

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA APÓS TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA**

Mardja Manssur Bueno e Silva

Orientador: Dr. Guido Lenz
Co-orientador: Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Porto Alegre, Junho de 2016.

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

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM
CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA APÓS TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Mardja Manssur Bueno e Silva

Orientador: Dr. Guido Lenz
Co-orientador: Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Porto Alegre, Junho de 2016.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan

Agradecimentos

Ao meu pai (*in memoriam*) por me incentivar a fazer do meu amor à ciência uma profissão. À minha mãe pelo apoio incondicional durante mais essa etapa, obrigada por ser meu exemplo de coragem e perseverança que me faz seguir em frente mesmo nas situações que parecem impossíveis, essa conquista também é tua.

Ao Alan, tenho muita sorte em te ter na minha vida, obrigada por ser meu companheiro de todas as horas e estar sempre ao meu lado me fazendo não desistir nos momentos difíceis.

Aos amigos de Toronto que foram a minha “casa longe de casa” e me incitaram a vontade de conhecer o mundo. Aos meus amigos Lia, Michele, Darlan e Hans pelas madrugadas jogando, maratonas de filmes, risadas e principalmente pelo apoio de vocês.

Ao professor Fábio Klamt do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelo apoio científico e ter permitido que eu realizasse experimentos no Laboratório de Bioquímica Celular. Também à Ivi por ser uma companheira de experimentos tão querida e uma excelente professora, sem ti esse trabalho não existiria.

Aos meus dois orientadores Guido Lenz e Eduardo Chiela pelo encorajamento constante, apoio e conhecimentos transmitidos.

À Ivi e ao Eduardo pela leitura crítica do manuscrito e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Sinalização Celular pelos últimos 4 anos de desafios, companheirismo e amizade.

Sumário

1.Introdução	10
1.1 Mitocôndria, espécies reativas de oxigênio e câncer.....	10
1.2 Metabolismo tumoral.....	14
1.3 Reprogramação do metabolismo em glioblastoma.....	20
1.4 Inibidores metabólicos no tratamento de câncer	22
2. Objetivos.....	28
3. Artigo científico	30
3.1 Introduction	32
3.2 Results	34
3.3 Discussion	48
3.4 Material and Methods	50
4. Discussão.....	57
5. Conclusões	60
6. Referências bibliográficas.....	61
7. Currículo Lattes.....	66

Lista de abreviaturas

ATP – adenosina trifosfato

ROS – espécies reativas de oxigênio

TMZ - Temozolomida

MMP – potencial de membrana mitocondrial

OXPPOS – fosforilação oxidativa

mtDNA – DNA mitocondrial

SMAC – segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria (do inglês *second mitochondria-derived activator of caspases*)

PGC1a – peroxissoma ativada por proliferação co-ativadora do receptor gamma 1-alpha (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

TCA – ciclo do ácido tricarboxílico

PET – tomografia por emissão de pósitrons

NADP – fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina

GBM - glioblastoma

PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase

2-DG – 2 deoxi-d-glicose

DCA - dicloroacetato

PDK – piruvato desidrogenase quinase

PDH – piruvato desidrogenase

HIF1-a – fator 1-alfa induzido por hipóxia (do inglês *hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

ETC – cadeia transportadora de elétrons

KCN – cianeto de potássio

FCCP – carbonil cianeto-p-trifluorometroxifenilhidrazona (do inglês *carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*)

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Esquema representando a diferença entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg). Adaptada de Heiden et al, 2009

Figura 2: Esquema representando os *hallmarks* originais e emergentes do câncer, assim como papel do metabolismo tumoral. Adaptada de Hanahan e Weinberg 2011

Figura 3: Alvos terapêuticos dos *hallmarks* do câncer. Adaptada de Hanahan e Weinberg 2011.

Figura 4: Resumo da ação de diferentes inibidores de glicólise e fosforilação oxidativa.

Resumo

Mitocôndrias desempenham funções celulares vitais. O funcionamento dessas organelas e seu papel no metabolismo celular, não surpreendentemente, têm sido implicados no desenvolvimento de diferentes cânceres. Nos últimos anos, diversos estudos tem sugerido um papel importante para as mitocôndrias e o metabolismo celular na resposta à terapia e na resistência de células tumorais à essa terapia. Dado o papel central da mitocôndria na homeostase celular, avaliamos as alterações mitocondriais e metabólicas em células de glioblastoma em resposta ao tratamento com o quimioterápico Temozolomida (TMZ). O tratamento agudo com TMZ induziu um aumento transitório tanto na massa mitocondrial como no potencial de membrana mitocondrial (MMP) 5 dias após o tratamento, seguido de uma diminuição dos mesmos parâmetros no sétimo dia. O aumento desses parâmetros é acompanhado por uma diminuição nos níveis de expressão de PGC1a no dia 3 e um aumento progressivo nos níveis de autofagia, sugerindo que o aumento de massa mitocondrial é independente de PGC1a, podendo ser devido à um acúmulo de mitocôndrias. Além disso, o aumento de massa mitocondrial e potencial de membrana se correlacionam com os níveis mais elevados de estresse oxidativo e senescência no D5. Também foram avaliadas taxas de consumo de oxigênio tanto em células controle como tratadas com TMZ, observando-se no D5 células apresentam essas taxas elevadas e uma maior capacidade reserva. A fim de entender como alterações mitocondriais podem influenciar na resposta à quimioterapia, nós tratamos as células previamente tratadas com TMZ no dia 5 com inibidores de glicólise e/ou fosforilação oxidativa e acompanhamos o número de células. Os resultados sugerem que os inibidores diminuem a proliferação celular. Além disso, células tratadas com TMZ parecem ser mais sensíveis à inibição de fosforilação oxidativa do que glicólise, sugerindo que TMZ reprograma o metabolismo dessas células para um estado mais oxidativo.

Abstract

Mitochondria play vital cellular functions. These organelles functions and roles in cellular metabolism not surprisingly have been implicated in a broad spectrum of diseases, including neurodegeneration and cancer. Lately, it has been given an important role for mitochondria and cellular metabolism in response and resistance of tumour cells to therapy. Given the central role of mitochondria in cellular homeostasis, we evaluated mitochondria network alterations in glioblastoma cells in response to treatment with the chemotherapeutic Temozolomide (TMZ). The acute treatment with TMZ induced an increase in both mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential (MMP) 5 days after treatment, followed by a decrease in the same parameters on day 7. The increase in these parameters is accompanied by a decrease in PGC1a expression on day 3 and a progressive increase in autophagy levels, suggesting that the increase in mitochondrial mass is independent of PGC1a and may be due to an accumulation of mitochondria. Also, the increase in mitochondrial mass and MMP correlates with higher levels of oxidative stress and senescence on day 5. We also evaluated mitochondrial oxygen consumption in both control and treated with TMZ cells, observing that 5 days after treatment with TMZ cells have higher oxygen consumption rates and a higher reserve capacity. In order to understand how mitochondrial alterations influence the response to chemotherapy, we treated the cells previously treated with TMZ on D5 with glycolysis and OXPHOS inhibitors and followed cell number. Results suggest that these inhibitors abrogate TMZ-treated cells proliferation. Also, TMZ-treated cells are more sensitive to OXPHOS inhibition than control cells, suggesting that TMZ reprograms the cells metabolism to a more oxidative state instead of a glycolytic one.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mitocôndrias, espécies reativas de oxigênio e câncer

Mitocôndrias são organelas indispensáveis para o metabolismo celular, regulação de apoptose e sinalização celular. Essas organelas apresentam duas membranas fosfolipídicas, uma externa e outra interna formada por cristas resultantes do próprio dobramento da membrana. Sua função mais conhecida é a produção de ATP via fosforilação oxidativa (OXPHOS) na membrana mitocondrial interna (Hattori *et al.*, 2014). Outra particularidade dessas organelas é que elas possuem seu próprio DNA (mtDNA), uma molécula circular de fita dupla com aproximadamente 16.5 kb de tamanho e que contém 37 genes responsáveis por codificar 13 subunidades dos complexos I, III, IV e V da cadeia transportadora de elétrons; além de codificar 22 tRNAs e 2 rRNAs. Além da produção de ATP, mitocôndrias estão envolvidas no metabolismo de aminoácidos e nitrogênio, homeostase de cálcio e regulação do estado redox celular. Também participam nos processos de morte celular, controlando a via intrínseca da apoptose através da liberação de fatores pró-apoptóticos, como citocromo c e SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase) do espaço intermembrana mitocondrial para o citoplasma (Orrenius *et al.*, 2003).

Tendo em vista que mitocôndrias efetuam funções vitais (metabolismo energético) e letais (morte celular) tanto em contextos fisiológicos quanto patológicos, não é nenhuma surpresa que mitocôndrias sejam implicadas na iniciação e progressão tumoral (Ohta, 2006; Fulda *et al.*, 2010). Foi em 1920 através dos experimentos de Otto Warburg que ocorreu a primeira descrição do envolvimento de mitocôndrias em câncer. Desde então, mais estudos têm evidenciado que mitocôndrias em células tumorais são estruturalmente e funcionalmente diferentes de células não-tumorais (Zhang *et al.*, 2010). Em células tumorais, essas organelas sofrem mudanças e se caracterizam pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem promover o desenvolvimento tumoral através da indução de instabilidade genômica e modificando a expressão de genes. Além disso, o dano oxidativo também pode induzir mutações no mtDNA,

danificando assim o processo de OXPHOS, o que conseqüentemente vai aumentar a produção de ROS, completando assim o “ciclo vicioso” entre mitocôndrias, ROS, instabilidade genômica e desenvolvimento tumoral (Yang *et al.*, 2016).

Assim como nas doenças neurodegenerativas, o câncer também se caracteriza por um aumento expressivo na produção de ROS, principalmente originados da OXPHOS. O desequilíbrio redox resultante causa dano ao DNA, a proteínas e a lipídeos e desregula vias apoptóticas. Seus efeitos deletérios são rapidamente manifestados, afetando profundamente mitocôndrias. Em células tumorais, o aumento nos níveis de ROS tem sido associado com mutações no mtDNA que, por sua vez, parecem causar alterações no estado bioenergético e biossintético da célula – ocasionando uma reprogramação metabólica. Além disso, a superprodução de ROS pode elevar a peroxidação de ácidos graxos nas membranas mitocondriais. A peroxidação do fosfolípido cardiolipina na mitocôndria leva à formação de aldeídos reativos, como o 4-hidroxinonemal (HNE) e malondialdeído (MDA), que são capazes de reagir com proteínas e DNA (Barrera *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016).

Tendo em vista que o conteúdo de ROS em células tumorais é normalmente aumentado, mitocôndrias dependem do seu sistema antioxidante para neutralização e eliminação dos radicais gerados por OXPHOS. A dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ produzido na matriz mitocondrial é catalisado por Mn superóxido dismutase (MnSOD, SOD2), enquanto a dismutação de O_2 produzido no espaço intermembrana é catalisada por Cu/ZnSOD (conhecida também como SOD1). Outra enzima mitocondrial, MTHFD2 (methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase 2) também parece estar envolvida na geração de NADH, necessário para proteção contra ROS e para a síntese de macromoléculas. Por outro lado, MTHFD2 também é apontada como responsável pela produção de purinas em tumores altamente proliferativos, sendo portanto superexpressa nesses (Barrera *et al.*, 2016).

Dados recentes sugerem que alguns oncogenes e genes supressores tumorais podem modular a dinâmica mitocondrial através de importantes vias de sinalização celular, e que a massa e função mitocondriais variam entre tumores e indivíduos. Mudanças na massa mitocondrial são controladas tanto por mudanças na biogênese mitocondrial, controlada pelo fator de transcrição PGC1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ co-activator-1 α), como pela

autofagia de mitocôndrias (também chamada de mitofagia). Tanto a biogênese mitocondrial quanto a mitofagia são processos que são regulados em resposta a estresses celulares, incluindo a disponibilidade de nutrientes e o estado redox, e são influenciadas pela atividade de importantes oncogenes e genes supressores tumorais. Apesar de muito ter sido descoberto recentemente a respeito de como esses processos são coordenados em cultura de células e modelos murinos, existem poucas evidências sobre como ocorrem as mudanças em massa mitocondrial em tumores primários *in vivo*. Além disso, apesar de se saber que há uma variação significativa na massa mitocondrial entre tumores e indivíduos, ainda se desconhece se há relação com o grau do tumor, o subtipo molecular, a resposta à terapia e/ou à recorrência, informações que poderiam ser de extrema relevância clínica (Pokorný *et al.*, 2015).

