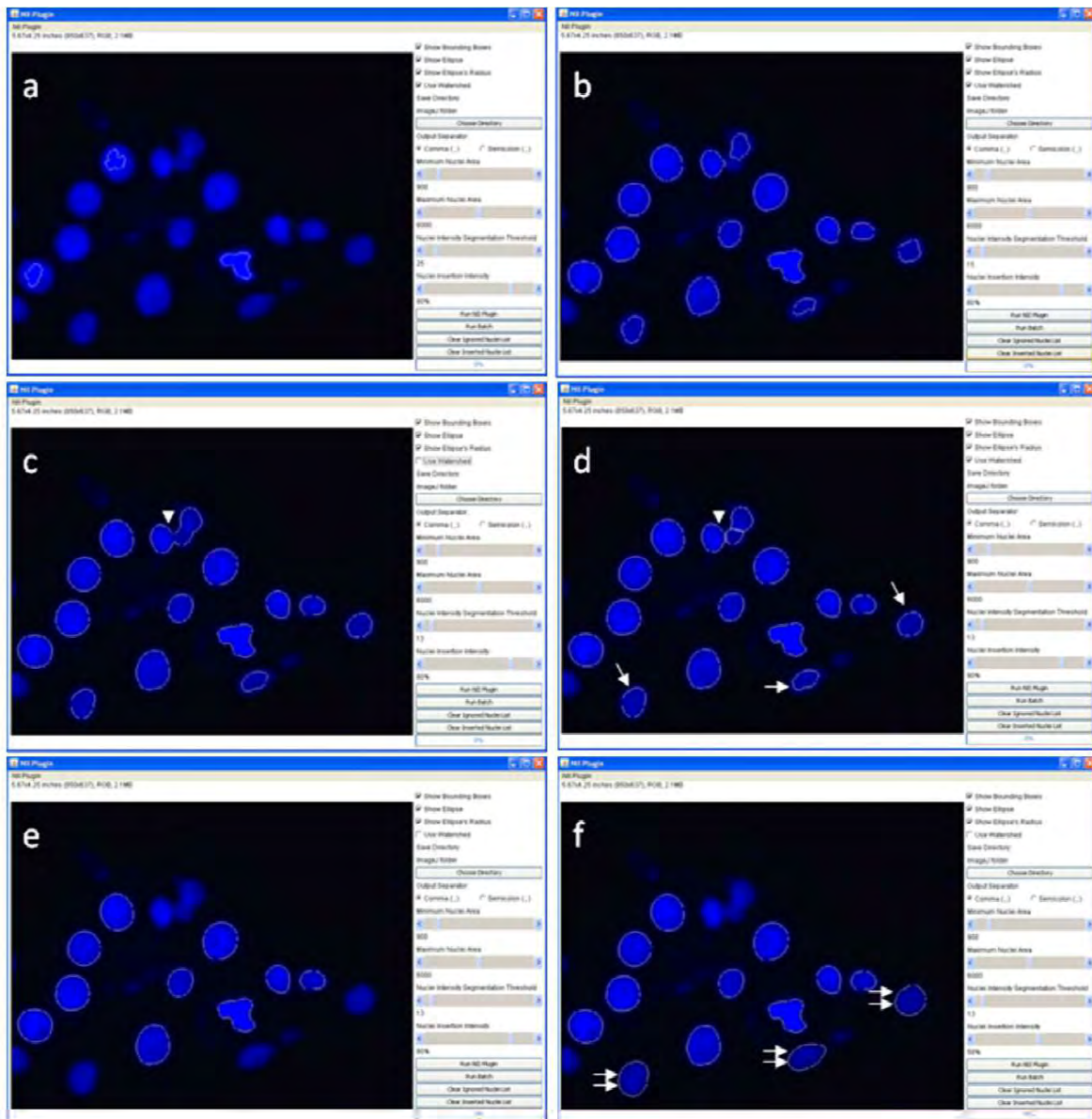
- **minArea.maxValue**: the minimum value that the Minimum Nuclei Area scrollbar can have.
- **maxArea.maxValue**: the maximum value that the Maximum Nuclei Area scrollbar can have.
- **window.width**: the plugin window width.
- **window.height**: the plugin window height.

If for some reason the file gets corrupted or if you want to restore its default values, just remove it from the NII\_Plugin folder the next time the NII Plugin executes it will create the original file again.

### ***3.6 Batch Processing***

To run the plugin for a batch of files, the user is prompted to define in which directory the input files are. The plugin will then run, with the same characteristics, for every image contained in that directory. The valid image formats are: tif (preferable but not restrict to), jpg, jpeg, bmp, png, gif. Like the execution for a single file, the outputs will be saved in the directory specified by the Save Directory option.



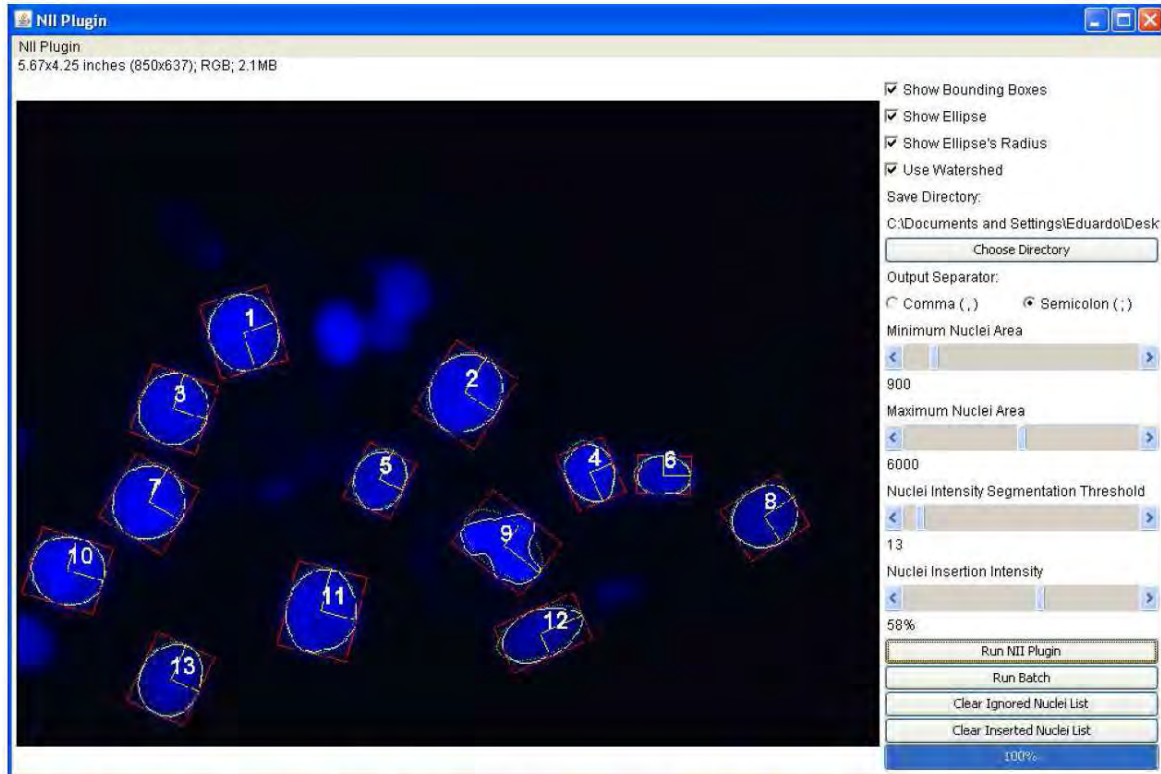


**Figure 3. Nuclear marking using NII plugin in Image J.** (a-c) Nuclei being marked gradually until the correct limit. (c-d) Watershed option (not selected in c and selected in d) helps to separate two nuclei very close, as pointed by the white arrowhead in both images. As indicated by single arrows (d), some nuclei are mismarked and must be remarked. The user can exclude these nuclei pressing *Ctrl* key and clicking on them (e), followed by re-inserting these nuclei individually, by clicking individually in each of them and adjusting the intensity of marking through the nuclei *insertion intensity* option of plugin (f – double arrows). It is important to note that some nuclei cannot be available to measuring in a given image, such as those marked with an arrowhead in letter d. To see details of the plugin window, see Figure 4.

**ii. Select the appropriate output options.**

It is important to determine the output separator, if comma or semicolon, and select the options of the output file, as described on 3.2, which will help the user to localize and evaluate data after acquisition. The user can also choose the directory where output data will be placed. All output files are generated with the name of the original image analyzed.

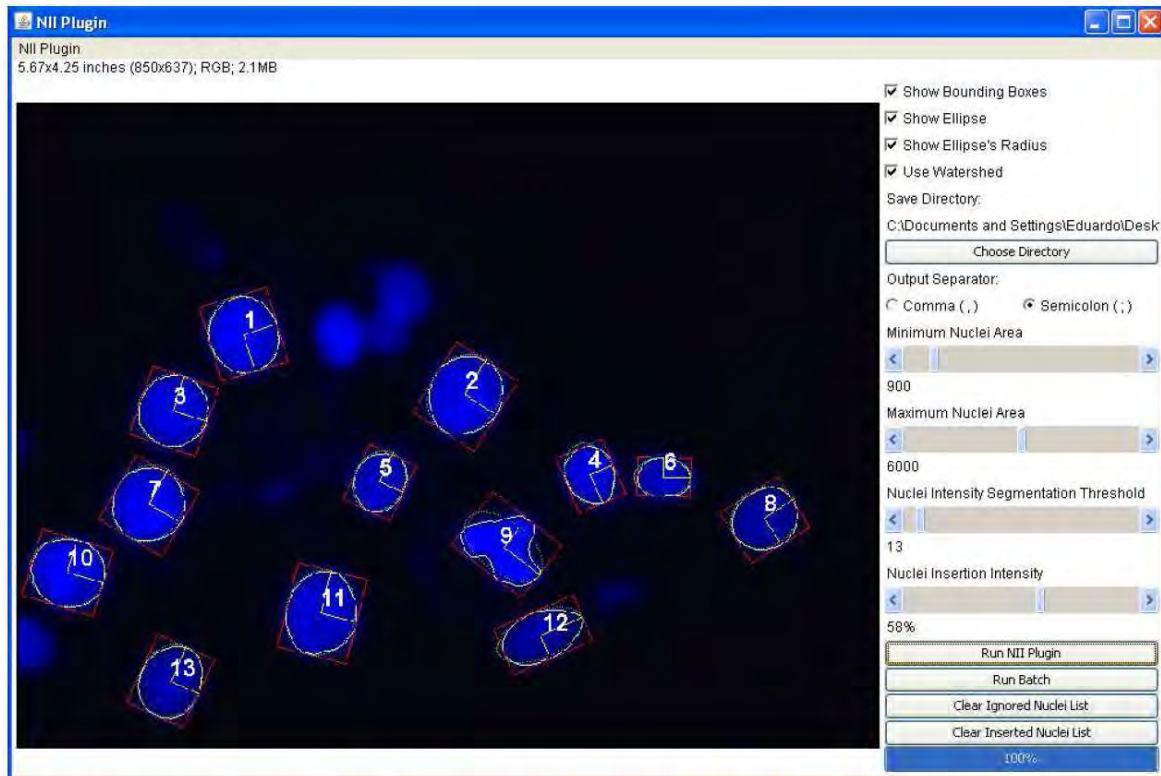
**iii. After adjusting the outline of the largest possible number of nuclei, run NII plugin and wait until the bar reaches one hundred percent (Figure 4).**



**Figure 4.** Image after running NII plugin. After marking and running the plugin, nuclei are marked with the bounding boxes (red), ellipse (green) and radio of the ellipse (white lines into nuclei), if these options had been selected by the user in the bottom right options of the plugin window.

**CAUTION!** If executing a Batch analysis, the user must check each image generated to avoid mismarks.

iv. After running NII, three files are generated to each image. Open the **Excel file (Figure 5A)** and copy data obtained to Area, Aspect, Area Box, Radius Ratio and Roundness to the Excel file, in the appropriate place. To examine individually a nuclei, open the output images (**Figure 5B, C**).



**Figure 4.** Image after running NII plugin. After marking and running the plugin, nuclei are marked with the bounding boxes (red), ellipse (green) and radio of the ellipse (white lines into nuclei), if these options had been selected by the user in the bottom right options of the plugin window.

**CAUTION!** If executing a Batch analysis, the user must check each image generated to avoid mismarks.

iv. After running NII, three files are generated to each image. Open the **Excel file (Figure 5A)** and copy data obtained to Area, Aspect, Area Box, Radius Ratio and Roundness to the Excel file, in the appropriate place. To examine individually a nuclei, open the output images (**Figure 5B, C**).





## **B. Image Pro-Plus 6.0 (IPP) Manual**

1. Open your tiff image on IPP

2. In the tab *measure* select *count/size*. Into the count/size window, select the tab *measure*, followed by *select measurements*. In the new window opened, click on the measurements Area, Area/Box, Aspect, Radius Ratio and Roundness, and click *ok*.