Os múltiplos papéis essenciais desempenhados por mitocôndrias na transformação e progressão tumoral fazem dessas organelas alvos promissores na terapia anticâncer. Além disso, o envolvimento de mitocôndrias na regulação de apoptose e na reprogramação metabólica de células tumorais seria um ponto importante na concepção de novos fármacos direcionados a mitocôndrias. Usando a diferença entre mitocôndrias de células tumorais e células não tumorais, já foram desenvolvidos alguns agentes – como miméticos de BH3 (Bcl-2 homology domain 3) - que agem especificamente nessas organelas através da potencialização de processos pró-apoptóticos e inibindo a ação de fatores anti-apoptóticos, podendo ativar assim a apoptose bloqueada em células tumorais (Zhang *et al.*, 2010). Neste sentido, uma abordagem que poderia ser usada seria a de aumentar a permeabilidade da membrana externa mitocondrial, levando à ruptura da membrana e liberação de fatores pró-apoptóticos do espaço intermembrana. Outra abordagem para iniciar a apoptose pode ser o uso de homólogos de BH3, que possuem a mesma estrutura e funcionalidade de proteínas pró-apoptóticas BH3. Por antagonizar as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e/ou Bcl-XL, homólogos de BH3 facilitam a formação de poros na membrana externa mitocondrial mediada por BAX (Bcl-2 associated protein) e BAK (Bcl-2 antagonist/killer protein) (Fulda *et al.*, 2010).

Algumas estratégias de administração de fármaco dirigida para mitocôndrias já foram desenvolvidas. Entre esses sistemas estão 1) cátions

lipofílicos deslocalizados (DLCs), que têm como alvo a carga negativa da matriz mitocondrial e prontamente atravessam as membranas mitocondriais; 2) sequências de direcionamento mitocondrial (MTSS), que contém polipeptídios de 20 a 40 resíduos de aminoácidos que podem ser reconhecidos pela maquinaria de importação mitocondrial; 3) aminoácidos sintéticos e transportadores mitocondriais baseados em peptídeos que entram em mitocôndrias de uma forma orientada por carga, evitando o sequestro por lisossomo/endossomo e assim melhorando o acúmulo em mitocôndrias; 4) transportadores baseados em vesículas que se direcionam para mitocôndrias e se fusionam com a membrana externa (Horton *et al.*, 2008; Yamada e Harashima, 2008) .

Porém, mesmo com os potenciais benefícios clínicos em direcionar a terapia à essas organelas, ainda se debate a especificidade e seletividade em células tumorais; já que, por exemplo, se a terapia tiver como alvo a produção de ATP, também pode interferir na produção em células normais. Portanto, tendo em vista o potencial papel de mitocôndrias no tratamento anticâncer e o desenvolvimento de alguns fármacos dirigidos para a organela, um melhor conhecimento do papel mitocondrial no desenvolvimento tumoral e resposta à terapia ajudaria a desvendar outros alvos terapêuticos e a aumentar a seletividade dos tratamentos.

1.2 Metabolismo tumoral

Conforme discutido anteriormente, células tumorais possuem mitocôndrias que diferem estruturalmente e funcionalmente de mitocôndrias de células não tumorais e essas organelas ativamente participam na carcinogênese e progressão tumoral. Outra diferença entre células tumorais e não tumorais é uma reprogramação no metabolismo em células tumorais que depende das funções bioenergéticas e biossintéticas das mitocôndrias (Yang *et al.*, 2016).

A glicose é fonte energética central usada em processos biossintéticos dentro da célula. Em células não tumorais, que não se dividem rapidamente e em condições em que o oxigênio não é limitante, a glicose é metabolizada através da glicólise em piruvato, que subsequentemente entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) na mitocôndria para a síntese de 36 moléculas de ATP/molécula de glicose via fosforilação oxidativa. Porém, na maioria das células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, existe um redirecionamento do metabolismo em direção à glicólise e fermentação em lactato, resultando na produção de apenas duas moléculas de ATP/molécula de glicose utilizada (Prasanna *et al.*, 2009). Essa reprogramação do metabolismo de células tumorais para realizarem glicólise mesmo na presença de oxigênio é denominada de efeito Warburg e foi primeiramente descrita em 1924 pelo bioquímico Otto Warburg (**Figura 1**).

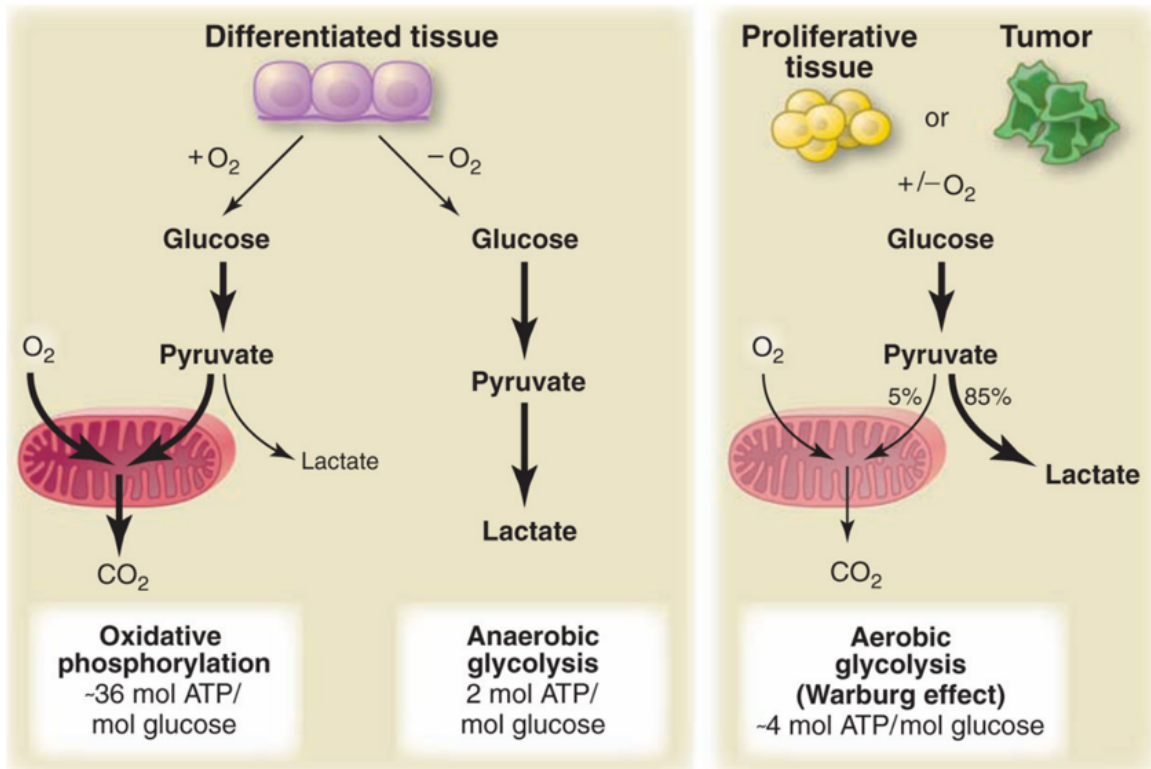


Figura 1: Esquema representando a diferença entre fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (efeito Warburg). Células diferenciadas não proliferativas quando em presença de oxigênio metabolizam glicose em piruvato através da glicólise e então oxidam completamente a maioria do piruvato em CO_2 na mitocôndria durante o processo de fosforilação oxidativa. Como o oxigênio é necessário como o aceptor final de elétrons para a completa oxidação da molécula de glicose, o oxigênio é essencial para esse processo. Quando há pouco oxigênio, as células podem redirecionar o piruvato gerado pelo processo de glicólise para a produção de lactato através da glicólise anaeróbica. Essa geração de lactato permite que a glicólise continue através da reciclagem de NADH para NAD^+ , porém resulta em uma produção mínima de ATP quando comparada com a fosforilação oxidativa. Em células tumorais, ocorre o efeito Warburg, que consiste na conversão da maior parte das moléculas de glicose em lactato, mesmo se o oxigênio é presente. Essa propriedade é compartilhada com células não-tumorais proliferativas. As mitocôndrias nesse caso continuam funcionais e algum nível de fosforilação oxidativa ainda ocorre em células tumorais. Fonte: Heiden et al, 2009

Porém, ao contrário do que Warburg acreditava, esse efeito não é resultante de mitocôndrias danificadas e conseqüentemente não funcionais em câncer (Liberti e Locasale, 2016). A reprogramação do metabolismo energético em células tumorais parece um processo contra-produtivo, uma vez que as células tem que compensar a baixa eficiência na produção de ATP resultante do processo de glicólise. Elas assim o fazem em parte através da regulação de transportadores de glicose, principalmente GLUT1, o que aumenta a captação de glicose para dentro do citoplasma da célula. Células tumorais chegam a consumir em média 10 vezes mais glicose do que células não tumorais e aumentam em 30 vezes os níveis de glicólise para suprir as suas necessidades bioenergéticas (Fu *et al.*, 2016). Já foi demonstrado que tumores como gliomas, meningiomas e sarcomas aumentam seus níveis de expressão de transportadores de glicose. Também é importante ressaltar que, como o microambiente tumoral possui disponibilidade limitada de glicose, pode haver uma competição por nutrientes com células não tumorais adjacentes (Chen *et al.*, 2015; Garcia-Heredia e Carnero, 2015).

Além do aumento na captação e utilização de glicose já ter sido documentado em diversos tipos tumorais, ele é também a base para a utilização da tomografia de emissão de pósitron (PET) para visualização de tumores. A técnica consiste em usar um análogo de glicose radio marcado (¹⁸F-fluorodeoxiglicose) como um indicador para mostrar a utilização exacerbada de glicose por tumores (Gatto e Nielsen, 2016).

A utilização de glicólise também já foi correlacionada com alguns oncogenes – como RAS e MYC – e com alguns genes supressores tumorais – como TP53 – cujas alterações em células tumorais foram selecionadas principalmente pelos benefícios que conferem na proliferação de células tumorais e na evasão de apoptose. Em tumores em situações de hipóxia, a glicólise se acentua. O sistema de resposta a condições hipóxicas regula positivamente os transportadores de glicose e diversas enzimas da via glicolítica. Logo, tanto a oncoproteína RAS quanto a hipóxia podem independentemente aumentar os níveis dos fatores de transcrição HIF1a e HIF2a, o que por sua vez regulam positivamente a glicólise (Hanahan e Weinberg, 2011). Recentemente, o oncogenes BRAF também emergiu como um regulador do processo de reprogramação metabólica, trazendo à tona a

importância da reprogramação metabólica na patogênese e tratamento de melanomas metastáticos (Smith *et al.*, 2016).

Células tumorais reprogramam todo o seu metabolismo a fim de promover o crescimento celular, sobrevivência celular, proliferação e manutenção da homeostase celular. Juntamente com o aumento de glicólise, células tumorais também sofrem outras alterações metabólicas, transformando suas mitocôndrias em máquinas de síntese de macromoléculas; ocorrendo conseqüentemente o aumento na síntese de ácidos graxos e aumento da metabolização de glutamina (Fu *et al.*, 2016; Liberti e Locasale, 2016). A glutaminólise aumentada fornece substratos para síntese de lipídeos e ácidos nucleicos, fundamentais para o fenótipo proliferativo de células tumorais (Li *et al.*, 2016).

Além disso, tumores também apresentam mutações em enzimas mitocondriais - como succinato desidrogenase - e outros componentes importantes na glicólise e no ciclo de Krebs, o que leva à um aumento no fluxo em direção à vias de biossíntese e produção de NADPH. Em células não tumorais altamente proliferativas também já foi demonstrado ocorrer o efeito Warburg, aumentando os níveis de glicólise e diminuindo a OXPHOS (Pokorný *et al.*, 2015; Barrera *et al.*, 2016).

Até muito recentemente, não era claro se as alterações metabólicas sofridas em células tumorais eram apenas um espectador ou se tinham um papel central na patogênese tumoral, porém estudos farmacológicos e genéticos já demonstraram conclusivamente que o efeito Warburg é necessário para o crescimento tumoral (Chen *et al.*, 2015; Courtney *et al.*, 2015; Gatto e Nielsen, 2016). O efeito Warburg tem sido então estudado extensamente nos últimos 10 anos (Liberti e Locasale, 2016). Considerando-se a importância da reprogramação do metabolismo para a manutenção da massa tumoral através do balanço entre suas necessidades biosintéticas e bioenergéticas, Hanahan e Weinberg adicionaram em 2011 a reprogramação metabólica como um *hallmark* emergente do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011) (**Figura 2**).

Os autores chegam a cogitar que a glicólise aeróbica possa ser simplesmente outro fenótipo programado por oncogenes que induzem proliferação celular. Porém, mutações de ganho de função na enzima isocitrato desidrogenase ½ (DIH) já foram relatadas em gliomas e outros tumores (Yen *et al.*,

2010); e apesar de essas mutações poderem ter sido selecionadas pela sua habilidade de alterar o metabolismo energético, há dados que associam sua atividade com oxidação elevada e estabilidade dos fatores de transcrição HIF-1, o que pode afetar a estabilidade genômica e a capacidade de invasão do tumor (Reitman e Yan, 2010).