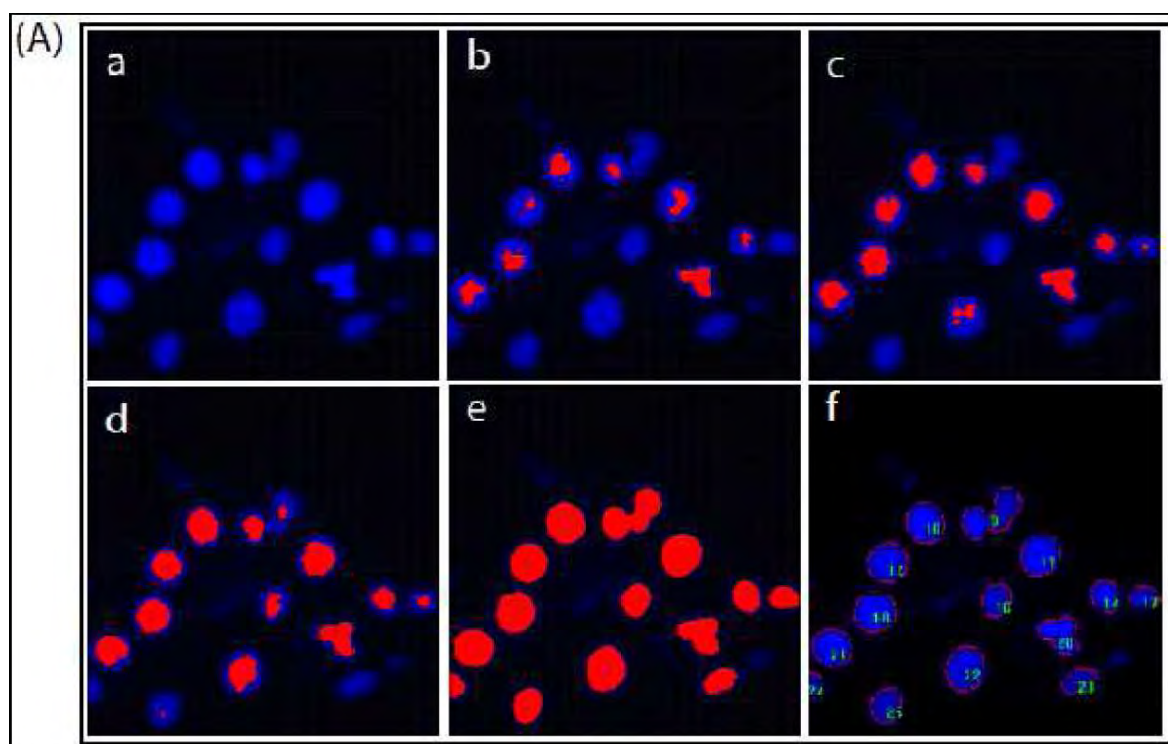
The selection of nuclei can be done individually or for all nuclei together. The next sections present both options.

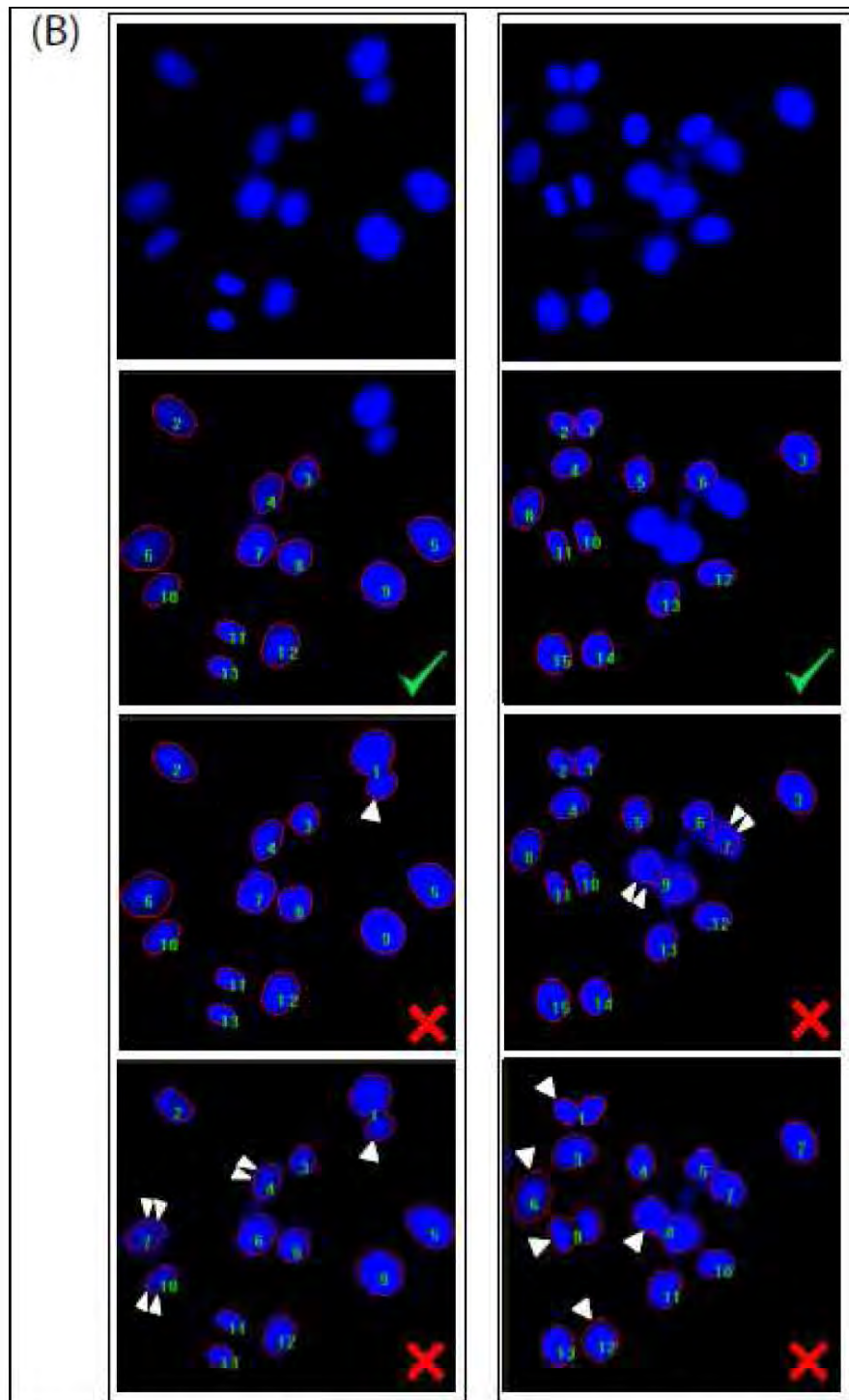
### **A. GROUP SELECTION OF NUCLEI**

1. To select nuclei, in the *count/size* window select the option *select colors*. Into the new opened window (named *segmentation*), select the option 1x1 in the scale field (). After that, select the icon  and click continuously onto a nucleus of the photo with the left mouse button until the marking reaches the correct limit of nuclei (**Figure 6Aa-e**). Use the icons ,  and , respectively, to go back a click, to reduce the marking gradually or to undo the whole marking and start again.

2. After getting a correct nuclear marking, *close* the *segmentation* window. At this moment, nuclear marking will disappear (don't worry!). Click on *count* and nuclei become marked as defined (**Figure 4Af**). Mismarked nuclei can be eliminated by clicking on *view* tab and, after, *object window*. In the *object attributes* window, select to *hide* those mismarked nuclei.

**CAUTION!** Take care that you do not overmark or mismark nuclei, which may generate unreal data, as exemplified on **Figure 6B**.






**Figure 5. Examples of group nuclear selection in IPP.** (A) Gradual nuclei marking using IPP through the *Group Selection* method described on the text. (a-e) show the gradual marking of nuclei, while (f) shows the limit of each object marked after running the analysis. Nuclei grouped in object 9 are mismarked (see a), and must be eliminated from the analysis. (B) shows two examples of correct (green correct sign) and incorrect (red 'x' sign) nuclei marking. Single arrowheads illustrate nuclei that are overmarked, while double arrowheads show insufficient marked nuclei. All these cases must be eliminated from the analysis.

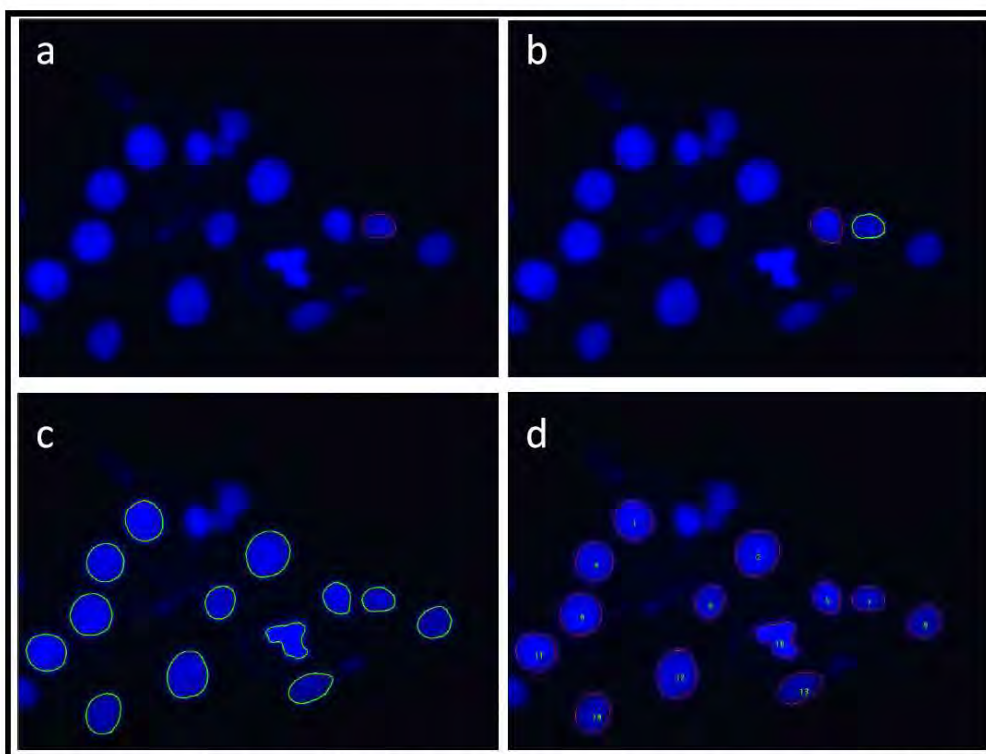
3. To get the output data, go to *file* tab and select *data to clipboard*. Open an Excel file and paste your raw data, followed by copy and paste measurement data to **NII Excel file**.

## B. INDIVIDUAL SELECTION OF NUCLEI

1. After opening the image and selecting the measurements, select this icon  in the toolbar and the option *wand* of the new opened box. Click in a single nucleus with the left mouse button until the correct marking (**Figure 7a-b**). When the nucleus is correctly marked, click on another nuclei while pressing the *Ctrl* key. The marked nucleus becomes green and the new nucleus to be marked appears in red (**Figure 7b**). Proceed as done for the first nuclei and follow these steps until all nuclei are green marked (**Figure 7c**).

2. After marking as many nuclei as possible, select the tab *measure*, in the count/size window, followed by *select measurements*; in the new window opened, click on the measurements Area, Area/Box, Aspect, Radius Ratio and Roundness to select them, and click *ok*.

3. In the *count/size* window select the option *convert AOI to object(s)*, in the *Edit* tab; nuclei will become numbered as in the last step of group analysis (**Figure 7d**).



**Figure 6. Individual marking using IPP.** After opening the image, a nucleus is marked individually (a), selected (b) and, when all nuclei are selected (c), they are converted to objects (d) and output data produced.

**CAUTION!** As in the group analysis, check that you do not overmark or mismark nuclei, which may generate unreal data.

4. To extract output data, go to *file* tab and select *data to clipboard*. Then open an Excel file and paste your raw data, followed by copy and paste measurement data to **NII Excel file**.

### C. Spreadsheet Manual

1. Use different files for different cell type of your test, since different cells have different nuclear features and the data from the “Normal Nuclei and Settings” will apply for the whole file

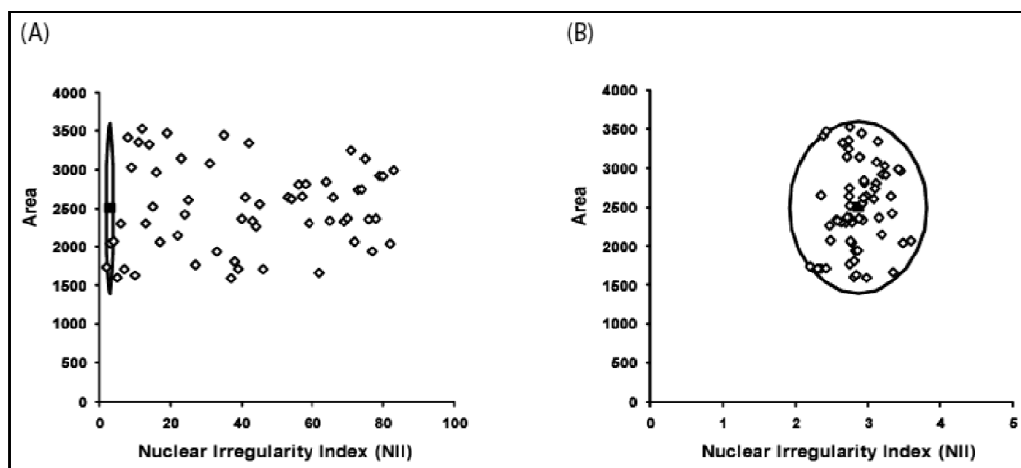
2. Create one spreadsheet for each condition of your test (treatments, time of analysis, etc). To do this, select the spreadsheet named “**Condition1**”, press *Ctrl* and slither the spreadsheet aside. Rename the new spreadsheets formed according to the treatment. Data from control must be allocated in the spreadsheet named “**Control**”.

2. Paste your data from normal nuclei, obtained in IPP6 or ImageJ Plugin, to the related columns of “NORMAL NUCLEI” area (C11-G11) in the spreadsheet named “**Normal Nuclei and Settings**”.

**CAUTION!** Have in mind that “normal nuclei” do not refer to nuclei with a round shape. Many cell types present, even when healthy, a high variety of nuclei shapes. The user needs to choose a group of nuclei that represent this variability of basal cell culture condition. However, nuclei from mitotic cells and nuclei with clear abnormalities should be eliminated from this section.

3. Afterwards, if using Excel, exclude the formula of NII (orange column – column H) of those lines without data.

**CAUTION!** Forgetting the formula in lines without raw data (as X will appear) hampers not only the formation of the ‘normal ellipse’ (Figure 8), but also the analysis of the experimental data (Figure 8). Do not forget to delete it! In OpenOffice it is unnecessary.



**Figure 7. Results of ‘normal ellipse’ determination.** (A) Wrong distribution and ‘normal ellipse’ formation when the formula of NII is maintained in the lines where there is no raw data (as X will appear); (B) Correct ‘normal ellipse’ formation after deletion of NII formula from those lines without data to calculate NII.

4. Observe the distribution of nuclei in the graph. The distribution must be homogeneous and uniform. If a nucleus is located far outside the ellipse, delete it, since probably it is not a normal nucleus. The user can modify the number of standard deviations (SD) of Area and NII (in the option “How many SD is N” of the box “SETTING THE NORMAL

### C. Spreadsheet Manual

1. Use different files for different cell type of your test, since different cells have different nuclear features and the data from the “Normal Nuclei and Settings” will apply for the whole file

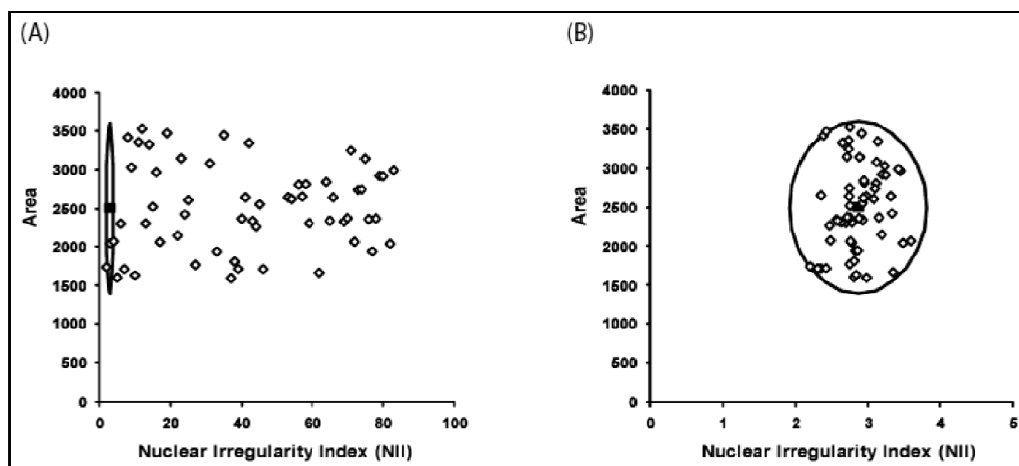
2. Create one spreadsheet for each condition of your test (treatments, time of analysis, etc). To do this, select the spreadsheet named “**Condition1**”, press *Ctrl* and slither the spreadsheet aside. Rename the new spreadsheets formed according to the treatment. Data from control must be allocated in the spreadsheet named “**Control**”.

2. Paste your data from normal nuclei, obtained in IPP6 or ImageJ Plugin, to the related columns of “NORMAL NUCLEI” area (C11-G11) in the spreadsheet named “**Normal Nuclei and Settings**”.

**CAUTION!** Have in mind that “normal nuclei” do not refer to nuclei with a round shape. Many cell types present, even when healthy, a high variety of nuclei shapes. The user needs to choose a group of nuclei that represent this variability of basal cell culture condition. However, nuclei from mitotic cells and nuclei with clear abnormalities should be eliminated from this section.

3. Afterwards, if using Excel, exclude the formula of NII (orange column – column H) of those lines without data.

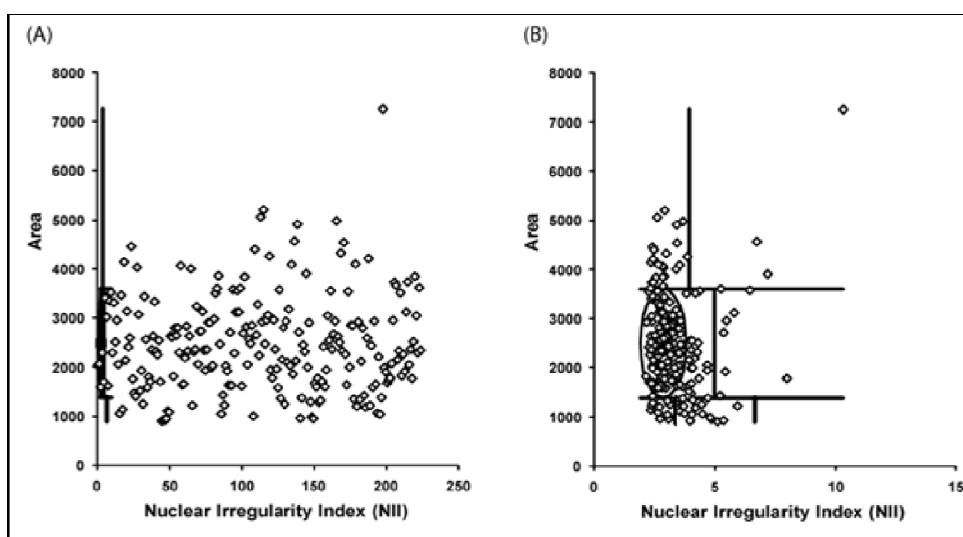
**CAUTION!** Forgetting the formula in lines without raw data (as X will appear) hampers not only the formation of the ‘normal ellipse’ (Figure 8), but also the analysis of the experimental data (Figure 8). Do not forget to delete it! In OpenOffice it is unnecessary.



**Figure 7. Results of ‘normal ellipse’ determination.** (A) Wrong distribution and ‘normal ellipse’ formation when the formula of NII is maintained in the lines where there is no raw data (as X will appear); (B) Correct ‘normal ellipse’ formation after deletion of NII formula from those lines without data to calculate NII.

4. Observe the distribution of nuclei in the graph. The distribution must be homogeneous and uniform. If a nucleus is located far outside the ellipse, delete it, since probably it is not a normal nucleus. The user can modify the number of standard deviations (SD) of Area and NII (in the option “How many SD is N” of the box “SETTING THE NORMAL

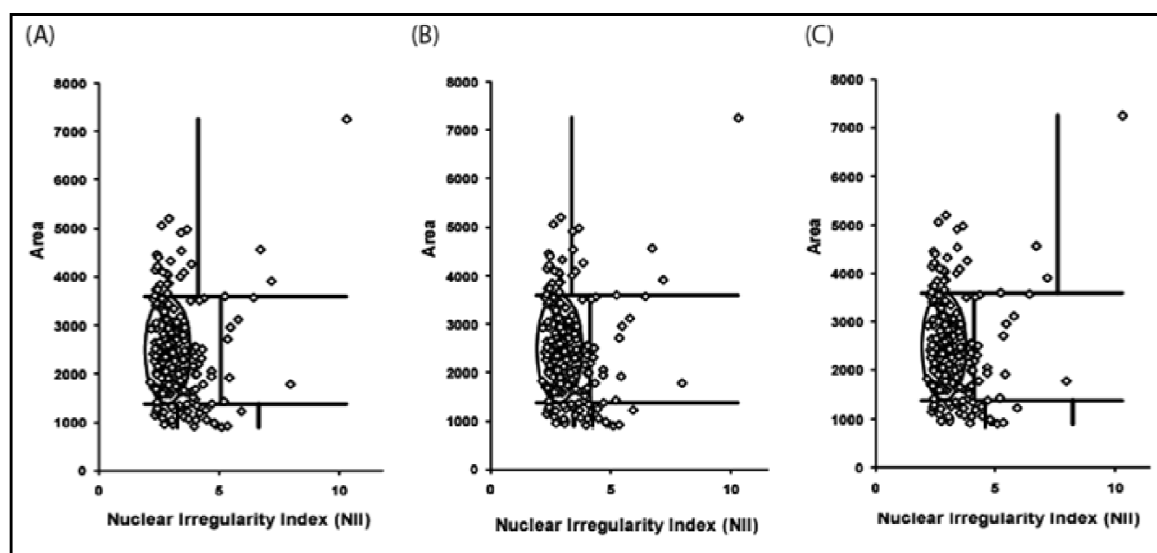




**Figure 9. Results of separation of nuclei to determine the appropriated settings to the analysis.** (A) Wrong distribution when the formula of NII is maintained in the lines where there is no raw data; (B) Correct separation of populations after deletion of NII formula from those lines without data to calculate NII.

6. Adjust the number of SD that divides populations of nuclei in the options “How many SD is LI, SI and I” of the box “SETTING OF ALL OTHER POPULATIONS” – green cells. Take care to have a representative number of nuclei in each population and the correct separation of them.

**CAUTION!** This step is fundamental in the NMA. Use as much nuclei you have, from all your treatments, so that you can define the best thresholds for the different populations. As exemplified in **Figure 9**, a wrong setting will divide the populations of nuclei nonspecifically, and the analysis will be incorrect.



**Figure 10. Determination of the settings to separate the populations of nuclei.** (A) Correct setting to separate the populations of N, I, LR, LI, SR, S and SI; (B) Settings to separate LR of LI, N of I, and S of SI are too low; (C) Setting to separate LR of LI, SR of S and S of SI are too high.

6. Paste the data obtained for nuclei of cells exposed to the different conditions in the related spreadsheet.

**CAUTION!** Each experiment must be pasted in the appropriate location. The plugin provides boxes for a total of ten experiments, with a place for 500 nuclei for each condition (Experiment 1 from line 13 to 512, Experiment 2 from line 513 to line 1012 and so forth).

**CAUTION!** Forgetting the formula of NII in lines without raw data hampers the analysis of the experimental data (Figure 8). Do not forget to delete the Xs when using Excel!


7. Evaluation of data is performed through a broad **statistical analysis** (columns R-AH). This analysis shows the number and percentage of nuclei in each group for each experiment (columns R-Z, lines 1-33), as well as for all experiments combined (columns AB-AF, lines 1-13). The averages of area and NII for nuclei in every category of each experiment are also presented (columns Q-AF, lines 37-52). These averages are shown in the graph as closed squares.

**CAUTION!** Don't change any formula or value on columns starting at AL.

## ANEXO II

**Patente de registro - Método de Análise e Mensuração Morfométrica Nuclear e Uso do  
Método de Análise e Mensuração Morfométrica Nuclear**

Texto referente à Patente Registrada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial - número de registro: BR1020120152886), depositada em 21.06.2012.

< Uso exclusivo do INPI >	
Espaço reservado ao protocolo	Espaço para etiqueta

**DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
 1.2 Qualificação: INST. PÚBLICA DE ENSINO SUP  
 1.3 CNPJ/CPF: 92969856000198  
 1.4 Endereço Completo: AV. PAULO GAMA, 110 - CENTRO, PORTO ALEGRE - RS, Brasil  
 1.5 CEP: 90040-060                      1.6 Telefone: 51 3308 3800                      1.7 Fax: 51 3308 4237  
 1.8 E-mail: sedetec@ufrgs.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:**     Invenção                       Modelo de Utilidade                       Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Patente de Invenção

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido N°                      Data de Depósito:

- 5. Prioridade:**                       interna                       unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: GUIDO LENZ  
 6.2 Qualificação: Professor                      6.3 CPF: 846.041.319-53  
 6.4 Endereço completo: Rua Jaraguá, 574, Apto. 501 - Bela Vista, Porto Alegre - RS, Br  
 6.5 CEP: 90450-140                      6.6 Telefone:                      6.7 Fax:  
 6.8 E-Mail: lenz@ufrgs.br

continua em folha anexa

**Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

**MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR**

**5 Campo da Invenção**

A presente invenção descreve método de análise e mensuração morfolométrica, além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica. A presente invenção pertence à área da farmacologia e medicina.