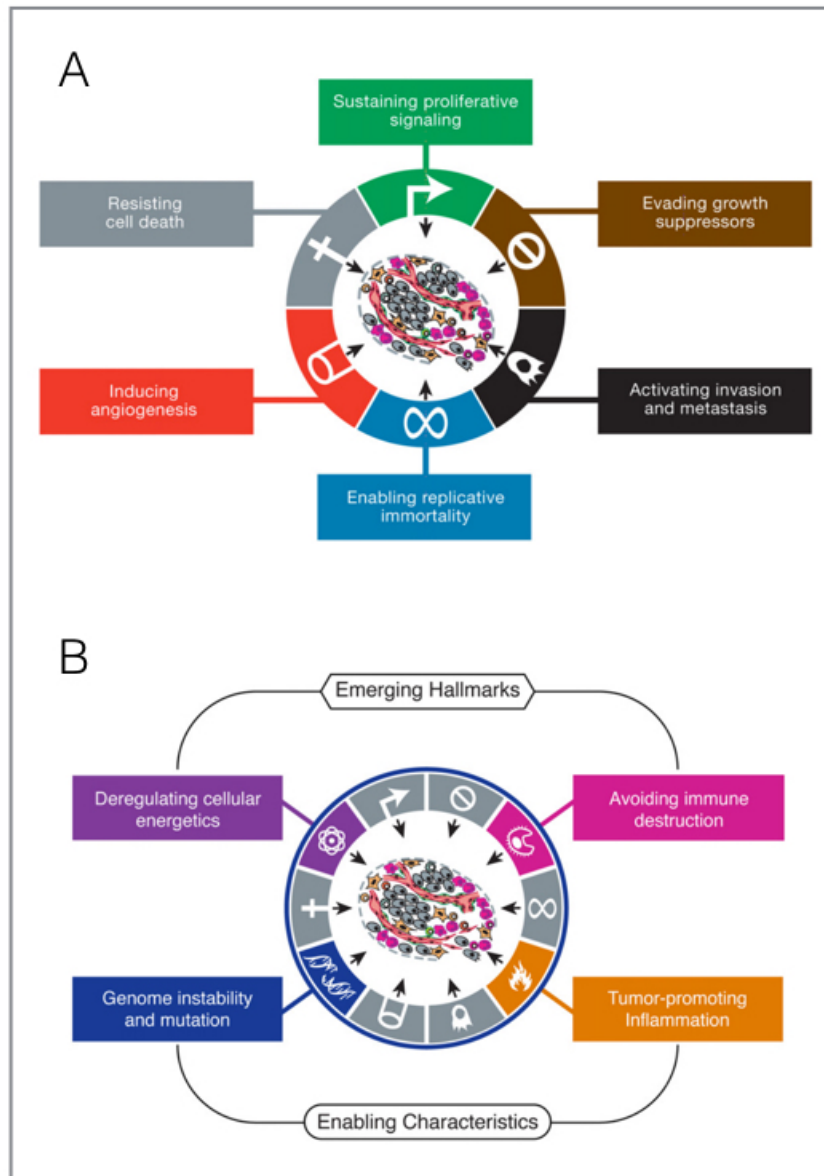


Figura 2:. Esquema representando os hallmark originais e emergentes do câncer, assim como papel do metabolismo tumoral. A) Hallmarks originais propostos por estarem envolvidos na patogênese tumoral. B) Novos hallmarks. Um envolve a capacidade de reprogramar o metabolismo tumoral para mais efetivamente ajudar na proliferação tumoral. O segundo permite que células tumorais consigam evadir a destruição imunológica, especialmente por linfócitos T e B, macrófagos e células NK. Como nenhuma dessas características é generalizada para todos os tipos de câncer e nem validadas, elas são chamadas de hallmarks emergentes. Adicionalmente, duas características que são consequência da neoplasia facilitam a aquisição dos hallmarks emergentes. A instabilidade genômica e a mutabilidade dão à células tumorais alterações genéticas que permitem a progressão tumoral. Fonte: Hanahan e Weinberg 2011.

1.3 Reprogramação do metabolismo em glioblastoma

Assim como em outros tipos de cânceres, a reprogramação metabólica é uma característica fundamental de glioblastoma multiforme (GBM), acomodando suas necessidades elevadas de nutrientes. GBM é um tumor maligno do sistema nervoso central, e sua natureza infiltrativa além da resistência adquirida a radio e quimioterapia são algumas das características desse tumor (Kennedy *et al.*, 2013). A média da sobrevivência dos pacientes com GBM em tratamento é de 12 a 15 meses (Clark *et al.*, 2016).

O quimioterápico de escolha para pacientes com GBM é o agente alquilante de via oral Temozolomida (TMZ). Uma grande limitação para essa terapia é a quimioresistência adquirida. Já se sabe que a atuação de TMZ é através da metilação do DNA nuclear e a formação de adutos no mesmo que bloqueiam o ciclo celular e induzem morte celular por apoptose. Além de indução de senescência, autofagia e catástrofe mitótica (Hirose *et al.*, 2005; Filippi-Chiela *et al.*, 2013).

A autofagia é um processo catabólico mediado pela incorporação de material celular em vesículas de membrana para degradação em lisossomos. É assim, um processo crucial para a manutenção da viabilidade e homeostase celular em resposta à inúmeras condições de estresse para a célula. A eliminação de substratos pela autofagia controla muitos aspectos fisiológicos da célula e o fracasso em eliminar substratos potencialmente perigosos (como mitocôndrias danificadas) pode levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e câncer. Além disso, essa degradação seletiva contribui para a reciclagem de nutrientes e sustentação do metabolismo celular. A via da autofagia e a sinalização de nutrientes se comunicam intimamente um com o outro. Um ponto central que coordena essa comunicação é o complexo proteína kinase sensível a nutrientes (mTORC1), que detecta os níveis de fatores de crescimento e aminoácidos (Settembre e Ballabio, 2014). Dados anteriores do nosso grupo demonstram que autofagia apresenta um *crossstalk* com morte celular, controle do ciclo celular e senescência após o tratamento com TMZ. E que, além disso, alterações no DNA nuclear (nDNA) também disparam autofagia que pode ter tanto um papel citoprotetor como citotóxico, dependendo do contexto. Foi demonstrado também que a modulação desse processo pode ser fundamental para um desfecho

terapêutico favorável (Filippi-Chiela *et al.*, 2013; Vessoni *et al.*, 2013; Filippi-Chiela *et al.*, 2015).

TMZ também atua no DNA mitocondrial (mtDNA), diminuindo o seu número de cópias e aumentando a presença de deleções nesse genoma. Como consequência, ocorre um remodelamento da cadeia transportadora de elétrons; logo, é possível que a quimioresistência adquirida à TMZ possa ser uma resposta adaptativa ao estresse genotóxico causado pelo tratamento (Oliva *et al.*, 2010). Portanto, uma reversão dessa resposta adaptativa pode restaurar a sensibilidade ao tratamento com TMZ, sendo uma estratégia que pode ser usada na clínica em pacientes com GBM.

Além disso, a mobilidade de células de GBM glicolíticas e sua consequente capacidade de invasão já foi correlacionada com a conversão de lactato em glicogênio, o que é dependente da ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). A via da PI3K em mamíferos tem um papel central na regulação da bioenergética em outros tipos de células malignas além de GBM, além de ser umas das vias mais mutadas nesse tipo de câncer. Portanto, também há interesses consideráveis no desenvolvimento de terapias que tenham como alvo a PI3K e vias de metabolismo em células tumorais (Kennedy *et al.*, 2013; Courtney *et al.*, 2015).

1.4 Inibidores metabólicos no tratamento de câncer

Devido à sua importância na manutenção do tumor, a reprogramação metabólica também tem emergindo como um possível novo alvo terapêutico em câncer, já que a perturbação dessa programação pode significativamente alterar a homeostase celular e ter efeitos deletérios sobre a viabilidade celular de células tumorais. Por exemplo, perturbações que reduzem o fluxo de glicólise resultam na diminuição da produção de ATP e diminuem a disponibilidade de intermediários para sintetizar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, necessários para o crescimento e divisão da célula tumoral (Clark *et al.*, 2016) **(Figura 3)**.

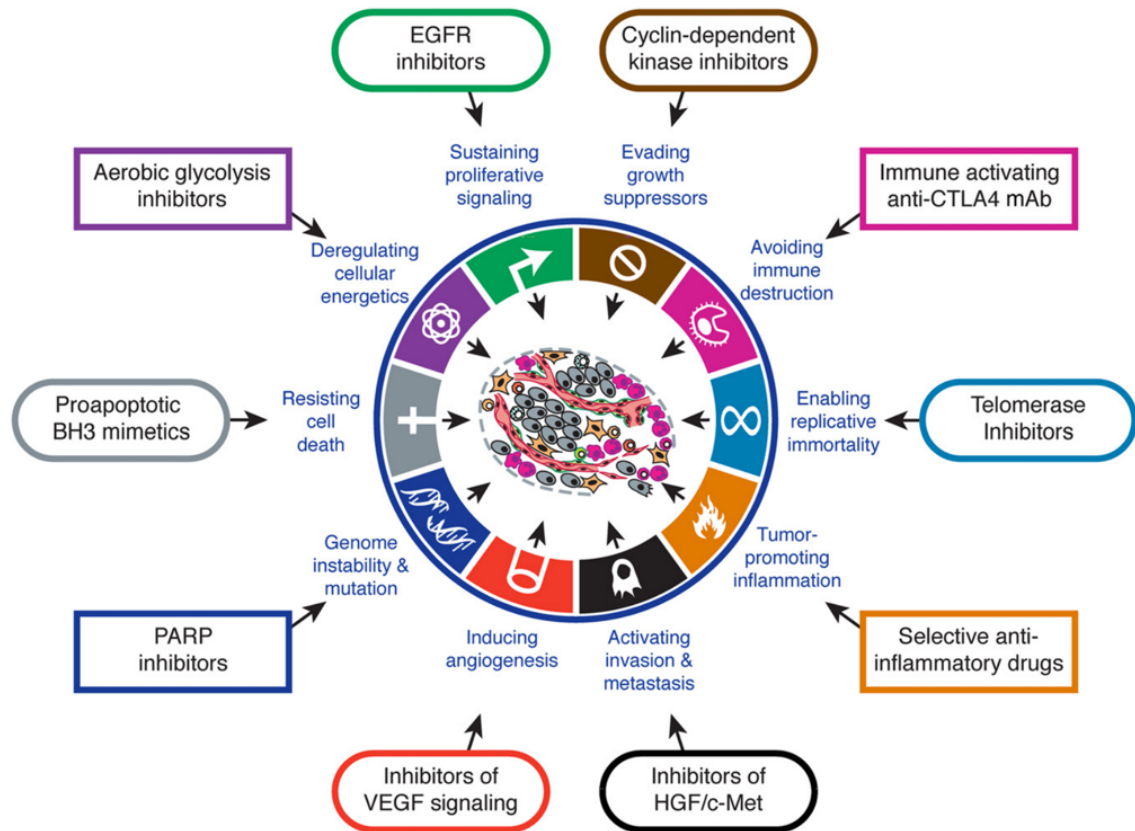


Figura 3: Alvos terapêuticos dos *hallmarks* do câncer. Drogas que interferem em cada uma das capacidades necessárias adquiridas para o crescimento e a progressão tumoral foram desenvolvidas e estão em ensaios clínicos ou então já foram aprovados para o uso clínico em alguns tipos de tumor. Além disso, têm-se investigado e desenvolvido drogas que possam atuar em cada um dos *hallmarks*, inclusive os emergentes. As drogas listadas na figura são exemplos ilustrativos, existe uma lista grande de drogas candidatas com diferentes alvos moleculares e diferentes modos de ação em desenvolvimento para a maioria dos *hallmarks*. Fonte: Hanahan e Weinberg 2011

Atualmente, alguns inibidores da glicólise estão em investigação pré-clínica e clínica e já foi demonstrado que a inibição de glicólise por análogos de glicose ou inibidores de transportadores de glicose é capaz de sensibilizar células tumorais, incluindo as resistentes a agentes quimioterápicos convencionais e tem efeito terapêutico sobre o crescimento tumoral (Cao *et al.*, 2007).

Além de já ter sido demonstrado um aumento na captação de glicose e utilização de glicólise em linhagens celulares de GBM, também já existem ensaios clínicos de fases I e II em pacientes com GBM. Esse ensaios demonstraram uma excelente tolerância para um tratamento combinado com o análogo de glicose e inibidor de glicólise 2-deoxiglicose (2-DG) e radioterapia hipofracionada sem qualquer toxicidade aguda. Além disso, nesses pacientes, cirurgias re-exploratórias mostraram extensiva necrose tumoral com preservação do tecido cerebral próximo ao tumor. *Trials* clínicos em fase III ainda estão em andamento, em estágios avançados (Prasanna *et al.*, 2009). Além disso, diversos estudos reportaram a habilidade de 2-DG em bloquear o crescimento de tumores em camundongos e de atuar em conjunto com radiação ou inibidores de histonas deacetilases para induzir apoptose em células de glioblastoma (Khaitan *et al.*, 2009).