**Antecedentes da Invenção**

As células eucariotas são as células que possuem núcleo definido pela presença de um envoltório nuclear protetor, onde núcleo celular significa uma organela celular delimitada por um envoltório e que armazena o material genético celular. Esse núcleo, quando normal, é esférico, não apresentando nenhuma protuberância ou irregularidade de outra natureza.

A mitose representa processo pelo qual as células eucarióticas dividem seus cromossomos entre duas células filhas; para tal, a célula passa por 4 fases principais, nas quais o núcleo se torna condensado e os cromossomos se arranjam de diferentes maneiras até a fase de segregação para formação de dois novos núcleos idênticos. A apoptose, ou morte celular programada tipo I, consiste na condensação celular seguida da condensação nuclear, fragmentação nuclear e, finalmente, fragmentação celular (no chamado blebbing da membrana). Este é um processo induzido pela maioria das abordagens quimioterápicas anticâncer clássicas, sendo avaliado por técnicas que mensuram a ativação de proteínas envolvidas no processo apoptótico ou alterações na membrana celular. Porém, não há relatos de metodologias de avaliação morfolométrica nuclear para avaliação de apoptose em populações celulares.

A catástrofe mitótica é um evento celular que ocorre em células com defeitos na maquinaria de mitose (genéticos ou induzidos por fármacos) ou que apresentam dano no DNA e são forçadas a seguir no ciclo celular por alterações na sinalização do ponto de checagem ao final da fase G2 do ciclo celular (chamado de ponto de checagem de dano ao DNA). Dessa forma, durante a mitose, a deficiência de um dos componentes envolvidos no processo ou o conflito entre a presença de dano no DNA e a sinalização defeituosa do ponto de checagem de G2 leva à mitose defeituosa, chamada de catástrofe mitótica (CM). Este evento normalmente ocorre como precedente à morte da célula, apesar de alguns poucos estudos mostrarem que poderia favorecer a sobrevivência celular em aneuploidia.

Após sofrerem uma mitose catastrófica, os núcleos celulares apresentam alta heterogeneidade, invariavelmente irregulares e, quase que invariavelmente, aumentados em tamanho. Esta irregularidade pode se manifestar como a fragmentação nuclear, presença de micronúcleos, projeções ou protrusões nucleares, arranjos cromossômicos aberrantes, entre outras formas.

A senescência celular é um processo de parada permanente no ciclo celular, induzida por replicações excessivas, dano em DNA, estresse oxidativo, drogas citotóxicas/citostáticas, entre outros. Neste processo, as células permanecem metabolicamente ativas, recebendo sinalizações e, da mesma forma, liberando moléculas sinalizadoras autócrinas e parácrinas para o meio extracelular. Morfológicamente, a senescência é caracterizada pelo alargamento e achatamento celular aumento do tamanho nuclear em células em cultura celular e aumento da acidez citoplasmática. Entretanto, a única metodologia objetiva atual para determinação da senescência celular é o ensaio da atividade da enzima beta-galactosidase. A atividade desta enzima está aumentada em células senescentes, podendo ser avaliada através da produção de substrato cromogênico. Entretanto, este ensaio apresenta limitações e pode gerar resultados falso-negativos ou falso-positivos.

O núcleo de células eucarióticas contém o material genético responsável por muitas características celulares, sendo envolto por um envoltório especializado denominado envoltório nuclear, formado principalmente pela membrana nuclear além de um arcabouço protéico denominado lâmina nuclear, tanto na parte interna do núcleo quanto na parte citosólica. A organização do material genético dentro do núcleo é bastante controlada, assim como a estrutura morfológica nuclear. Dessa forma, em células saudáveis, o núcleo sofre alterações fenotípicas fisiológicas mais visíveis apenas na fase da mitose, quando ocorre a condensação do material genético e arranjo cromossomal que permite a segregação dos mesmos para os pólos celulares, seguido da divisão celular em duas células-filhas. Neste processo, os componentes estruturais do envelope celular são desfeitos para permitir as alterações morfológicas fundamentais à mitose, após a qual há novamente a formação do envoltório nuclear. Entretanto, quando a célula sofre alguma injúria ou ativação de vias de morte celular programada, podem ocorrer alterações celulares que culminam ou com a adaptação celular ao contexto inadequado ou, mais comumente, com parada no crescimento e/ou morte celular. Entre os componentes celulares que sofrem alterações nestes dois últimos eventos está o núcleo, o qual apresenta alterações fenotípicas específicas em cada evento celular. Entre os processos de inibição do crescimento e morte celular que apresentam alterações morfológicas nucleares típicas e biologicamente significativas estão a apoptose, senescência e catástrofe mitótica. Dessa forma, a análise do estado morfológico nuclear constituída do tamanho e da forma do núcleo é uma ferramenta adicional importante para determinação do comportamento celular. Atualmente a determinação da morfologia nuclear é realizada apenas qualitativamente pelo operador, através da análise de imagens e determinação relativa do número de núcleos alterados, onde a classificação como "alterado" é dada subjetivamente pelo avaliador. A análise morfométrica nuclear é a análise do tamanho e da forma do núcleo.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O artigo "*Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem*" publicado em: Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. vol.44, no.1, Rio de Janeiro. Edição de Fevereiro de 2008 descreve método de análise morfométrico compreendendo uso de software, no caso, *ImageTool* 3,0 para mensuração automática de parâmetros em curto intervalo de tempo. O intuito principal é complementar o estudo morfométrico de células corrigindo problemas associados à captura das imagens, como por exemplo, temperatura da amostra, matriz da cor, iluminação desigual, foco, fatores os quais podem dificultar uma correta análise, ou afetar diagnósticos realizados a partir destas análises. A presente invenção difere deste documento, pois descreve método para análise morfométrica de células eucarióticas compreendendo padronização de análise dos parâmetros através de fórmula matemática e separação das subpopulações celulares em grupos específicos, determinados pela análise morfométrica; além de descrever o uso do método de análise morfométrica para a determinação do desenvolvimento de mecanismos nas células, especialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica; fatos não citados ou sugeridos no referido documento.

O documento WO 2011130645 descreve método de detecção e análise das margens de um tumor, além de analisar parâmetros morfométricos nucleares para discriminar entre o tecido normal e tumoral. O referido documento descreve a realização de uma comparação entre uma zona de interesse do tecido tumoral e das zonas circundantes deste tecido por meio de análise morfométrica topológica do núcleo celular. As diferenças encontradas nestas amostras são indicativos de uma margem tumoral. Os espectros de refletância assim obtida da área de interesse são comparados com os espectros de refletância da zona circundante.

A presente invenção difere de WO 2011130645, pois descreve método para análise morfométrica de células eucarióticas compreendendo

padronização de análise dos parâmetros através de fórmula matemática e separação das sub-populações celulares em grupos específicos, determinados pela análise morfométrica; além de descrever o uso do método de análise morfométrica para a determinação do desenvolvimento de mecanismos nas células, especialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica; fatos não citados ou sugeridos no referido documento.

O documento US 2006/0050946 descreve um método automatizado de análise morfométrica de células, não dependente da análise de um operador humano. Para tal, descreve o estado fisiológico das células com base na recolha automática de dados de *software* de processamento de imagem e análise estatística destes dados, as imagens das células são analisadas por um *software* de processamento que determina os vários estados das células analisadas. Os aspectos das imagens analisadas são: número de células na imagem, a área de pixel de cada célula, perímetro de cada célula, o volume de cada célula, elipticidade de cada célula, o número de núcleos por célula, área de pixel de cada núcleo, perímetro de cada núcleo, o volume de cada núcleo, da forma de cada núcleo, a área de pixel de núcleo, o grau de coloração para o ácido nucléico em cada núcleo, o número de centrômeros por célula, a área da secção transversal média das células, morfologia, a excentricidade, o grau de coloração para uma proteína citoplasmática, grau de coloração para uma proteína nuclear e padrão de coloração. Estes aspectos são analisados para determinar em que fase do ciclo celular as células se encontram (se as células estão em divisão, morrendo, em diferenciação ou em apoptose, se a síntese de proteína ou DNA foi inibida, ou se a transcrição foi inibida).

A presente invenção difere de US 2006/0050946, pois descreve um método para análise morfométrica de células eucarióticas compreendendo padronização de análise dos parâmetros através de fórmula matemática sem utilização de *software* para tal, e após, separação das sub-populações celulares em grupos específicos, determinados pela análise morfométrica; além de descrever o uso do método de análise morfométrica para a determinação do desenvolvimento de mecanismos nas células, especialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica; fatos não citados ou sugeridos no referido documento.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

#### Sumário da Invenção

A presente invenção descreve metodologia para mensuração e análise morfométrica de células eucarióticas, além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

A presente invenção apresenta uma série de vantagens, incluindo: mensuração padronizada do tamanho e formato de núcleos; permite a análise de núcleos apoptóticos condensados. Assim, a análise é realizada previamente à soltura da célula da placa de cultura e à fragmentação celular; permite determinação do estado senescente celular, possibilita a análise de núcleos em mitose, mais especificamente núcleos condensados nas fases de metáfase, anáfase e telófase; permite determinação de evento de catástrofe mitótica.

É um objeto da presente invenção método de análise e mensuração morfométrica nuclear, compreendendo as etapas de:

- a) Obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear
- b) Cálculo de um índice de irregularidade nuclear (NII) para núcleo;
- c) Separação das populações nucleares a partir do tamanho nuclear e do NII;

Em uma realização preferencial a obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear compreende análise de imagens microscópicas.

Em uma realização preferencial a análise compreende gráfico de área *versus* NII.

Em uma realização preferencial o índice de irregularidade nuclear (NII) ser calculado pela relação:  $NII = b * B - c * C + d * D + e * E$ ; onde,

"A" é o tamanho nuclear;

"B" é o aspecto do núcleo da razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto;

"C" é a razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora inferida;

"D" é a razão entre o maior e menor raio do núcleo;

"E" é a esfericidade do núcleo segundo a relação:  $Esf = \text{perímetro} / (4 * \pi * \text{área})$ ; e onde  $b=0,90$ ,  $c=0,87$ ,  $d=0,96$ ,  $e=0,92$ .

Em uma realização preferencial os núcleos são classificados em: normais (N), núcleos grandes e regulares (GR), núcleos grandes e irregulares (GI), núcleos com tamanho normal e irregulares (I), núcleos pequenos (P), núcleos pequenos e regulares (PR) e núcleos pequenos e irregulares (PI).

É, adicionalmente, um objeto da presente invenção o uso do método para determinação de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas.

Em uma realização preferencial os ditos mecanismos de proliferação e morte celular são apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

Em uma realização preferencial ditas células eucarióticas são células submetidas a tratamentos farmacológicos ou modificações genéticas.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

25

#### Breve Descrição das Figuras

Figura 1: mostra a descrição teórica das variáveis utilizadas para cálculo do índice de regularidade nuclear (NII). No esquema, são mostradas as variáveis utilizadas para o cálculo do NII (esquerda), a definição e a representação de cada variável. Estes pesos podem ser zero ou qualquer outro valor positivo ou negativo. As variáveis são: (A) área de cada núcleo, (B) razão entre o eixo maior e o eixo menor da elipse equivalente ao núcleo, (C) razão entre o raio maior e o raio menor de cada núcleo, (D) razão entre a área de cada objeto e a área de sua caixa delimitadora inferida, (E) esfericidade de cada objeto dada pela fórmula  $(\text{perímetro}) / (4 * \pi * \text{área})$ .

Figura 2: mostra um gráfico de NII (eixo x) versus área (eixo y) e a separação das populações nucleares através da ferramenta NMA. Os limiares que definem os conjuntos de núcleos foram definidos com base na distribuição de todo o conjunto de núcleos em análise, podendo ser alterados pelo usuário da ferramenta de acordo com a população em estudo (à semelhança da metodologia de citometria de fluxo). A elipse representa o intervalo de área e NII representativo de núcleos normais (ou regulares). Cruzes representam núcleos de controle usados na determinação dos parâmetros para os núcleos normais deste tipo celular, e triângulos representam núcleos teste. Os quadrados preenchidos representam a média de área e NII de cada sub-população de núcleos. As siglas indicam o nome dado à população nuclear do respectivo quadrante, sendo: GR=grande e regular; GI=grande e irregular; N=normal; I=irregular; PR=pequeno e regular; P=pequeno; PI=pequeno e irregular.

Figura 3: mostra um modelo de gráfico obtido após uma análise NMA para análise de apoptose. Células foram tratadas com a droga Vincristina (Vinc), na concentração de 20 nM. À esquerda, são mostradas imagens dos núcleos (fluorescente – azul) e à direita são mostradas as células (visível). Os números indicam a porcentagem de núcleos em cada população nuclear. Pode-se observar um aumento de células com núcleos pequenos e regulares (PR), típicos de apoptose, e redução de núcleos pequenos (P), típicos de mitose. N = normal; I = irregular; P = pequeno; GR = grande e regular; P1-P4 = núcleos pequenos de 1 a 4.

Figura 4: mostra um modelo de gráfico obtido após uma análise NMA para análise de senescência. Células foram tratadas com uma combinação de drogas indutoras de senescência. Em volta do gráfico são mostradas células marcadas com um marcador de senescência (em azul), à esquerda ou acima

no par de fotos, e os núcleos das mesmas à direita ou abaixo de cada par (preto – núcleo - e branco). Números indicam a relação do número de células azuis pelo total de núcleos no respectivo quadrante.

Figura 5: mostra um modelo de gráfico obtido após uma análise NMA para análise de catástrofe mitótica. Em (A) é mostrada a população controle, enquanto em (B) é mostrado o gráfico de núcleos de células tratadas com um composto indutor de catástrofe mitótica. Porcentagens indicam a porcentagem de núcleos em cada população. Em volta do gráfico, são mostradas imagens dos núcleos (fluorescente – azul).

10

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

15

A metodologia consiste na análise de imagens de núcleos de células eucarióticas e classificação objetiva dos núcleos baseada no tamanho e em um índice de irregularidade nuclear. Este índice é gerado a partir de quatro variáveis de regularidade morfolométrica, selecionadas através de uma análise estatística objetiva realizada para obtenção das variáveis mínimas capazes de representar a forma do núcleo. A partir dos dados de tamanho e índice de irregularidade, é feita a separação gráfica dos núcleos em sub-populações diferentes representativas de um determinado mecanismo celular. A metodologia objeto da presente patente, além de ser pioneira no estudo morfolométrico nuclear, apresenta as vantagens da objetividade, sendo assim menos sujeita a vieses de avaliação, além de mensurar a intensidade de alteração da regularidade e tamanho nucleares, a partir das médias da área e do índice de irregularidade de cada sub-população nuclear, conforme pode ser notado na figura 2.

20

Os principais aspectos da presente invenção serão descritos a seguir.

25

As utilizações da ferramenta apresentada são apenas exemplos de aplicações, não devendo ser apropriadas como limitantes da invenção. Análises similares, bem como variáveis com nomenclaturas diferentes, mas com significado biológico similares às utilizadas aqui devem ser consideradas dentro do escopo da invenção.

#### **A metodologia/ferramenta de Análise Morfolométrica Nuclear (MNA)**

30

O nome da metodologia desenvolvida – MNA - bem como os nomes da variável de tamanho celular (nomeada "área"), das variáveis utilizadas para cálculo do índice de irregularidade nuclear (nomeadas "Aspecto", "Área/caixa", "Razão de raios" e "Esfericidade") e o próprio nome do índice de irregularidade nuclear (NII) são nomes utilizados apenas para facilitar a descrição ao longo do relatório. Dessa forma, nomes alternativos para as mesmas variáveis ou mesmos significados biológicos devem ser considerados dentro do escopo da metodologia. MNA consiste nas seguintes etapas, a partir de imagens de núcleos celulares:

35

#### **Obtenção dos dados de tamanho nuclear, das variáveis que compõem o índice de irregularidade nuclear e geração do NII.**

40

A primeira etapa do MNA consiste em obter os dados de tamanho (área) e das variáveis de morfologia que compõem o NII, em um programa de análise de imagens. As características morfolométricas (seguidas do nome e abreviatura) usadas neste método são: (A) Tamanho nuclear (área; área); (B) Aspecto do núcleo, que se refere à razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto (Aspecto; Asp); (C) razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora inferida (Área/caixa; Arcx); (D) razão entre o maior e menor raio do núcleo (Razão de Raios; Rr); e (E) Esfericidade do núcleo dada pela fórmula "Esf= perímetro/(4\*π\*área)" (Esfericidade; Esf). As medidas B, C, D e E (Asp, Arcx, Rr e Esf, respectivamente) são agrupadas em um índice de irregularidade nuclear (NII) calculado pela fórmula:

45

$$NII = b * B - c * C + d * D + e * E$$

Equação 1: Determinação do índice de irregularidade nuclear (NII).

50



Onde: 'b', 'c', 'd' e 'e' são os pesos atribuídos às variáveis B, C, D e E, respectivamente. Os valores dos pesos utilizados nos exemplos demonstrados aqui foram b=0,90, c=0,87, d=0,96, e=0,92 e definem uma concretização preferencial, mas não limitante para a presente invenção. Tais valores foram obtidos após análise estatística, no entanto outros valores, diferentes destes, podem ser utilizados sem que o objeto da presente invenção seja alterado.

A análise e geração de NII com valores que não os citados aqui, de qualquer maneira, estão dentro do escopo da presente invenção. O objeto da presente invenção tem como objetivo o significado teórico das variáveis utilizadas, independente do nome atribuído às mesmas. Dessa forma, diversos programas de análise morfométrica de objetos podem ser utilizados para obtenção das variáveis com significados similares àqueles das variáveis utilizadas aqui, descritos na figura 1. Da mesma forma, a variável representativa do tamanho nuclear foi nomeada "área" apenas para facilitação, estando no escopo da presente patente o significado da mesma, independente da nomenclatura.

#### Separação das populações nucleares a partir do tamanho e regularidade nucleares.

Após a obtenção dos dados de área e a geração do NII para cada núcleo, os dados são plotados em um gráfico no qual há a separação das populações de núcleos. Estas populações correspondem a: núcleos normais em área e regularidade (núcleos controle), a partir dos quais é determinada a classificação dos núcleos em análise em normais (N), núcleos grandes e regulares (GR), núcleos grandes e irregulares (GI), núcleos com tamanho normal e irregulares (I), núcleos pequenos (P), núcleos pequenos e regulares (PR) e núcleos pequenos e irregulares (PI). Estas populações são ilustradas na figura 2. Os limiares que definem a separação entre as populações podem ser alterados pelo usuário para cada análise executada. A opção de eixos (eixo x=área; eixo y=NII), da mesma forma, não é restrita, podendo ser feita da maneira inversa (eixo x=NII; eixo y=área). E, finalmente, os nomes das populações utilizados na figura e no texto são apenas para facilitar o entendimento da ferramenta. Nomes alternativos para tais núcleos devem ser considerados dentro do escopo da invenção.

#### Determinação do significado biológico da distribuição dos núcleos.

A distribuição dos núcleos nas diferentes populações citadas acima representa um significado biológico específico. Núcleos que aparecem no gráfico NMA com NII e áreas semelhantes à elipse de núcleos normais/regulares são núcleos normais (sub-população N); núcleos com NII elevado são classificados como grandes e irregulares (GI), irregulares (I) ou pequenos e irregulares (PI), e usualmente ocorrem em eventos de catástrofe mitótica; núcleos pequenos (condensados) e regulares (baixo NII) (sub-população PR) usualmente são representativos de apoptose inicial; núcleos pequenos (condensados), mas com NII intermediário (sub-população P) são tipicamente núcleos em mitose; e, finalmente, núcleos com área grande, mas regulares (baixo NII) (sub-população GR) são representativos de células senescentes. Confirmamos as observações acima utilizando o NMA, como descrito nos exemplos a seguir.

A utilização da presente ferramenta para qualquer análise que for executada se baseia na execução das três etapas descritas acima. Os exemplos são apenas demonstrações da funcionalidade da ferramenta, de modo que análises de outros eventos celulares através da MNA estão contidas dentro do escopo da invenção.

#### Realização Preferencial

##### Exemplo 1 - Análise da Morfometria Nuclear na Apoptose

O relato a seguir descreve a análise morfométrica nuclear de uma população celular para análise da indução de apoptose, confirmado por metodologias específicas para a indução de apoptose (ensaios de anexina e morfologia celular).

##### Material Biológico

A análise da morfometria nuclear para avaliação da apoptose pode ser realizada com células eucarióticas de diferentes espécies expostas a diferentes

condições. Aqui, a análise foi realizada na linhagem de fibroblastos aviários HD11 expostos ao agente quimioterápico vincristina in vitro, havendo um aumento do número de núcleos no quadrante PR (Figura 3). Porém, este modelo foi utilizado apenas como ferramenta de teste, não sendo a análise limitada a nenhum tipo celular específico.

#### Exemplo 2 – Análise da Morfometria Nuclear na Senescência Celular

O relato a seguir descreve a análise morfométrica nuclear de uma população celular para análise da indução de senescência celular, confirmado por metodologias específicas para a indução de senescência (morfologia celular e ensaio de beta-galactosidase).

#### Material Biológico

A análise da morfometria nuclear para avaliação da senescência pode ser realizada com células eucarióticas de diferentes espécies expostas a diferentes condições. A presente análise foi realizada em células de gliomas C6 expostas a um tratamento indutor de senescência celular, havendo um aumento do número de núcleos no quadrante GR, conforme ilustrado na figura 4. Porém, este modelo foi utilizado apenas como ferramenta de teste, não sendo a análise limitada a nenhum tipo celular específico.

#### Exemplo 3 – Análise da Morfometria Nuclear na Catástrofe Mitótica

O relato a seguir descreve a análise morfométrica nuclear de uma população celular para análise da indução de catástrofe mitótica (CM).

#### Material Biológico

A análise da morfometria nuclear para avaliação da catástrofe mitótica pode ser realizada com células eucarióticas de diferentes espécies expostas a diferentes condições. A presente análise foi realizada em células da linhagem de glioblastoma humano U87 expostas a um tratamento farmacológico indutor de catástrofe mitótica, havendo um aumento do número de núcleos nos quadrantes I e GI, conforme ilustrado na figura 5. Porém, este modelo foi utilizado apenas como ferramenta de teste, não sendo a análise limitada a nenhum tipo celular específico.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

#### Reivindicações

##### MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR

1. Método de análise e mensuração morfométrica nuclear caracterizado por compreender as etapas:

- a) Obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear
- b) Cálculo de um índice de irregularidade nuclear (NII) para núcleo;
- c) Separação das populações nucleares a partir do tamanho nuclear e

do NII;

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar como variáveis morfométrica: área, razão entre o raio maior e menor da esfera equivalente ao núcleo, razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora, razão entre o maior e menor raio e esfericidade.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela obtenção dos valores de variáveis de morfometria nuclear compreender a análise de imagens microscópicas.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo dito índice de irregularidade nuclear (NII) ser calculado pela relação:

$$NII = b * B - c * C + d * D + e * E; \text{ onde,}$$

"A" é o tamanho nuclear;

"B" é o aspecto do núcleo da razão dos raios maior e menor da elipse equivalente ao objeto;

"C" é a razão entre a área do núcleo e a área da sua caixa delimitadora inferida;

"D" é a razão entre o maior e menor raio do núcleo;

"E" é a esfericidade do núcleo segundo a relação:  $Esf = \text{perímetro} / (4 * \pi * \text{área})$ ; e onde  $b=0,90$ ,  $c=0,87$ ,  $d=0,96$ ,  $e=0,92$ .

5. Uso do método de análise e mensuração morfométrica nuclear, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado

por ser na determinação de mecanismos de proliferação e morte celular em células eucarióticas.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por os ditos mecanismos de proliferação e morte celular são apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

7. Uso, de acordo com as reivindicações 4 e 5, caracterizado pelas ditas células eucarióticas serem células submetidas a tratamentos farmacológicos ou modificações genéticas.

**Resumo**

**MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR E USO DO MÉTODO DE ANÁLISE E MENSURAÇÃO MORFOMÉTRICA NUCLEAR**

5 A presente invenção descreve método de análise e mensuração morfométrica, além do uso do referido método para determinação do desenvolvimento de mecanismos de proliferação e morte celular por células eucarióticas, preferencialmente apoptose, senescência, mitose ou catástrofe mitótica.