A ativação da via de PI3K é conhecida por promover a glicólise aeróbica em GBM. Seguindo esse racional, um estudo de 2013 demonstrou que quando a via de PI3K está inibida ou quando a glicólise é inibida com 2-DG, células de glioblastoma têm sua migração suprimida. Além disso, foi descoberto que a inibição de OXPHOS por oligomicina – que age como inibidor da ATPase mitocondrial - não apresentou efeitos significativos na motilidade celular. Porém, quando usados em conjunto, oligomicina e 2-DG inibem a migração celular. Sabe-se que em tumores hipóxicos, o aumento na expressão de HIF1- α (hypoxia induced fator 1 alpha) promove a glicólise anaeróbica através da elevação nos níveis de captação de glicose e prevenindo que o piruvato entre no ciclo do TCA. Por isso, diferentes linhagens de tumores podem responder diferentemente à inibição de OXPHOS, dependendo se o tumor é mais ou menos hipóxico (Kennedy *et al.*, 2013).

Apesar do uso de inibidores de glicólise parecer promissor no tratamento de cânceres, há também preocupações sobre a influência desses inibidores sobre metabolismo glicolítico no cérebro e no coração, e seu efeito em cânceres com

pouca dependência em glicólise. Outras estratégias terapêuticas visando o metabolismo aberrante de células tumorais incluem a inibição de piruvato desidrogenase, inibição de lactato desidrogenase e perturbação da interação hexoquinase (HK)-VDAC. (Fulda *et al.*, 2010).

Já o dicloroacetato (DCA) age como um inibidor da piruvato quinase desidrogenase (PDK) e faz com que células mudem de glicólise aeróbica para fosforilação oxidativa. PDK é um regulador negativo da enzima mitocondrial piruvato desidrogenase (PDH) que regula o ciclo do TCA e a OXPHOS. Nesse caso, inativação do complexo PDH por PDK causa uma mudança no metabolismo tumoral em direção à glicólise. Porém, no seu estado ativado, o complexo PDH regula a entrada de piruvato na mitocôndria e catalisa sua transformação em acetil-coA, substrato do ciclo do TCA. DCA, por inibir a atividade de PDK, é capaz de estimular indiretamente a ativação de enzimas do complexo PDH e, portanto, causa uma mudança no balanço energético celular de glicólise para a ativação da OXPHOS. No caso de ativação da OXPHOS e decréscimo do uso de glicólise causados pela ação do DCA se pode esperar uma diminuição da proliferação celular tumoral e também uma maior geração de ROS através da mitocôndria, o que pode induzir apoptose. Além disso, levando-se em conta o fato de que DCA muda o metabolismo energético tumoral em direção à OXPHOS, pode-se esperar que hipóxia, por limitar a atividade da respiração celular, pode essencialmente aumentar esse efeito antitumoral (Michelakis *et al.*, 2010; Abildgaard *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015) (**Figura 4**).

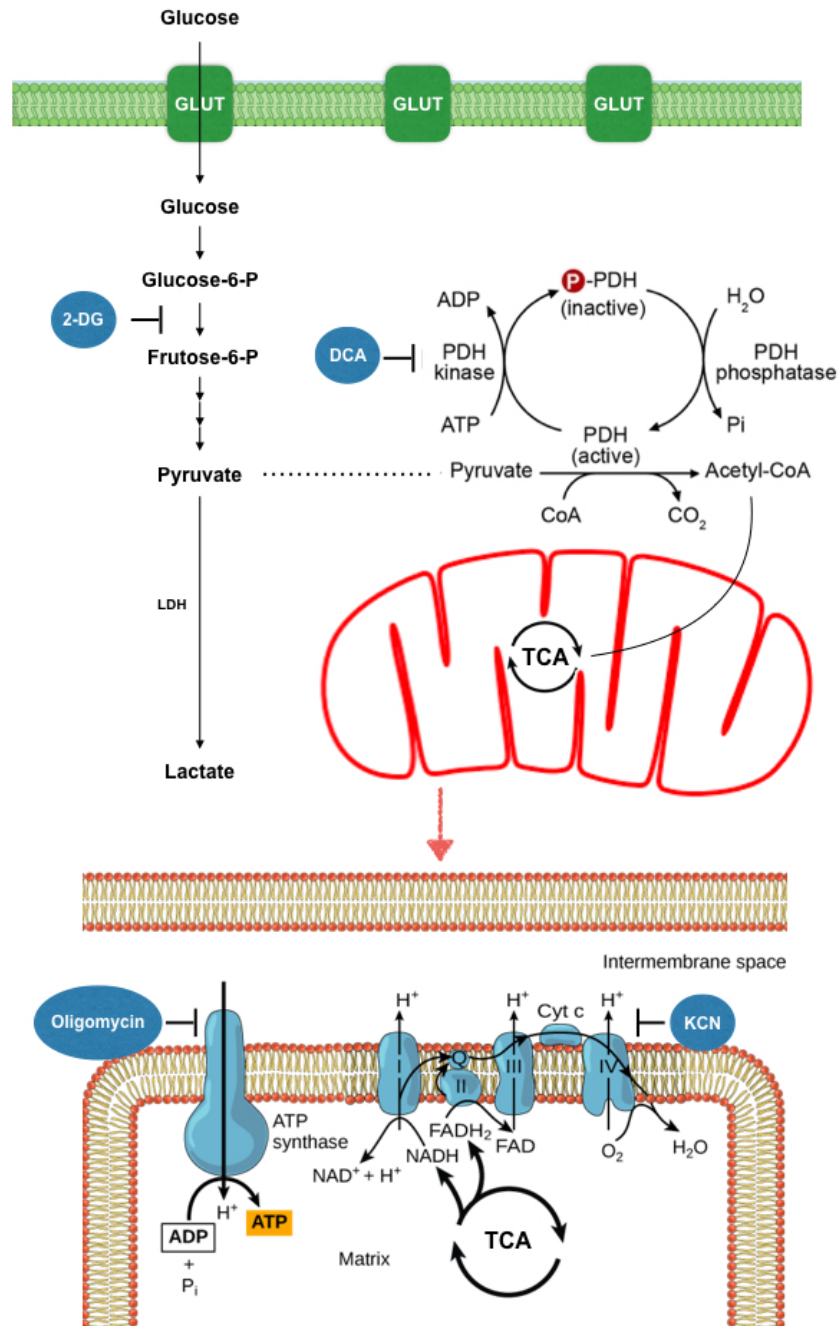


Figura 4: Resumo da ação de diferentes inibidores de glicólise e fosforilação oxidativa. 2-deoxi-d-glicose (2-DG) inibe a reação de transformação de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, fazendo com que haja uma inibição na glicólise. Já dicloroacetato (DCA) inibe a inativação da enzima piruvato desidrogenase (PDH), fazendo com que essa enzima esteja sempre ativa convertendo piruvato em acetil-coA; que vai então entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). DCA então “força” a célula a entrar em fosforilação oxidativa. Oligomicina inibe a ATP sintase na cadeia transportadora de elétrons (ETC), inibindo assim a fosforilação oxidativa. Já cianeto de potássio (KCN) é um inibidor da enzima citocromo c oxidase, no Complexo IV da ETC, prevenindo o

transporte de elétrons do citocromo c para a molécula de oxigênio, interrompendo assim a fosforilação oxidativa.

No tratamento de câncer, o mecanismo pelo qual DCA induz apoptose em células tumorais é via o aumento do fluxo de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons (ETC), resultando em uma grande despolarização do potencial de membrana mitocondrial, que geralmente é hiperpolarizado em células tumorais. Isso causa a liberação de citocromo c e ativação da apoptose. Já foi mostrado que DCA sensibiliza células tumorais à apoptose e aumenta o efeito antitumoral de diversos fármacos, incluindo cisplatina e metformina (Shen *et al.*, 2015).

Outro obstáculo para a utilização desses inibidores se baseia no fato de que em alguns tumores se tem achado duas subpopulações de células tumorais que diferem em suas vias de geração de energia. Uma subpopulação é a formada por células que se utilizam do efeito Warburg e que secretam lactato, enquanto a segunda subpopulação preferencialmente importa e usa o lactato produzido por células vizinhas como sua fonte principal de energia e utilizando parte do ciclo do TCA para fazer isso. Essas duas subpopulações evidentemente funcionam simbioticamente; as células tumorais hipóxicas dependem de glicose como combustível e secretam lactato como resíduo, que é então importado e preferencialmente usado como combustível para as células tumorais vizinhas melhor oxigenadas (Kennedy e Dewhirst, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar o perfil e o papel de alterações na rede mitocondrial e o metabolismo celular pós-quimioterapia em células de glioblastoma tratadas com Temozolomida.

2.2 Específicos:

Avaliar, em células de glioblastoma U87-MG,

- A massa mitocondrial pós-tratamento com TMZ em células da linhagem de glioblastoma U87-MG.
- Mudanças no MMP em células de glioblastoma tratadas com TMZ.
- Biogênese mitocondrial (através dos níveis de expressão de PGC1- α) e a possível degradação dessas organelas por autofagia.
- Outras alterações celulares resultantes das alterações na rede mitocondrial, como indução de apoptose e senescência, assim como produção de espécies reativas de oxigênio.
- O metabolismo celular de células de glioblastoma após o tratamento com TMZ.
- O efeito da modulação do metabolismo tumoral de células de glioblastoma através de inibidores de OXPHOS e glicólise após o tratamento com TMZ.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Nesse capítulo será apresentado o artigo científico resultante do trabalho desenvolvido durante o período do mestrado. Esse artigo está no formato do periódico “Plos One”, por isso a formatação desse capítulo está de acordo com as regras desse periódico. A discussão será feita com base nas figuras aqui apresentadas.

**MITOCHONDRIAL ALTERATIONS AND METABOLIC REPROGRAMMING IN
GLIOBLASTOMA CELLS TREATED WITH TEMOZOLOMIDE.**

Mardja Manssur Bueno e Silva¹; Ivi Juliana Bristot²; Eduardo Cremonese Filippi-
Chiela³; Fábio Klamt²; Guido Lenz^{1,4#}

¹Biophysics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Biochemistry Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

⁴Biotechnology Centre (CBiot), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Corresponding author

E-mail: lenz@ufrgs.br

ABSTRACT

Mitochondria play vital cellular functions. These organelles functions and roles in cellular metabolism not surprisingly have been implicated in a broad spectrum of diseases, including neurodegeneration and cancer. Lately, it has been given an important role for mitochondria and cellular metabolism in response and resistance of tumour cells to therapy. Given the central role of mitochondria in cellular homeostasis, we evaluated mitochondrial network alterations in glioblastoma cells in response to treatment with the chemotherapeutic Temozolomide (TMZ). The acute treatment with TMZ induced an increase in both mitochondrial mass and mitochondrial membrane potential (MMP) after 5 days of initial treatment, followed by a decrease in the same parameters on day 7. The increase in these parameters is accompanied by a decrease in PGC1a expression on day 3 and a progressive increase in autophagy levels, suggesting that the increase in mitochondrial mass is independent of PGC1a and may be due to an accumulation of mitochondria. Also, the increase in mitochondrial mass and MMP correlates with higher levels of ROS and senescence on Day 5. We also evaluated mitochondrial oxygen consumption in both control and treated with TMZ cells, observing that 5 days after treatment with TMZ, cells have higher oxygen consumption rates and a higher reserve capacity. In order to understand how mitochondrial alterations influence the response to chemotherapy, we treated the cells, previously treated with TMZ, on day 5 with glycolysis and oxidative phosphorylation inhibitors and followed cell number. Results suggest that these inhibitors abrogate TMZ-treated cells proliferation. Also, TMZ-treated cells are more sensitive to oxidative phosphorylation inhibition than control cells, suggesting that TMZ reprograms the cells metabolism to a more oxidative state instead of a glycolytic one.

INTRODUCTION

Mitochondria are organelles essential for the cell metabolism, regulation of apoptosis and cell signalling. These organelles are crucial for cell survival and are also involved in cell death (1). Mitochondria possess their own DNA, a double stranded circular molecule of approximately 16.5kb in size, containing genes responsible for coding proteins involved in the process of oxidative phosphorylation (OXPHOS). As the mtDNA has a reduced complement of DNA repair pathways, it is also more susceptible to damage caused by genotoxic agents (2). Considering that mitochondria perform both vital (energy metabolism) and lethal functions (cell death) in both physiological and pathological settings, it is no surprise these organelles are also implicated in tumour initiation and progression (3, 4). It has already been suggested that mitochondrial network appears to vary among individuals and tumours. Changes in mitochondrial mass are controlled both by changes in mitochondrial biogenesis and mitochondrial autophagy (also called mitophagy). Mitochondrial biogenesis is a process orchestrated by the transcription factor PGC1 α ; and both mitochondrial biogenesis and mitophagy are regulated in response to cellular stress, including the availability of nutrients and the redox state, as both are influenced by the activity of important oncogenes and tumour suppressor genes (4-6).