VARIÁVEL (Abrev.)	REPRESENTAÇÃO
A) ÁREA (area)	
B) ASPECTO (Asp)	
C) RAZÃO DE RAIOS (Rr)	
D) ÁREA/CÁRICA (Árc)	
E) ESFERICIDADE (Esph)	

Fig. 1

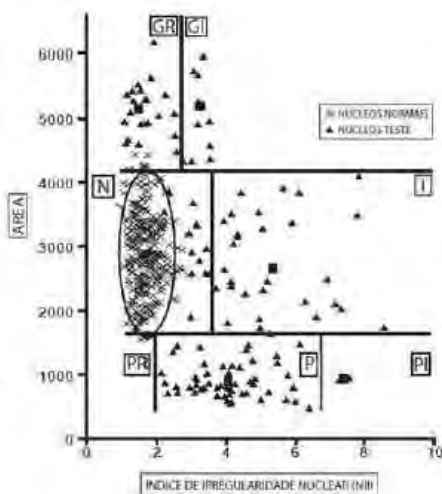


Fig. 2

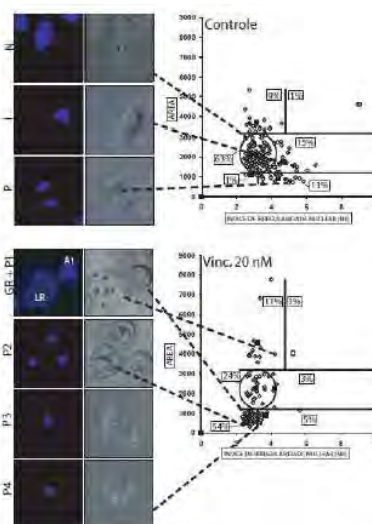


Fig. 3

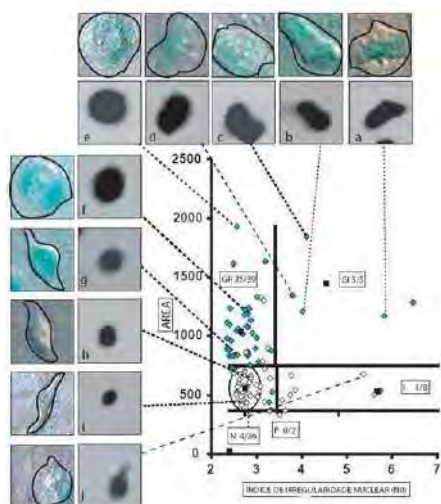


Fig. 4

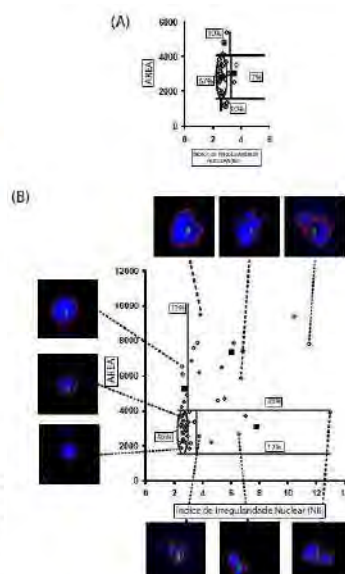


Fig. 5

# CURRÍCULO LATTES

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)



## Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Bolsista de Doutorado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0726009160227341>

Última atualização do currículo em 12/04/2014

Bacharel em Biomedicina laureado em 2008 pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular / UFRGS. Atualmente, é bolsista de Doutorado do CNPq pelo mesmo programa de pós-graduação, no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, no Departamento de Biofísica da mesma universidade, sob orientação do prof. Guido Lenz. Desenvolve atividades relacionadas à biologia celular e molecular de tumores cerebrais (gliomas) in vitro e in vivo, abordando as principais vias de sinalização celular envolvidas na resistência e resposta desses tumores a diversos agentes farmacológicos, tais como Resveratrol e Temozolomida, bem como a interação e o crosstalk entre mecanismos de proliferação e morte celular como autofagia, ciclo celular, apoptose, senescência, necrose, catástrofe mitótica, entre outros. É colaborador em projetos que envolvem terapia gênica e silenciamento de genes apoptóticos em células de gliomas, modelos in vivo de gliomas em ratos e camundongos, entre outros. Suas áreas de atuação incluem biologia e biofísica celular, biologia molecular, farmacologia molecular e celular. Além da pesquisa básica, tem grande interesse na parte de didática e ensino. **(Texto informado pelo autor)**

## Identificação

<b>Nome</b>	Eduardo Cremonese Filippi Chiela
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	FILIPPI-CHIELA, E. C.; Chiela, ECF, Filippi-Chiela, EC; Filippi-Chiela, Eduardo C.; Filippi-Chiela, Eduardo; Chiela, Eduardo; Filippi-Chiela, Eduardo C; FILIPPI-CHIELA, E C

## Endereço

<b>Endereço Profissional</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Departamento de Biofísica, Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular Agronomia 90501970 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (51) 33087620 URL da Homepage: <a href="http://www.ufrgs.br/labsinal">http://www.ufrgs.br/labsinal</a>
------------------------------	---

## Formação acadêmica/titulação

<b>2011</b>	Doutorado em andamento em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil Título: Efeitos a longo prazo de tratamentos agudos com drogas anticâncer em Glioblastomas, Orientador:  Guido Lenz, Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil
<b>2009 - 2011</b>	Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).

12/4/2014

**Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chieia)**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil  
 Título: A AUTOFAGIA E O CICLO CELULAR DESEMPENHAM PAPEL CENTRAL NO MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL E DO CO-TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA HUMANO, Ano de Obtenção: 2011.

Orientador:  Guido Lenz.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil

Palavras-chave: autofagia; gliomas; Resveratrol; temozolomida; ciclo celular; apoptose.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Biofísica Celular.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

**2005 - 2008**

Graduação em Biomedicina.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Título: Alterações Induzidas pelo Resveratrol e Efeito da Combinação deste com Temozolomida em Células da Linhagem de Glioblastoma Humano U87-MG.

Orientador: Guido Lenz.

**Atuação Profissional**

**International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology - Italy, ICGEB-ITALY, Itália.**

**Vínculo institucional****2012 - 2015**

Vínculo: Integrante, Enquadramento Funcional: Integrante, Carga horária: 20

**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Brasil**

**Vínculo institucional****2009 - Atual**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Colaborador

**Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil**

**Vínculo institucional****2008 - 2009**

Vínculo: Estágio Realizado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40

**Outras informações**

Estágio Supervisionado - Setor de Fertilização Assistida

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil**

**Vínculo institucional****2011 - Atual**

Vínculo: Bolsista de Doutorado, Enquadramento Funcional: Bolsista de Doutorado, Regime: Dedicção exclusiva.

**Vínculo institucional****2009 - 2011**

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Bolsista de Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva.

**Vínculo institucional****2006 - 2008**

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

**Atividades****03/2012 - 08/2012**

Ensino, Biomedicina, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

Citologia para Biomedicina - BIO05033 - Atividade Didática Orientada

**03/2009 - 08/2009**

Ensino, Biomedicina, Nível: Graduação

Disciplinas ministradas

12/4/2014

**Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)****08/2008 - 02/2009**

Biofísica Biomédica II - BIO 10014 - Atividade Didática Orientada  
Estágios , Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Fertilização Assistida/Reprodução Humana.

Estágio realizado  
Fertilização Assistida.

**07/2006 - 12/2008**

Estágios , Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Estágio realizado  
Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular.

**08/2005 - 12/2005**

Estágios , Instituto de Ciências Básicas e da Saúde, .

Estágio realizado  
Departamento de Ciências Morfológicas - Histologia e Embriologia.

**Projetos de pesquisa****2013 - Atual**

Prospecção de alvos terapêuticos/biomarcadores para o carcinoma cervical: relação do receptor P2X7 com células-tronco tumorais, resistência a quimioterápicos e proteínas oncogênicas do HPV  
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Paola de Andrade Mello - Integrante / Aline Beckencamp - Integrante / Andréia Buffon - Coordenador / Franciele Kipper - Integrante / LENZ, G - Integrante / Alessandra N, Bruno - Integrante,

**2012 - 2015**

Role of autophagy in the growth and therapy of gliomas in vivo  
Descrição: O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar o papel da autofagia na terapia de gliomas, Serão silenciados genes essenciais para a autofagia em gliomas e estes serão testados em um modelo in vivo..  
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.  
Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Mestrado acadêmico: (2) / Doutorado: (2)

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Lenz, G. - Coordenador / Luiz Fernando Zerbini - Integrante / Ana Maria O Battastini - Integrante.

Financiador(es): International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology - Italy - Auxílio financeiro.

**2011 - 2014**

Universal 2011

Descrição: Mecanismos da manutenção do efeito crônico de um tratamento quimioterápico agudo em células tumorais: papel da autofagia e sua integração com senescência e apoptose..  
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Lenz, G. - Coordenador.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Auxílio financeiro.

**2009 - 2012**

Efeito de chalconas derivadas da quinoxalina em células tumorais

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Tânia Regina Mielcke - Integrante / Maria Martha Campos - Coordenador.

**2009 - Atual**

Papel do receptor purinérgico P2X7 no crescimento de gliomas em um modelo in vivo

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Tamajusuku, A. - Coordenador.

**2008 - 2011**

Universal 2008

Descrição: O papel da autofagia em gliomas - relação e crosstalk entre mecanismos de morte celular induzida por quimioterápicos em gliomas.

12/4/2014

**Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)**

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Lenz, G. - Coordenador.

Número de produções C, T &amp; A: 1

**2007 - 2011**

Interferência de RNA e super expressão de um transgene através de vetor viral como ferramenta para a modulação de apoptose em gliomas

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Lopez, P.L.C; - Coordenador.

Número de produções C, T &amp; A: 1

**2007 - Atual**

Efeito e mecanismo da N-acetilcisteína (NAC) no crescimento e morte de células de Hepatocarcinoma Celular (HCC)

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Nelson Alexandre Kretzmann Filho - Coordenador.

**2006 - 2008**

Efeito dos polifenóis no crescimento e morte de gliomas em modelo in vivo

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante / Zamin, L.L. - Coordenador.

Número de produções C, T &amp; A: 2

**Revisor de periódico****2013 - Atual**

Periódico: Caderno Pedagógico (Lajeado. Online)

**2013 - Atual**

Periódico: World Journal of Medicine and Medical Science Research

**Áreas de atuação**

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Morfologia / Subárea: Citologia e Biologia Celular.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biofísica / Subárea: Biofísica Celular.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

**Idiomas**

<b>Inglês</b>	Compreende Razoavelmente, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
<b>Espanhol</b>	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.
<b>Português</b>	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
<b>Italiano</b>	Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

**Prêmios e títulos****2012**

Menção Honrosa pelo trabalho intitulado "RESVERATROL POTENCIALIZA O EFEITO CITOTÓXICO CRÔNICO DA TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE GLIOMA: PAPEL DA SENESCÊNCIA E DANO AO DNA", apresentado na XXVII FeSBE, Federação das Sociedades de Biologia Experimental.

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)

<b>2010</b>	Título - Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
<b>2008</b>	Láurea Acadêmica - Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
<b>2008</b>	Título - Bacharel em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Produções

### Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

1. PEREIRA, M. S. L. ; ZENKI, K. ; CAVALHEIRO, M. M. ; THOME, C. C. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Lenz, G. ; SOUZA, D. O. G. ; OLIVEIRA, D. L. . Cellular Senescence Induced by Prolonged Subculture Adversely Affects Glutamate Uptake in C6 Lineage. *Neurochemical Research JCR*, v. 40, p. 1-12, 2014.
2. ★ **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; THOMÉ, MARCOS PAULO ; BUENO E SILVA, MARDJA MANSSUR ; PELEGRINI, ALESSANDRA LUÍZA ; LEDUR, PÍTTIA FLORES ; GARICOCHEA, BERNARDO ; ZAMIN, LAUREN L. ; Lenz, Guido . Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer (Online) JCR*, v. 13, p. 147, 2013.  
**Citações:** WEB OF SCIENCE™ 3 | **SCOPUS 4**
3. ★ **FILIPPI-CHIELA, E C.** ; VESSONI, A T ; MENCK, C FM ; LENZ, G . Autophagy and genomic integrity. *Cell Death and Differentiation JCR*, v. 20, p. 322, 2013.
4. OLIVEIRA, C. B. ; COMUNELLO, L. N. ; MACIEL, E. S. ; GIUBEL, S. R. ; BRUNO, A. N. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; LENZ, G. ; GNOATTO, S. C. B. ; BUFFON, A. ; GOSMANN, G. . The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from Baccharis trimera in SiHa Cells: Differences in their Activity and Mechanism of Action. *Molecules (Basel, Online) JCR*, v. 18, p. 11022-11032, 2013.
5. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; BUENO E SILVA, MARDJA MANSSUR ; Lenz, G. . Recent Patents on Morphometric Analysis of Eukaryotic Cells. *Recent Patents on Medical Imaging*, v. 3, p. 123-134, 2013.
6. Zamin, L.L. ; **FILIPPI-CHIELA, E C.** ; Vargas, J.E. ; MEURER, L. ; SOUZA, A. P. ; BONORINO, C. ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Quercetin Promotes Glioma Growth in a Rat Model. *Food and Chemical Toxicology JCR*, v. x, p. xx-xx, 2013.  
**Citações:** **SCOPUS 4**
7. Lopez, Patricia L.C. ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Silva, Andrew O. ; Cordero, Elvira A.A. ; Garcia-Santos, Daniel ; Pelegrini, Alessandra L. ; Reeder, Gleice M. ; Barbieri, Nicolle L. ; Lenz, Guido . Sensitization of Glioma Cells by X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Knockdown. *Oncology (Basel) JCR*, v. 83, p. 75-82, 2012.
8. ★ **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Oliveira, Manuel M. ; Jurkovski, Bruno ; Callegari-Jacques, Sidia Maria ; Silva, Vinicius Duval da ; Lenz, Guido ; Lebedeva, Irina V. . Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. *Plos One JCR*, v. 7, p. e42522, 2012.  
**Citações:** WEB OF SCIENCE™ 2 | **SCOPUS 4**
9. Kretzmann Filho, AN ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Matte, U. ; Marroni, N. ; Marroni, C.A. . N-acetylcysteine improves antitumoral response of Interferon alpha by NF-kB downregulation in liver cancer cells. *Comparative Hepatology*, v. 11, p. 4, 2012.  
**Citações:** **SCOPUS 1**



12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)

10. Mielcke, Tânia R. ; Mascarello, Alessandra ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Zanin, Rafael F. ; Lenz, Guido ; CÉSAR LEAL, PAULO ; Domeneghini Chiaradia, Louise ; Yunes, Rosendo A. ; Nunes, Ricardo J. ; NUNES, R. J. ; Battastini, Ana M.O. ; Morrone, Fernanda B. ; CAMPOSA, MARIA M. . Activity of novel quinoxaline-derived chalcones on in vitro glioma cell proliferation. *European Journal of Medicinal Chemistry JCR*, v. 51, p. 300, 2012.