Glucose is the central energy source used for biosynthesis within the cell. In most tumour cells, even in the presence of oxygen, there is a reprogramming in cell metabolism, shifting towards glycolysis and fermentation into lactate, resulting in production of only two molecules of ATP per molecule of glucose used (7). This reprogramming is known as the Warburg effect, and recent pharmacological and genetic studies have demonstrated conclusively that this effect is necessary for tumour growth (8). Considering the importance of metabolic reprogramming to maintain the tumour mass through the balance between its biosynthetic and bioenergetics needs, it is currently considered as an emerging hallmark of cancer (9).

As in other types of cancers, metabolic reprogramming is a key feature in glioblastoma multiform (GBM), a malignant tumour of the central nervous system, which infiltrative nature and acquired chemoresistance are responsible for the

average survival of patients ranging from only 12 to 15 months (7, 10). The treatment for GBM consists in the resection of the tumour, followed by radiotherapy and chemotherapy with the oral alkylating agent Temozolomide (TMZ). However, a major limitation for the therapy is the acquired chemoresistance (10). It has already been shown that TMZ can act in the mtDNA, decreasing its copy number and increasing the deletions in its genome. As a result, there is a remodelling of the electrons transport chain (ETC). So it is possible that the chemoresistance acquired after TMZ treatment may be an adaptive response to the genotoxic stress caused by the chemotherapy (11). Therefore, studying this adaptive response and how to restore the sensitivity to chemotherapy could improve the average survival of patients with GBM.

Inhibition of glycolysis sensitizes tumour cells and abrogates their growth, including those resistant to conventional chemotherapeutic agents (12). One of this inhibitors is 2-deoxy-d-glucose (2-DG). This compound has already been tested in phase I and phase II clinical trials together with radiotherapy in GBM patients, showing excellent tolerance for a combined treatment without any acute toxicity (13). Dichloroacetate (DCA) acts as an inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) and causes cells to shift from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation (14-17). The mechanism by which DCA can induce cell death in tumour cells is via increased electrons flow through the ETC, resulting in extensive depolarization of the mitochondrial membrane potential. This causes the release of cytochrome c and the activation of apoptosis. DCA has already been shown to sensitize tumour cells to apoptosis and enhanced the antitumor effect of several drugs, including chemotherapeutics (18).

Given the central role of mitochondria in cellular homeostasis and implications in tumour initiation and progression, we evaluated mitochondria network alterations and cellular metabolism in GBM cells in response to treatment with TMZ.

RESULTS

1. TMZ induced a transitory increase in mitochondrial mass and MMP.

Mitochondrial dysfunctions have already been linked to tumour pathogenesis and response to therapy. Previous results of our group showed that acute treatment of GBM cells with TMZ for 3 h induces ROS production, transient autophagy and long-term cellular senescence (19). Therefore, in this study we aimed to elucidate if treatment with TMZ also induces mitochondrial alterations and changes in cell metabolism, and if they are correlated with our previous data.

After 3 h treatment with TMZ, cells were kept in Drug-Free Medium. Mitochondrial mass was evaluated on D3, D5 and D7 using the green fluorescent probe *Mitotracker* (Figure 1A). The stained cells were assessed for the green fluorescence intensity of the cell population to determine the total mitochondrial mass using flow cytometry. In cells treated with TMZ, mitochondrial mass doubled on D5 when compared to the control, but decreased by D7 (Figure 1B).

Another parameter evaluated was the MMP using the fluorescent probe *JC1*. In depolarized mitochondria, *JC1* is presented as a monomer with green fluorescence; as for viable/intact mitochondria, it aggregates inside the mitochondria emitting a red fluorescence. Therefore, mitochondrial depolarization is followed by a decrease in the red/green fluorescence ration, and this change in fluorescence can be measured by flow cytometry. We analyzed the two fluorescence emitted by this molecule (green and red) and determined the Red/Green Fluorescence Ratio to evaluate the MMP. Both control and cells treated with TMZ had an increase in the Red/Green Fluorescence Ratio by D5, with the cells treated with TMZ having an average ratio of 3 (2x higher than the control on D3). The ratio decreased in both groups by D7 (Figure 1C).

Figure 1: Bueno-Silva et al. 2016

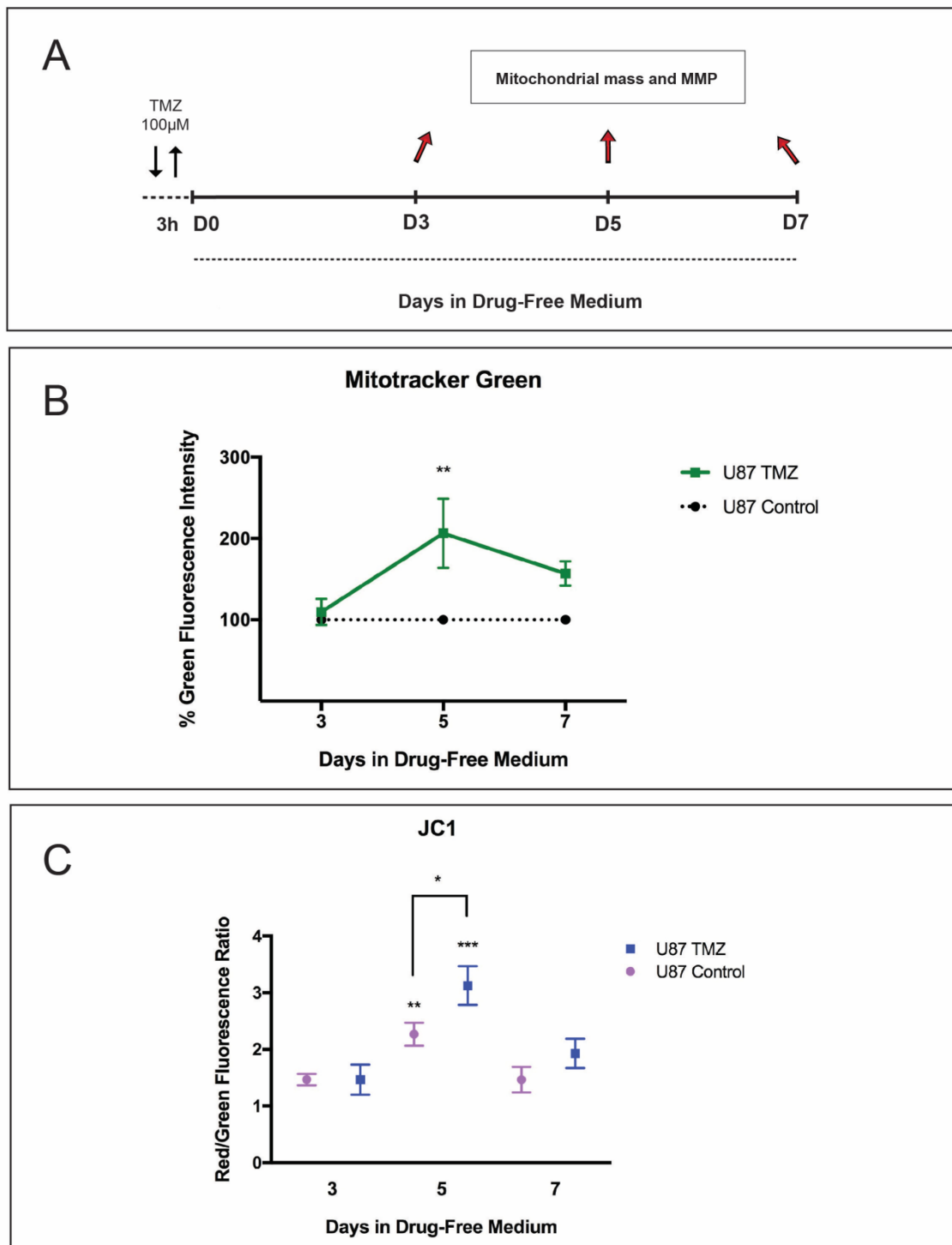


Figure 1: TMZ induced a transitory increase in mitochondrial mass and MMP in GBM cells. (A) Schematics of the experimental design. (B) Mitochondrial mass in cells control and treated with TMZ 100 μ M. The fraction of Green Fluorescence Intensity relative to the control was used to determine the total mitochondrial mass in the cell population. We analysed the differences between the groups using an ANOVA followed by a Dunnet test (comparing all the groups with the control on D3) (C) MMP in cells control and treated with TMZ 100 μ M. The Red/Green Fluorescence Ratio was used to determine the MMP in the cell population. We analysed the differences between the groups using an ANOVA followed by a Dunnet test

(comparing all the groups with the control on D3); and the differences between C 5D and TMZ 5D were compared using a t-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2. GBM cells treated with TMZ had increased levels of autophagy and decreased PGC1a expression.

PGC1a is a transcription factor responsible for mitochondrial biogenesis. As mitochondrial mass and MMP appeared both increased on D5, we hypothesized that PGC1a expression would be increased in this period. Also, as autophagy is the main cellular event responsible for the clearance of mitochondria, we tested if the decrease in mitochondrial mass and MMP on cells treated with TMZ on D7 was due to increase in autophagy levels (Figure 2A).

After measuring mRNA expression on D3 we surprisingly observed that the levels of PGC1a expression on TMZ-treated cells were actually decreased on that day (Figure 2B). We used Acridine Orange (AO) to assess the levels of autophagy in the cell population. This dye can emit in two fluorescent ranges: red and green. When AO crosses into lysosomes, as other acidic compartments (including autolysosomes), it becomes protonated and emits in the red range. As for AO not in an acidic compartment, it will emit in the green range. We then analyzed the Red/Green Fluorescence Intensity Ratio (R/GFIR) to determine the autophagy levels in the cell population. We observed a constant increase in the autophagy levels in cells treated with TMZ on D3, D5 and D7, reaching its peak on D7 (Figure 2C). These results suggest that higher mitochondrial mass and MMP on D5 may actually be due to an accumulation of mitochondria.

Figure 2: Bueno-Silva et al. 2016

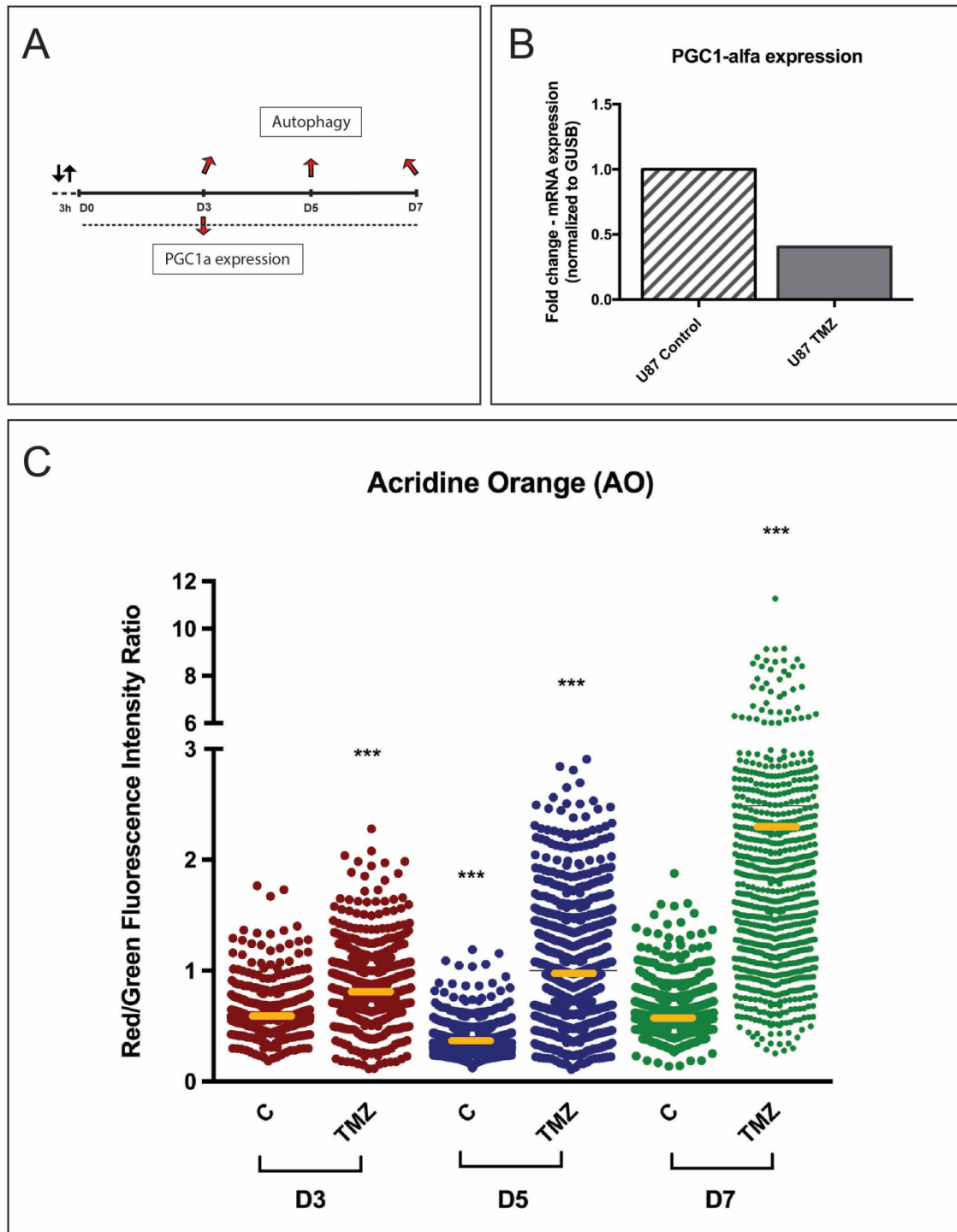


Figure 2: GBM cells treated with TMZ have increased levels of autophagy. (A) Schematics of the experimental design. (B) mRNA fold change expression of PGC1 α (normalized by GUSB) in control and TMZ treated cells on D3 (n=1). (C) Autophagy levels measured by R/GFIR in cells control and treated with TMZ 100 μ M. We analysed the differences between the groups using an ANOVA followed by a Dunnet test (comparing all the groups with the control on D3). * p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001.

3. TMZ induced cell death, senescence and ROS production.

We also determined the population levels of senescence, apoptosis and ROS production in response to TMZ 100 μ M. Apoptosis levels appeared to be slightly higher in cells treated with TMZ on D3 (8.31%) than on D5 (3.67%). This suggests TMZ induced cell death in the short-term (Figure 3A).

To evaluate the induction of senescence, we assessed the green fluorescence intensity of the C12FDG probe as an evidence of senescence in the cell population. We also used the same rationale for ROS using the probe DCFH. TMZ induced a statistically significant increase in senescence levels (27.89% of C12FDG positive cells) and ROS (21.52% of DCFH positive cells) on D5 (Figure 3B and 3C).

Figure 3: Bueno-Silva et al. 2016

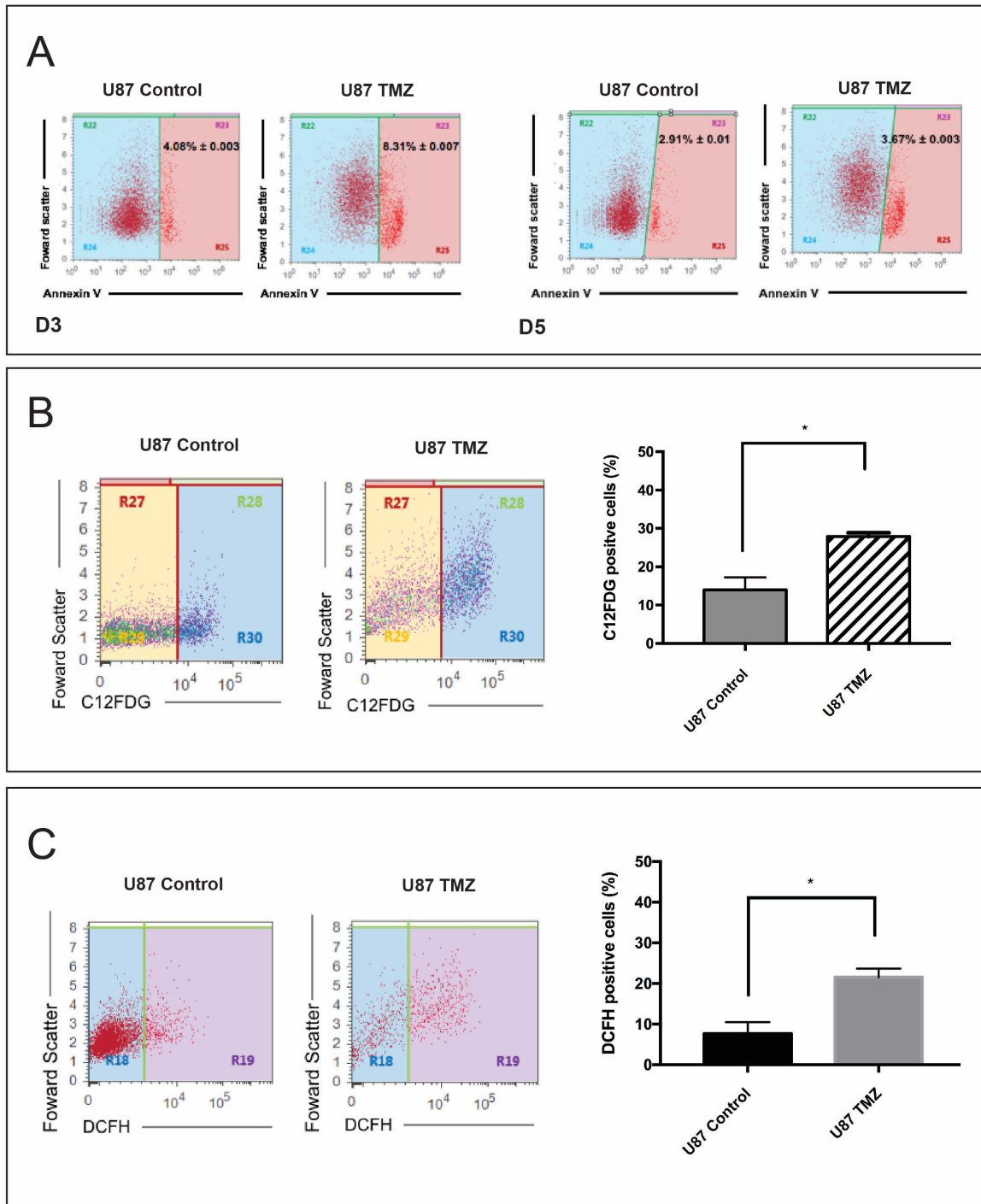


Figure 3: TMZ treatment induced cell death on D3; and senescence and ROS production on D5. Control cells and cells treated with TMZ 100 μ M were assessed for (A) apoptosis levels, (B) senescence levels and (C) oxidative stress * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. Higher mitochondrial mass is associated with senescence and ROS.

Next, we evaluated the co-staining of *Mitotracker Red* with DCFH or C12FDG (both with green fluorescence) on day 5 (Figure 4A). In both cases we demarked two areas on the Count x Red fluorescence (mitochondrial mass) graph. The first represents the lower red fluorescence intensity (i.e. reduced mitochondrial mass), and the second is the higher red fluorescence intensity (i.e. increased mitochondrial mass). For each segment of the Count x Red Fluorescence graph we analyzed the Green Fluorescence Intensity (DCFH or C12FDG), trying to elucidate if the increase in mitochondrial mass correlates with increased senescence and ROS levels.

In the *Mitotracker Red* x DCFH co-staining we observed that the second segment (increase red fluorescence and therefore higher mitochondrial mass) had higher green fluorescence intensity (DCFH) and the first segment (lower mitochondrial mass) had lower green fluorescence intensity. This is true for both control cells and cells treated with TMZ (Figure 4B). Therefore, we correlated the increased mitochondrial mass with increased ROS production. The green fluorescence in the high mitochondrial mass also increased after treatment with TMZ, confirming the previous result when we showed that TMZ induced ROS on D5.

As for the *Mitotracker Red* x C12FDG co-staining, it is also possible to correlate the levels of cellular senescence with mitochondrial mass. The segment of the graph that represents the higher mitochondrial mass had higher green fluorescence intensity in both control and TMZ treated cells (Figure 4C). These results suggest that cells with higher mitochondrial content also have higher levels of oxidative stress and present markers of senescence.

Figure 4: Bueno-Silva et al. 2016

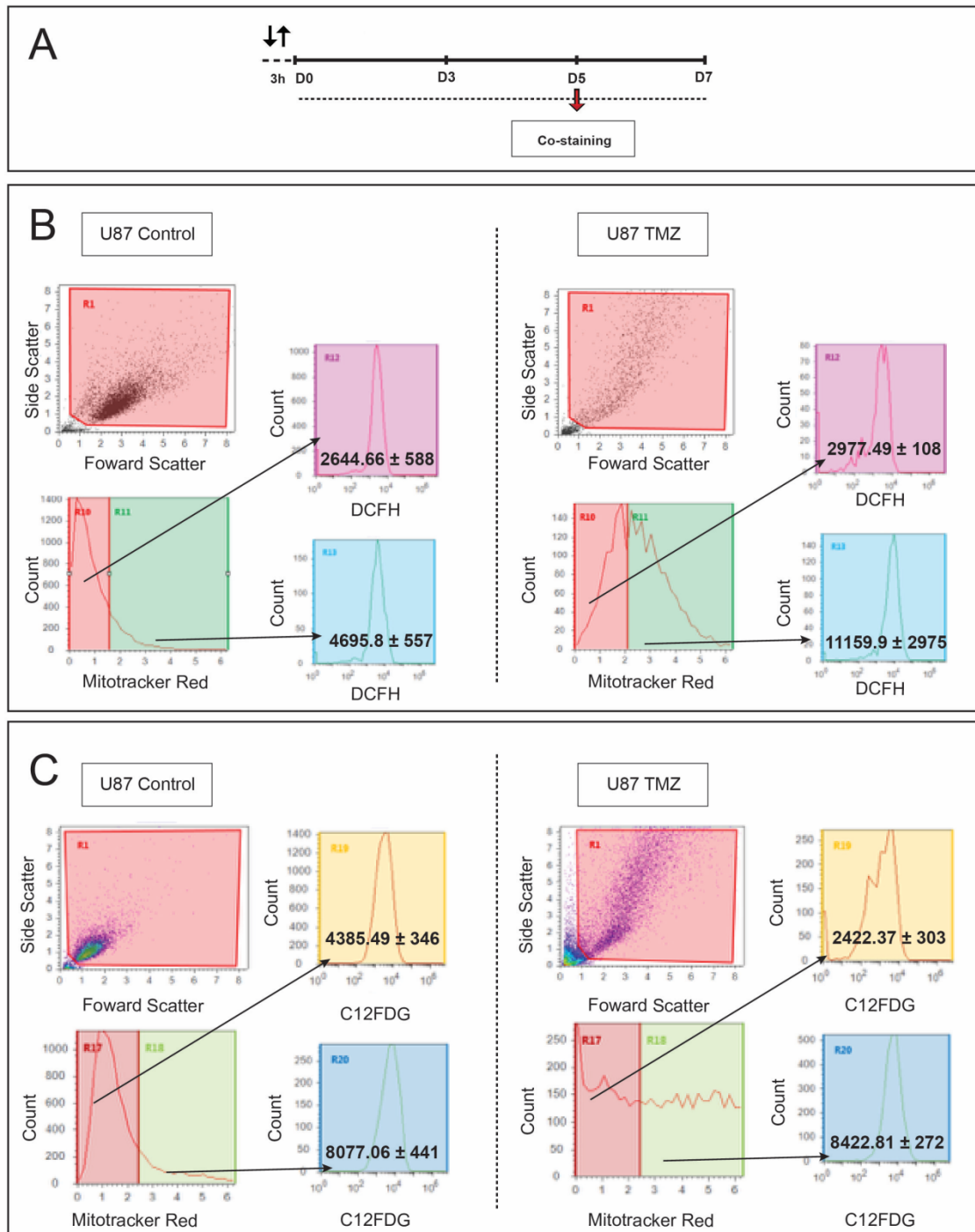


Figure 4: Higher mitochondrial mass is associated with senescence and ROS. (A) Schematics of the experimental design. (B) Co-staining of Mitotracker Red with DCFH. (C) Co-staining of Mitotracker Red and C12FDG.

5. Cells treated with TMZ had higher mitochondrial oxygen consumption and higher spare reserve capacity.

With the transitory increase of mitochondria mass and MMP in mind, we performed an assay to evaluate the mitochondrial oxygen consumption both in control and TMZ treated cells on D5, which corresponds to the peak of mitochondria mass and MMP (Figure 5A). For that, we used the high-resolution respirometry (HRR) Oxygraph-2k, which allows the analysis of oxygen kinetics during cellular respiration. We then evaluated several bioenergetics parameters, such as the Routine, the Leak, the Maximal and the extra-mitochondrial (ROX) respirations. Based on these parameters we could also infer the respiration linked to ATP production and the spare reserve capacity, as summarized in Figure 5B. We observed that all parameters were higher in TMZ-treated cells when compared to the control (Figures 5C and 5D), with the cell treated with TMZ having 3x the reserve capacity of the control cells and more than 2x the maximal respiration and extra-mitochondrial respiration (Figure 5D).