11. ★ **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Vilodre, Emily Schlee ; Zamin, Lauren L. ; Lenz, Guido . Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. *Plos One JCR*, v. 6, p. e20849, 2011.

**Citações:** WEB OF SCIENCE™ 31 | SCOPUS 37

12. Zamin, Lauren L. ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Dillenburg-Pilla, Patricia ; Horn, Fabiana ; Salbego, Christianne ; Lenz, Guido . Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells. *Cancer Science JCR*, v. 100, p. 1655-1662, 2009.

**Citações:** WEB OF SCIENCE™ 32 | SCOPUS 41

### Capítulos de livros publicados

1. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Lenz, G. ; Zamin, L.L. . Quercetin: Sources, Bioavailability and Effects on Cancer Cells. In: Taiki Chikamatsu and Yuudai Hida. (Org.). *Quercetin: Dietary Sources, Functions and Health Benefits*. 40ed. Nova York: Nova Publishers, 2013, v. 1, p. 57-82.

2. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Lenz, G. ; Zamin, L.L. . Can we Prevent Cancer? The Role of Resveratrol in Chemoprevention.. In: Dominique Delmas. (Org.). *Resveratrol: Sources, Production and Health Benefits*. 1ed. Nova York: Nova Publishers, 2013, v. 1, p. 311-344.

### Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Zamin, L.L. ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Resveratrol potencializa o efeito da temozolomida e induz parada em G2/M e autofagia em células de glioma humano U87-MG. In: II Simpósio Internacional Vinho e Saúde, 2008, Bento Gonçalves/RS. *Anais do II Simpósio Internacional Vinho e Saúde*, 2008. v. 2.

2. Zamin, L.L. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Barbieri, N. ; Horn, F. ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Avaliação das propriedades antitumorais dos compostos bioativos do vinho Resveratrol e Quercetina e potenciais mecanismos de ação. In: II Simpósio Internacional Vinho e Saúde, 2008, Bento Gonçalves-RS. *Anais do II Simpósio Internacional Vinho e Saúde*, 2008.

### Resumos publicados em anais de congressos

1. MINUSSI, D. ; HENZ, B. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Oliveira, M.M. ; LENZ, G. . In Silico Analysis of Tumor Evolution. In: São Paulo School of Advance Sciences on Oncogenesis and Translational Medicine School, 2014, São Paulo, SP, Brazil. *São Paulo School of Advance Sciences on Oncogenesis and Translational Medicine School*, 2014.

2. NASCIMENTO, J. ; MELLO, P. A. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; KIPPER, F. ; WINK, M. ; Lenz, G. ; BUFFON, A. . P2X7 Knockdown Increases Cell Viability of Human Cervical Cancer Cell Lineage after ATP Treatment. In: 4th Brazilian Purine Club Meeting, 2013, Canela, RS, Brazil. *Anais do 4th Brazilian Purine Club Meeting*, 2013.

3. NASCIMENTO, J. ; MELLO, P. A. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; BECKENCAMP, A. ; BERTODO, D. S. ; BRUNO, A. N. ; WINK, M. ; Lenz, G. ; BUFFON, A. . O PAPEL DO RECEPTOR P2X7 NO DESENVOLVIMENTO DE CARCINOMA CERVICAL HUMANO. In: 33ª Semana Científica do HCPA, 2013, Porto Alegre. *Anais da 33ª Semana Científica do HCPA*, 2013.

4. Tamajusuku, A. ; KIPPER, F. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; FLORES, D. ; Reder, G.M. ; MEURER, L. ; BATTASTINI, A. ; ROESLER, R. ; Lenz, G. ; WINK, M. . The role of P2X7 receptor in glioma cells. In: AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2013, Boston, MA, USA. *AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics*, 2013.

5. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Oliveira, M.M. ; Jukovsky, B. ; Callegari Jacques, S.M. ; Da Silva, V.D. ; Lenz, G. . Nuclear Morphometric Analysis (NMA): A New Method for Screening of Apoptosis, Mitosis, Senescence and Mitotic Catastrophe. In: 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology,

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)

2012, Rio de Janeiro, Abstracts from the 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012.

6. Zamin, L.L. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Pelegrini, AL ; Salbego, Christianne ; Lenz, G. . Resveratrol and Quercetin Induce Senescence-like Growth Arrest in Glioma Cells by Increasing DNA Damage. In: 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. Abstracts from the 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012.

7. MELLO, P. A. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; BECKENCAMP, A. ; BERTODO, D. S. ; NASCIMENTO, J. ; CALIL, L. N. ; CASALI, E. ; BRUNO, A. N. ; PACCEZ, J. ; ZERBINI, L. F. ; WINK, M. ; Lenz, G. ; BUFFON, A. . ATP - Induced Cell Death By P2x7 Receptor In Human Cervical Carcinoma Cell Line. In: 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. Abstracts from the 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012.

8. ARIGONY, A. L. V. ; MILANO, L. ; LIMA, M. ; JUCHEM, A. L. M. ; TRINDADE, C. ; MACHADO, M. ; BORDIN, D. L. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Lenz, G. ; PRA, D. ; HENRIQUES, J. A. P. . Evaluation of Iron Supplemented Media Culture in the Cellular Viability and Genomic Stability of Cell Lines MRC5 and HepG2. In: 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. Abstracts from the 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2012.

9. SILVA, M. M. B. E. ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Zamin, L.L. ; THOME, M. P. ; Pelegrini, AL ; 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, 2012, Águas de Lindóia. Anais da XXVII Reunião Anual da FeSBE, 2012.

10. Vargas, JE ; SUHRE, T. ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Silva, AO ; Lenz, G. . Senescência Celular Induzida pelo Tratamento Combinado de Resveratrol e Quercetina com Butirato de Sódio em Glioblastomas. In: XXVII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2012, Águas de Lindóia - SP. Anais da XXVII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2012.

11. ARIGONY, A. L. V. ; MILANO, L. ; LIMA, M. ; JUCHEM, A. L. M. ; TRINDADE, C. ; MACHADO, M. ; BORDIN, D. L. ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Lenz, G. ; PRA, D. ; HENRIQUES, J. A. P. . Avaliação da Influência de Meio de Cultura Suplementados com Ferro na Viabilidade Celular e na Estabilidade Genômica das Linhagens MRC5 e HepG2. In: XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012, Porto Alegre. Livro de Resumos do XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012.

12. Silva, AO ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; HUTTEN, M. ; SILVA, M. M. B. E. ; Lenz, G. . Avaliação de Alterações em Processos Celulares em Linhagens de Gliomas com Resistência Induzida à Temozolomida. In: XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012, Porto Alegre. Resumos da XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012.

13. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; SILVA, M. M. B. E. ; THOME, 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.

14. Vargas, JE ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; SUHRE, T. ; Silva, AO ; BONATO, D. ; Lenz, G. . Senescência Induzida pelo Tratamento Combinado de Resveratrol e Quercetina com Butirato de Sódio. In: XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012, Porto Alegre. Resumos da XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012.

15. MELLO, P. A. ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; BECKENCAMP, A. ; BERTODO, D. S. ; NASCIMENTO, J. ; CALIL, L. N. ; CASALI, E. ; BRUNO, A. N. ; PACCEZ, J. ; ZERBINI, L. F. ; WINK, M. ; Lenz, G. ; BUFFON, A. . ATP - Induced Cell Death is modulated by P2x7 Receptor In Human Cervical Carcinoma Cell Line.. In: Cell Symposia: Hallmarks of Cancer, 2012, San Francisco. Annals of the Cell Symposia: Hallmarks of Cancer, 2012.

16. Lenz, G. ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Zamin, L.L. . The Role of Autophagy, Cell Cycle and Mitotic Catastrophe in the Effect of Resveratrol and Its Co-Treatment With Temozolomide in Glioblastoma Cells. In: 2011 CSHL - Meeting on Cell Death, 2011, New York. 2011 CSHL - Meeting on Cell Death, 2011.

17. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Zamin, L.L. ; Lenz, G. . Crosstalk among apoptosis, autophagy and cell cycle regulation in response to temozolomide and resveratrol in glioma. In: Signaling in Cell Death, Cancer and the Immune System, 2010, Angra dos Reis, RJ, Brazil. Einstein - Official publication of the Albert Einstein Institute, 2010. v. 8. p. S79-S79.

18. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Zamin, L.L. ; Lopez, P.L.C ; Lenz, G. . The Role of Autophagy on the Toxicity of

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chieila)

Resveratrol in Human Glioblastoma Cells. In: 50th Annual Meeting of the American Society of cell Biology, 2010, Phyladelphia. 50th Annual Meeting of the American Society of cell Biology, 2010.

- 19.** Lopez, P.L.C ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Cordero, E.A.A. ; Garcia, D.S. ; Reder, G.M. ; Lenz, G. . XIAP Or Survivin Silencing Affect Sensitivity To Specific Drugs in Glioma Cells. In: 50th Annual Meeting of the American Society of cell Biology, 2010, Phyladelphia. 50th Annual Meeting of the American Society of cell Biology, 2010.
- 20.** Zamin, L.L ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Pelegrini, AL ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Resveratrol and Quercetin Induce Senescence-like Growth Arrest by Increasing DNA Damage and Phosphorylation of H2AX. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistr and Molecular Biology Society", 2010, Foz do Iguaçu, PR, Brazil, XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistr and Molecular Biology Society", 2010.
- 21.** Kretzmann, N. ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; MAURIZ, J.L. ; Matte, U. ; Marroni, N. ; Marroni, C.A. . NAC increases the interferon alpha response in cancer liver cells by NF-KB pathway. In: The EASL special conference on hepatocellular carcinoma: from genomics to treatment, 2010. The EASL special conference on hepatocellular carcinoma: from genomics to treatment, 2010.
- 22.** Kretzmann Filho, AN ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; MAURIZ, J.L. ; Matte, U. ; Marroni, N. ; Marroni, C.A. . NAC increases the interferon alpha response in cancer liver cells by NF-KB pathway. In: XXII Congresso da Associação Latino Americana para o Estudo do Fígado, 2010. XXII Congresso da Associação Latino Americana para o Estudo do Fígado.
- 23.** Rizzo, LB ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Zamin, L.L ; Lenz, G. . Resveratrol e Quercetina exercem efeito citotóxico aditivo em glioma p53+ através da indução de senescência. In: XXI Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009.
- 24.** Lopez, P.L.C ; Silva, AO ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Vargas, JE ; Zamin, L.L ; Lenz, G. , RNA interference to the caspase inhibitors XIAP and Survivin modulate apoptosis in glioma. In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia, SP, Brazil. Resumos do XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009.
- 25.** **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Zamin, L.L ; Lenz, G. . SENSIBILITY AND POTENTIAL PATHWAYS INVOLVED IN THE RESPONSE OF GLIOMA LINEAGE C6 TO RESVERATROL AND QUERCETIN. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e XI Congresso da Associação Panamericana de bioquímica e Biologia Molecular (PABMB), 2008, Águas de Lindóia - SP. CD-ROM e XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008.
- 26.** **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Zamin, L.L. ; Salbego, C. ; Lenz, G. . RESVERATROL POTENCIALIZA O EFEITO DA TEMOZOLOMIDA E INDUZ AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO U87-MG. In: 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2008, Porto Alegre. 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre: Fundação Médica do Rio Grande do Sul, 2008. v. 28. p. 22-23.
- 27.** Zamin, L.L. ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Resveratrol and Quercetin modulate PI3-K/Akt pathway and decrease the cell number of glioma lineage C6 and U87MG. In: I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin American, Caribbean and Iberian Peninsula, 2008, Búzios/RJ. I IBRO/LARC Congress of Neuroscience of Latin America, Caribbean and Iberian Peninsula, 2008.
- 28.** Zamin, L.L ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Tamajusuku, A. ; Ledur, P.F ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Resveratrol and Quercetin decrease the cell number and viability in several glioma lineages. In: VII São Paulo Research Conferences Câncer: da Biologia Molecular ao tratamento, 2007, São Paulo. VII São Paulo Research Conferences Câncer: da Biologia Molecular ao tratamento, 2007.
- 29.** **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Zamin, L.L. ; Dillenburger-Pilla, P. ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Avaliação do efeito do resveratrol, quercetina e paclitaxel sobre a proliferação da linhagem C6 de glioma de rato. In: XX Reunião Anual da Fesbe, 2007, Águas de Lindóia, SP. XX Reunião Anual da Fesbe, 2007.
- 30.** **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Zamin, L.L. ; Dillenburger-Pilla, P. ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos potenciais compostos anti-tumorais resveratrol e quercetina. In: XIX Salão de Iniciação Científica, 2007, Porto Alegre. XIX Salão de Iniciação Científica, 2007.
- 31.** Zamin, L.L. ; **FILIPPI-CHIEILA, E. C.** ; Salbego, C. ; Lenz, G. . Resveratrol and Quercetin induced cell death in

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)

several glioma lineage. In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre. IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007.