We used the uncoupler FCCP to provide a measure of the kinetic capacity of the electron transport system (ETS). Using the ETS capacity as a basis for normalization of coupling control ratios, we analyzed the level of mitochondrial activity relative to the maximal kinetic capacity of the ETS. We then inferred the LEAK, LINKED TO ATP PRODUCTION, RESERVE CAPACITY and ROX measures relative to the ETS capacity – which is a parameter called flux control ratio (FCR). We observed that TMZ treated cells have lower leak and linked to ATP production respirations, and higher spare reserve capacity (Figure 5E). Altogether, these data suggest that TMZ-treated cells had their metabolism altered to a more oxidative state instead of a glycolytic one.

Figure 5: Bueno-Silva et al. 2016

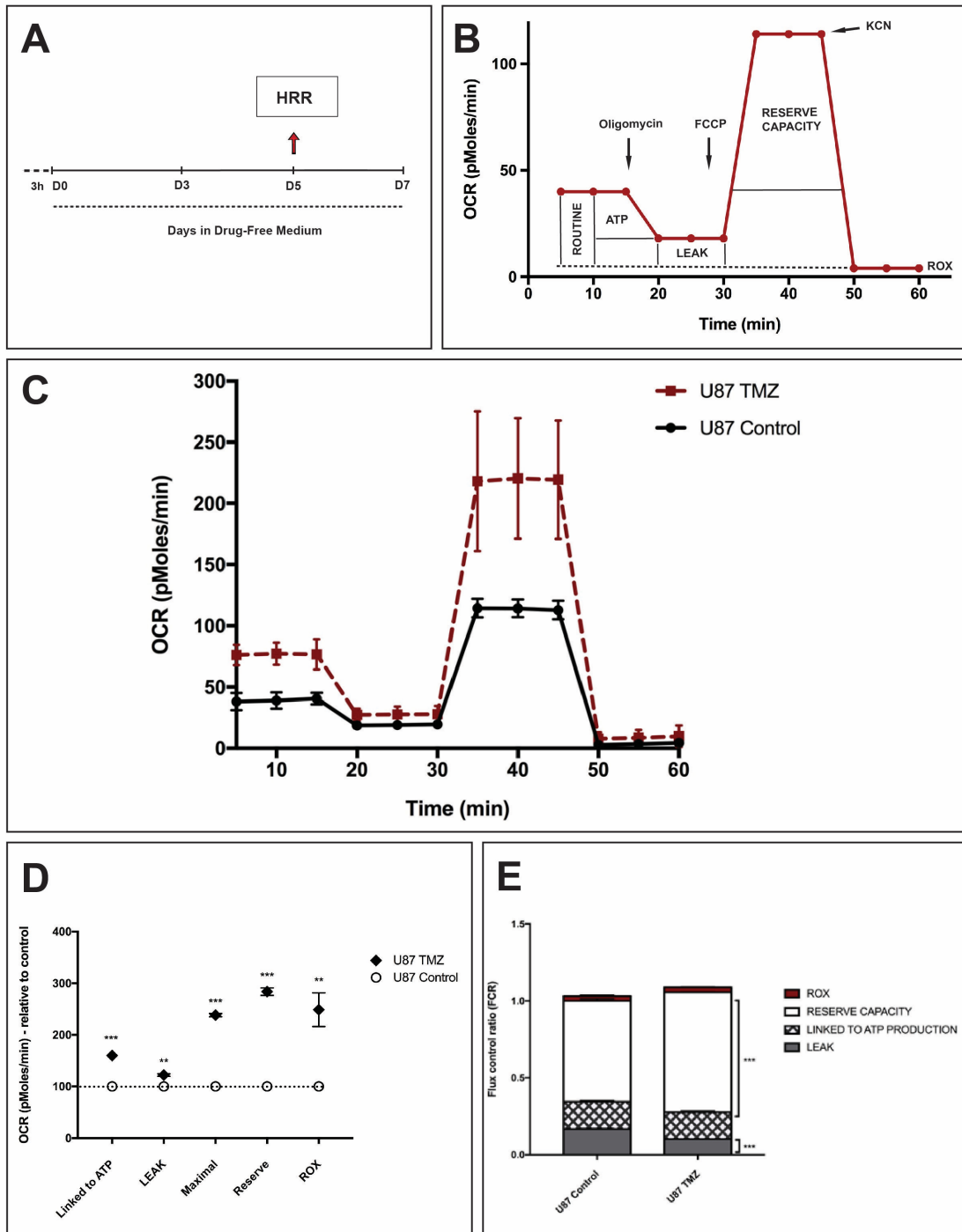


Figure 5: Cells treated with TMZ had higher mitochondrial oxygen consumption rates. (A) Schematics of the experimental design. (B) Schematics of a high-resolution respirometry and the parameters evaluated. (C) OCR of control and TMZ treated cells. (D) OCR with the average and SD of all the parameters evaluated in control and TMZ treated cells. (E) FCR in control and TMZ treated cells. Differences were analyzed using a t-test. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$.

6. Modulation of glycolysis decreased cell number in GBM cells previously treated with TMZ.

As GBMs have been described as glycolytic tumours, we decided to assess the cell number in U87-MG after the modulation of glycolysis with the inhibitors 2-DG and DCA. To assess cell number we treated control cells and cells previously treated with TMZ 100 μ M on D5 with DCA (10 mM and 20 mM) and 2-DG (0.8mM, 1.6 mM and 4 mM). We then analyzed the cell number via a Cumulative Population Doubling (CPD) assay. The number of cells was determined on D3, D5, D7, D10 and D14 and the sum of the PDs was plotted versus time in culture (Figure 6A).

2-DG at 4 mM had an effect abrogating cell proliferation on control cells by D10. As for the TMZ treated cells, DCA 20 mM slightly increased the cell proliferation on the first 48 h followed by a decrease. DCA 10 mM, 2-DG 0.8 mM, 2-DG 1.6 mM and 2-DG 4m M decreased the cell number in the first 5 days (Figure 6B).

Figure 6: Bueno-Silva et al. 2016

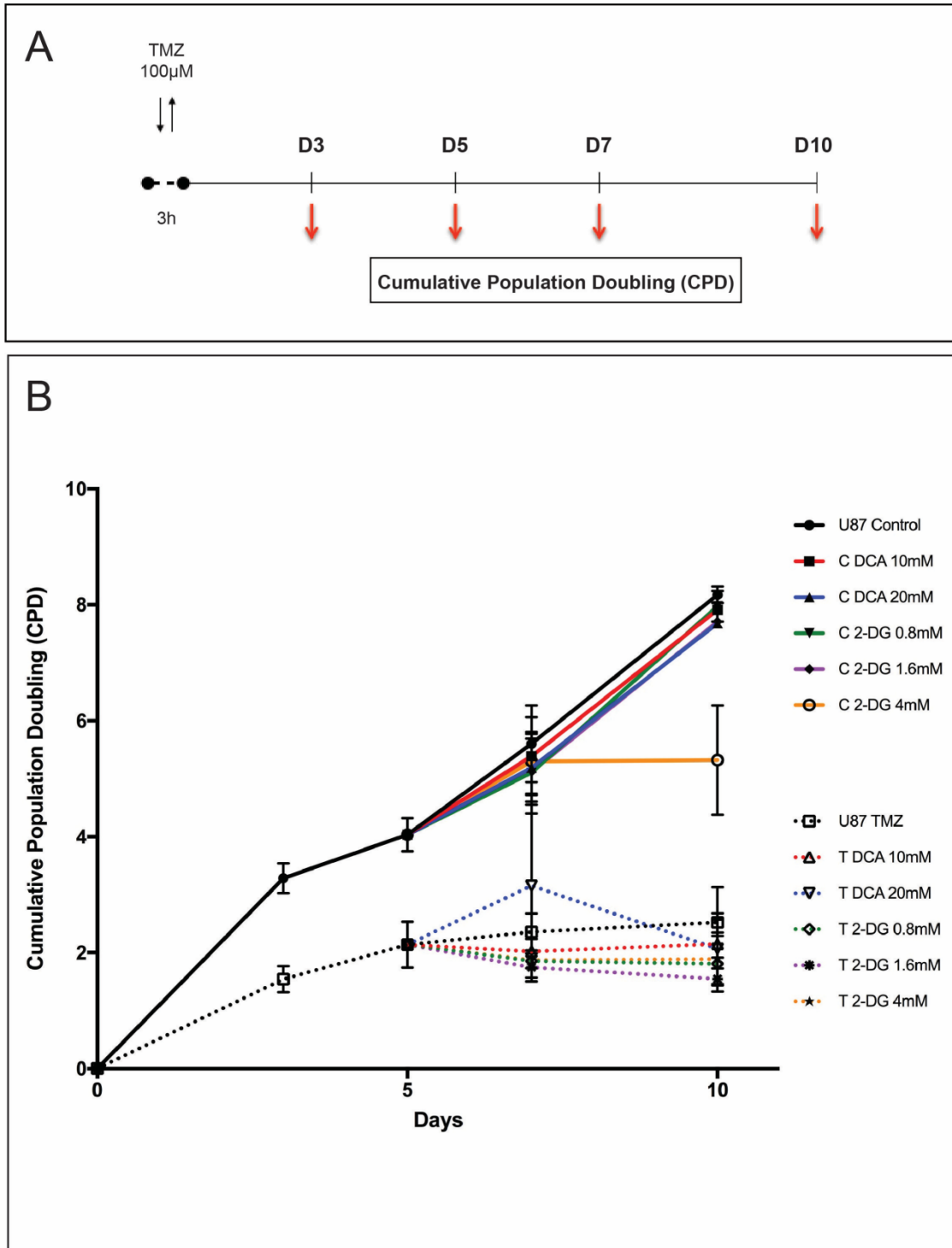


Figure 6: Modulation of glycolysis decreased cell proliferation in GBM cell previously treated with TMZ. (A) Schematics of the experimental design. (B) Cumulative Population Doubling (CPD) in control and TMZ treated cells, with or without glycolysis inhibitors.

7. TMZ-treated cells were more sensitive to OXPHOS inhibition than control cells.

As we observed higher mitochondrial oxygen consumption and higher spare reserve capacity on cells treated with TMZ on D5, we decided to test if the modulation of OXPHOS with KCN and oligomycin would have an effect on cell number. For the treatment with KCN we first calculated the dose needed to obtain half of the cellular spare reserve capacity in control and TMZ treated cells (137 μ M and 40 μ M respectively – data not shown). We used oligomycin at 0.1 μ g/mL as previously shown in the literature (10). We also evaluated cell number in the presence of combination of OXPHOS and glycolysis inhibitors. We then analyzed the cell number via a Cumulative Population Doubling (CPD) assay. The number of cells was determined on D3, D5, D7, D10 and D14 and the sum of the PDs was plotted versus time in culture.

We first observed that KCN had a higher effect on abrogating cell proliferation on TMZ-treated cells than in control cells, as KCN in control cells practically did not change cell proliferation. Oligomycin abrogated cell proliferation of control cells on D7, and had the lowest rate of cell proliferation on TMZ-treated cells (Figure 7A).

As for the combination of drugs, KCN + 2-DG 4 mM had a significant decrease in cell proliferation already on control cells, which did not happen for the combination of KCN with lower 2-DG concentrations. In TMZ-treated cells, oligomycin + 2-DG 4 mM completely stopped cell proliferation by D7. As for Oligo + DCA 20 mM, Oligo + 2-DG 1.6 mM, KCN + DCA 20 mM, KCN + 2-DG 1.6 mM and KCN + 2-DG 4 mM; they all seem to abrogate cell proliferation on D10, with KCN+DCA 20 mM having the strongest effect (Figure 7B).