**32. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Zamin, L.L.; Dillenburger-Pilla, P.; Salbego, C.; Lenz, G. . Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos resveratrol, quercetina e paclitaxel. In: 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007, Porto Alegre. 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2007.

## Apresentações de Trabalho

**1. FILIPPI-CHIELA, E. C.** (Dis)connecting Autophagy and Senescence Induced by DNA Damage, 2014. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

**2. Filippi-Chiela, Eduardo** . Me diga a origem da informação, e te direi quem é: a ciência pelas lentes dos métodos científicos, 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**3. FILIPPI-CHIELA, E. C.** . Atuação do Biomédico na Pós-Graduação. 2013. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**4. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Oliveira, M.; Jukovsky, B.; Callegari Jacques, S.M.; Da Silva, V.D.; Lenz, G. . Nuclear Morphometric Analysis (NMA): A New Method for Screening of Apoptosis, Mitosis, Senescence and Mitotic Catastrophe. 2012. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

**5. Filippi-Chiela, Eduardo C.** , Autofagia - Conceitos Teóricos e Metodologias de Análise, 2012. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**6. Filippi-Chiela, Eduardo C.** . Morrer ou não morrer? Eis a questão - O Papel da Autofagia na Biologia Tumoral, 2011. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**7. FILIPPI-CHIELA, E. C.** . Interações entre mecanismos de morte celular no combate ao câncer: da autofagia à catástrofe mitótica. 2010. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**8. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Zamin, L.L.; Salbego, C.; Lenz, G. . Resveratrol and Temozolomide have additive cytotoxic effect, induced autophagy and alter the cycle of U87-MG cells. 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**9. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Zamin, L.L.; Lenz, G. . O papel da autofagia e da modulação do ciclo celular no efeito citotóxico aditivo de esveratrol, 2009. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

**10. FILIPPI-CHIELA, E. C.** . Resveratrol potencializa o efeito da temozolomida e induz parada em G2/M e autofagia em células de glioma humano U87-MG, 2008. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**11. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Zamin, L.L.; Salbego, C.; Lenz, G. . Alterações celulares induzidas pelo resveratrol e efeito de sua combinação com temozolomida em células da linhagem de glioblastoma humano U87-MG. 2008. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

**12. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Zamin, L.L.; Dillenburger-Pilla, P.; Salbego, C.; Lenz, G. . Sensibilidade Comparada das Linhagens de Glioma C6, U87 e GL261 aos potenciais compostos anti-tumorais Resveratrol e Quercetina. 2007. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

**13. FILIPPI-CHIELA, E. C.**; Zamin, L.L.; Dillenburger-Pilla, P.; Salbego, C.; Lenz, G. . Sensibilidade Comparada das Linhagens de Glioma C6, U87 e GL261 aos potenciais compostos anti-tumorais Resveratrol e Quercetina. 2007. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

## Produção técnica

### Processos ou técnicas

1.

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=W0719342>




9/14

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)

**Filippi-Chiela, Eduardo** ; Oliveira, M.M. ; Jukovsky, B. ; Callegari Jacques, S.M. ; Da Silva, V.D. ; Lenz, G. . Patente INPI - 'Método de análise e mensuração morfométrica nuclear e uso do método de análise e mensuração morfométrica nuclear'. 2012.

### Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. **FILIPPI-CHIELA, E C** ; KELLEME, K. . Fisgados pela Ciência. 2013. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 
2. **FILIPPI-CHIELA, E C** . Limpeza celular ajuda a nos tornar longevos. 2012. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 
3. **FILIPPI-CHIELA, E C** . Autofagia para a Sobrevivência. 2010. (Programa de rádio ou TV/Entrevista). 

### Demais tipos de produção técnica

1. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** . V Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em **Biologia Celular e Molecular** / UFRGS. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Outra).
2. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** . III Curso de Sinalização Celular em Câncer. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
3. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . II Curso de Estudo da Sinalização Celular do Câncer. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
4. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . Curso de Cultura de Células - Conceitos e Aplicações (Teórico-Prático). 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
5. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Ledur, P.F ; Lopez, P.L.C ; Silva, AO ; Vargas, JE ; Vilandre, ES ; Lenz, G. . I Curso de Sinalização Celular em Câncer. 2011. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
6. Carlini, CR ; Pelegrini, AL ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . III Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em **Biologia Celular e Molecular** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - **As Células**. 2010. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
7. Carlini, CR ; Barbieri, N. ; Pelegrini, AL ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . II Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em **Biologia Celular e Molecular** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Tema: **Microorganismos - mocinhos ou bandidos?**, 2009. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).

## Patentes e registros

---

### Patente

A Confirmação do status de um pedido de patentes poderá ser solicitada à Diretoria de Patentes (DIRPA) por meio de uma Certidão de atos relativos aos processos

1. ★ **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . Patente INPI - BR1020120152886. Método de Análise e Mensuração Morfométrica Nuclear (MNA) e Uso do Método de Análise e Mensuração Morfométrica Nuclear. 2012, Brasil.  
Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102012015288-6, data de depósito: 21/06/2012, título: "Patente INPI - BR1020120152886, Método de Análise e Mensuração Morfométrica Nuclear (MNA) e Uso do Método de Análise e Mensuração Morfométrica Nuclear".

### Bancas

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=W0719342>

10/14

### Participação em bancas de trabalhos de conclusão

#### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. DANTAS, D.; **FILIPPI-CHIELA, E. C.**, Participação em banca de Jéssica Miethicki da Silva Gonçalves. Investigação de Efeito Antitumoral de Novas Drogas em Linhagens de Melanoma Humano, 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
2. BONATO, D.; **FILIPPI-CHIELA, E. C.**, Participação em banca de Larissa Milano de Souza. Avaliação da Indução de Senescência e Apoptose pelo Tratamento com Antraciclinas em Fibroblastos Humanos Deficientes no Reparo por Excisão de Nucleotídeos". 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Eventos

##### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 10th International Congress in Cell Biology and 16th Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, Nuclear Morphometric Analysis (NMA): A New Method for Screening of Apoptosis, Mitosis, Senescence and Mitotic Catastrophe, 2012, (Congresso).
2. 1st Internation Meeting of Laboratory Animals, 2012. (Encontro).
3. Curso (3h) - Image J: A public domain for image processing and analysis. 2012. (Outra).
4. Encaminhamento de Projetos ao CEP/UFRGS pela Plataforma Brasil (4h). 2012. (Outra).
5. II Curso de Sinalização Celular em Câncer, AUTOFAGIA - Conceitos teóricos e ferramentas de análise prática, 2012, (Outra).
6. Signaling in cell death survival, proliferation and degeneration, Resveratrol Potentiates the Effect of Temozolomide by Modulating Cell Cycle and Inducing Mitotic Catastrophe in Glioblastoma Cells, 2011, (Congresso).
7. Simpósio Novas Fronteiras da Biologia Celular, VINCRISTINA INDUZ APOPTOSE, PARADA NO CICLO CELULAR E AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA, 2011. (Simpósio).
8. Curso - "Tópicos teórico-práticos em Neurociências". Curso - "Tópicos teórico-práticos em Neurociências". 2010. (Outra).
9. IV Semana Acadêmica da Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Interações entre mecanismos de morte celular no combate ao câncer: da autofagia à catástrofe mitótica, 2010, (Outra).
10. XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Resveratrol and Temozolomide have additive cytotoxic effect, induced autophagy and alter the cycle of U87-MG cells. 2009. (Congresso).
11. Curso - Cuidados e Manejo de Animais de Experimentação, 2009. (Outra).
12. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e XI Congresso da Associação Panamericana de bioquímica e Biologia Molecular (PABMB), SENSIBILITY AND POTENTIAL PATHWAYS INVOLVED IN THE RESPONSE OF GLIOMA LINEAGE C6 TO RESVERATROL AND QUERCETIN, 2008. (Congresso).
13. II Simpósio Internacional Vinho e Saúde, Resveratrol potencializa o efeito da temozolomida e induz parada em G2/M e autofagia em células de glioblastoma humano U87-MG, 2008, (Simpósio).

14. Curso - Bioinformática no Desenvolvimento de Vacinas (20h). 2008. (Outra).
15. Curso de Extensão Básico de Citometria de Fluxo - 20h (teórico/prático). 2008. (Outra).
16. 28ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. RESVERATROL POTENCIALIZA O EFEITO DA TEMOZOLOMIDA E INDUZ AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOMA HUMANO U87-MG. 2008. (Outra).
17. I Semana Acadêmica de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007. (Congresso).
18. 27ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos resveratrol, quercetina e paclitaxel. 2007. (Congresso).
19. XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos potenciais compostos anti-tumorais resveratrol e quercetina. 2007. (Congresso).
20. II Salão de Iniciação Científica e Extensão do Centro Metodista IPA. Sensibilidade comparada das linhagens de glioma C6, U87 e GL261 aos resveratrol, quercetina e paclitaxel. 2007. (Congresso).
21. VII São Paulo Research Conferences Cancêr: da Biologia Molecular ao tratamento. Resveratrol and Quercetin decrease the cell number and viability in several glioma lineages. 2007. (Congresso).
22. XXII Reunião Anual da Fesbe, Avaliação do efeito do resveratrol, quercetina e paclitaxel sobre a proliferação da linhagem C6 de glioma de rato. 2007. (Congresso).
23. Best of American Society of Clinical Oncology. 2007. (Congresso).
24. Curso de Extensão - I Simpósio de Biologia Molecular Aplicada às Ciências da Saúde (6h). 2007. (Simpósio).
25. II Curso de Extensão - Células-Tronco: Biologia e Aplicações Clínicas (15h). 2007. (Outra).
26. Curso - Produção e Manipulação de Embrões de Camundongo in vitro (3h). 2007. (Outra).
27. XVIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 2006. (Congresso).
28. II Jornada Acadêmica da Biomedicina da FFFCMPA. 2006. (Congresso).
29. Curso - Genética na UFRGS: Pesquisa e Ensino ao Alcance de Todos (30h). 2006. (Outra).
30. XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. 2005. (Congresso).
31. I Congresso Brasileiro de Células Tronco. 2005. (Congresso).
32. I Jornada Acadêmica da Biomedicina da FFFCMPA. 2005. (Congresso).
33. I Curso de Manipulação Genética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (8h). 2005. (Outra).
34. Curso de Química Básica Laboratorial (30h). 2005. (Outra).
35. Curso - "Planejamento Estratégico - CDG/SINEPE" (24h). 2003. (Outra).

#### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **Filippi-Chiela, Eduardo** . V Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular / UFRGS. 2013. (Outro).
2. Lenz, G. ; Vilodre, ES ; **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Silva, AO ; KIPPER, F. ; THOME, M. P. ; MINUSSI, D. . III

12/4/2014

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Eduardo Cremonese Filippi Chiela)

Curso de Sinalização Celular no Câncer - Teoria e Prática em Biologia Tumoral. 2013. (Congresso).

3. Lenz, G. ; THOME, M. P. ; Vilodre, ES ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Ledur, P.F ; KIPPER, F. ; DIEHL, C. ; Silva, AO ; SILVA, M. M. B. E. ; DALBERTO, T. ; SILVA, M. A. ; Vargas, J.E. . II Curso de Sinalização Celular no Câncer - Teoria e Prática em Biologia Tumoral. 2012. (Outro).

4. **Filippi-Chiela, Eduardo C.** ; Vilodre, ES ; Vargas, J.E. ; Silva, AO ; Ledur, P.F ; Lopez, P.L.C ; Lenz, Guido . I Curso de Sinalização Celular em Câncer. 2011. (Outro).

5. Carlini, CR ; Pelegrini, AL ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . III Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Tema: As Células. 2010. (Outro).

6. Carlini, CR ; Barbieri, N. ; Pelegrini, AL ; **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . II Curso de Férias do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Tema: Microrganismos - Mocinhos ou bandidos?. 2009. (Outro).

7. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Oliveira, M. ; Rocha, C. ; Seminotti, B. ; Martinelli, N. . II Semana Acadêmica de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008. (Congresso).

8. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** ; Seminotti, B. ; Martinelli, N. ; Cohen, C. ; Rocha, C. . I Semana Acadêmica de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007. (Congresso).

9. **FILIPPI-CHIELA, E. C.** . 1ª e 2ª Campanhas "Doe sangue, Salve vidas", 2003. (Outro).

## Orientações

---

### Orientações e supervisões em andamento

#### Iniciação científica

1. Mardja Manssur Bueno e Silva. Indução de autofagia por resveratrol. Início: 2012. Iniciação científica (Graduando em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul. (Orientador).

### Orientações e supervisões concluídas

#### Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Marcos Paulo Thomé. Nova abordagem para avaliação de autofagia utilizando o marcador Laranja de Acridina. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul. Orientador: Eduardo Cremonese Filippi Chiela.

## Outras informações relevantes

---

2010 - 2012: Representante discente eleito do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul 2012  
 - 2013: Representante Discente no Conselho Científico do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul Membro afiliado da Sociedade Brasileira de Biologia Celular (SBBC)