Figure 7: Bueno-Silva et al. 2016

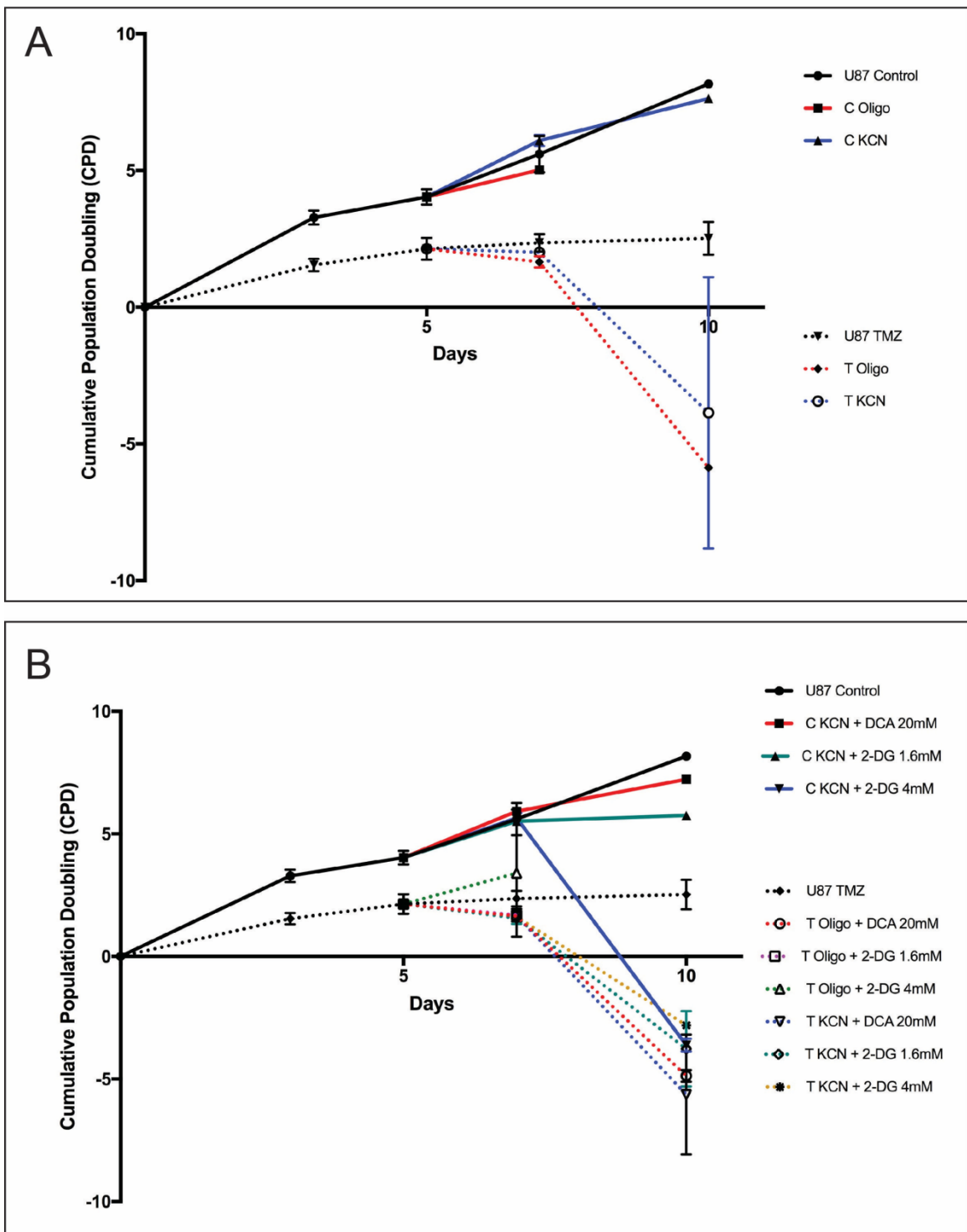


Figure 7: TMZ-treated cells were more sensitive to OXPHOS inhibition than control cells. (A) Cumulative Population Doubling (CPD) in control and TMZ treated cells, with or without OXPHOS inhibitors. (B) Cumulative Population Doubling (CPD) of combination of OXPHOS and glycolysis inhibitors.

DISCUSSION

We observed that acute treatment with TMZ (3 h) induces a transient increase in mitochondrial mass and MMP. For cellular homeostasis to be maintained, it is important to have a balance between mitochondrial biogenesis and degradation. PGC1a is a co transcriptional activator that interacts with and activates transcription factors responsible for the synthesis of new mitochondria, and can be induced by oxidative stress (20, 21). Mitochondria degradation is controlled by mitophagy, a cellular process dependent on the PINK1/Parkin pathway. The serine/threonine kinase PINK1 communicates the collapse of MMP to Parkin. The PINK1/Parkin pathway then disrupts movement of damaged mitochondria in cells, separating them from healthy mitochondria and directing them to mitophagy (22). TMZ appears to increase autophagy levels, but not PGC1a expression – that is in fact decreased by D3. This indicates an accumulation of non-degraded mitochondria, which can be explained by the fact that we also observed a higher MMP on D5 after TMZ treatment. Also, TMZ induces an increase in DCFH and C12FDG positive cells on D5. C12FDG is a substrate for the enzyme beta-galactosidase, which is overexpressed in senescent cells; therefore we can observe an increase in senescent cells after treatment with TMZ. Senescent cells also appear to increase in size; and this increase has already been pointed as a signal to produce new organelles, including mitochondria (23). This can explain the correlation of increased mitochondrial mass and increased senescence levels observed with the co-staining of *Mitotracker Red* and C12FDG on D5.

When analysing the oxygen consumption rate (OCR) by HRR, we could observe that TMZ-treated cells have increased oxygen consumption in all parameters analysed. The maximal respiration measures the electron transfer system (ETS) capacity, which transfers electrons from externally supplied reduced substrates to oxygen. In a recent study, the higher activity in the mitochondrial ETS has been correlated with the maintenance of melanomas and the resistant phenotype to multiple drugs (24), but to our knowledge there is no data in the literature correlating maximal respiration in GBM to chemoresistance. TMZ-treated cells also have a higher ROX respiration. Many enzymes that consume oxygen and have auto-oxidation reactions can contribute to ROX, including

peroxidase and oxidase activities, which partially contribute to ROS production (25). This could also explain why we could observe an increase in DCFH positive cells on D5 after TMZ treatment.

Spare respiratory capacity (SRC) is the extra capacity available in cells to produce energy in response to increased stress and as such is associated with cell survival (26, 27). A study also postulated a strong correlation between enhanced SRC and death-resistance. To be able to escape or resist apoptosis has been shown to be required for highly proliferative cells, establishing a connection between altered bioenergetics and tumour aggressive phenotype (28). This increase in SRC has already been demonstrated in neuroblastoma cells treated with retinoic acid (29) and it is hypothesized that the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway is required for bioenergetics changes in the mitochondria that may lead to an increase in SRC (30). Overall, our study also demonstrated that TMZ reduces the dependence of GBM cells to glycolysis, as they have higher OCR and by the fact that TMZ-treated cells are more sensitive to OXPHOS inhibitors than glycolysis inhibitors. A more oxidative state has already been observed in pancreatic, colorectal and gastric cancer cells after chemotherapy, showing that this response may be correlated with chemoresistance in different types of cancer (31-33).

Even though studies have made progress towards understanding GBM biology through genetic and protein expression analyses, little is known about the metabolic changes that might promote its aggressive phenotype. It is known that TMZ causes a remodelling of the ETC and that chemoresistance is probably an adaptive response to the genotoxic stress caused by chemotherapy (11). In this study we showed that the adaptive response after the treatment with TMZ consists in changes in the mitochondrial network that leads to higher OCR and higher SRC. Therefore, a rational modulation of these processes may emerge as a promising potential to be tested in therapy in an attempt to overcome tumour resistance.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and treatments.

For the present study we used the cell line U87-MG (ATCC) derived from human GBM. The cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and maintained in an incubator at 37°C and 5% CO₂. This cell line was used to assess mitochondrial and metabolic alterations induced by the chemotherapeutic Temozolomide (Sigma-Aldrich, #T2577). To this end, 15.000 cells were plated 24 h before treatment, which consisted of 3 hours with TMZ 100 µM. After treatment, the cells were cultured in drug-free medium. Analyses of mitochondrial mass and membrane polarization were performed 3, 5 and 7 days after the treatment.

Assay to measure mitochondrial mass using the fluorescent molecule *Mitotracker* in GBM cells.

The fluorescent probe *Mitotracker Green FM* (Molecular Probes, #M7514) is retained inside the mitochondria, regardless of its functionality. Thus, we used a GUAVA EasyCyte flow cytometer to assess the total amount of mitochondria in a given cell population. For this, cells were labeled with the fluorescent probe Mitotracker Green FM at the concentration of 200 nM for 20 minutes at 37°C and 5% CO₂. The mitochondrial mass of the cell population was measured on D3, D5 and D7.

Assay to measure mitochondrial membrane potential using the fluorescent molecule *JC1* in GBM cells.

The fluorescent molecule *JC1* (Molecular Probes, #T3168) is used to monitor the mitochondrial membrane potential (MMP), which changes in damaged mitochondria. In this paper, we analyzed the red/green ratio of the *JC1* molecule in cells treated with TMZ, trying to assess the effect of chemotherapy on mitochondrial functionality. The cells were labeled with *JC1* 2 µM for 20 min at 37°C and 5% CO₂ and the analysis performed by flow cytometry. MMP of the cell population was measured on D3, D5 and D7.

Co-staining of *Mitotracker Red FM* with 5-dodecanoylamino fluorescein di-beta-D-galactopyranoside (C12FDG).

Senescence is the irreversible stop in cell proliferation, which can be induced in cells exposed to stress. Senescent cells show phenotypic and metabolic abnormalities, among which we highlight the increased expression of the enzyme beta-galactosidase (beta-gal) and increased cellular and nuclear areas in culture. To assess cellular senescence, we used the staining with the substrate of the beta-galactosidase enzyme C12FDG (Life Technologies, #D-2893), which has a green fluorescence when cleaved by the beta-gal enzyme. To evaluate if there was a correlation between mitochondria mass and senescence, we co-stained the cells with C12FDG and Mitotracker Red FM (Molecular Probes, #M22425). For this, cells were incubated with C12FDG for 2 hours at the concentration of 33 μ M. Remaining 20 minutes for the end of incubation we also added Mitotracker Red FM 200 nM. The analyses were made by flow cytometry. Analyses of mitochondrial mass and levels of senescence were performed on D5.

Co-staining of *Mitotracker Red FM* with *Annexin V*.

In viable cells, phosphatidylserine (PS) is located on the cytoplasmic surface of the cell membrane. But in the intermediate stages of apoptosis, PS is translocated to the outer leaflet of the membrane, exposing PS to the external cellular environment, where it can be detected. Annexin V (Sigma-Aldrich, #APOAF) has a green fluorescence when staining the externalization of PS. To evaluate a possible correlation between mitochondrial mass and apoptosis, we co-stained the cells with Annexin V and Mitotracker Red FM. Cells were incubated with 2.5 μ M of Annexin V per sample and Mitotracker 200 nM for 20 min at 37°C and 5% CO₂. We analysed by flow cytometry. Analyses of mitochondrial mass and levels of apoptosis were performed on D5.

Co-staining of *Mitotracker Red FM* with dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA).

Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) is a fluorimetric probe with green fluorescence used in assays to detect oxidative species. Cells were incubate

with DCFH-DA 10 μ M and Mitotracker Red FM for 20 min at 37°C and 5% CO₂. The data was analysed by flow cytometry. Analyses of mitochondrial mass and oxidative stress were performed on D5.

RT-PCR to analyze mitochondrial biogenesis.

Cells were treated for 3 h with TMZ as previously described. Total RNA was extracted using Tryzol. cDNA was synthesized using Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA). PGC1a expression was measured using Eco Real-Time PCR System (Illumina). Primers designed for PGC1a: CACTCTCAGTAAGGGGCTGG (forward) and CCAGAGCAGCACACTCGAT (reverse). Expression was normalized to GUSB. Primers designed for GUSB: GGAGGTACTTCAGCTCTGTGAC (forward) and TGCCGAAGTGACTCGTTGCCAA (reverse). We used a calibration curve based on $\Delta\Delta$ CT values.

Assess of the autophagy levels in GBM after treatment with TMZ using acridine orange (AO).

Cells were collected by trypsinization, stained with Acridine Orange (AO) 2.7 μ M for 15 min at room temperature and analyzed on a GUAVA EasyCyte flow cytometer using InCyte 2.6 software (Guava Technologies). We analyzed the Red/Green Fluorescence Intensity Ratio (R/GFIR) to assess the levels of autophagy, and performed the analyses on D3, D5 and D7.

High Resolution Respirometry to analyse the mitochondrial oxygen consumption in cells treated with TMZ.

Mitochondrial oxygen consumption assays were performed using the high-resolution respirometry system Oxygraph-2 k (Oroboros Instruments, Austria). Cell respiration was measured at the density of 1.5×10^6 for the control cells and 1×10^6 for the treated cells. The assay was made at 37°C in 2mL chambers containing culture medium (DMEM) at stirring rate of 750 rpm. The respiration rate was recorded continuously along the entire oxygen range. We determined several bioenergetics parameters that characterize the cellular state of aerobic energy production. ROUTINE respiration (R) was measured in the coupled state of physiological respiratory control. We also used oligomycin (2 μ g/mL), which

inhibits the mitochondrial phosphorylation, to determine the non-coupled resting respiration, or LEAK respiration (L). FCCP at the concentration of 1.5 μ M was used as an optimum uncoupler, providing a measure of the kinetic capacity of the electron transport system (ETS) and helping us to measure the maximal uncoupled respiration (E). Using the ETS capacity as a common basis for normalization of coupling control ratios, the R/E reflects the level of mitochondrial activity relative to the maximal kinetic capacity of the electron transport system. Correspondingly, the L/E ratio reflects the level of LEAK respiration relative to the ETS capacity and provides an estimate of intrinsic uncoupling. Finally, the fraction of respiration actually used for ATP production is estimated as (R-L)/E. The analyses were performed on D5.

Cumulative population doubling (CPD) to measure cell proliferation.

For cumulative population doubling (CPD), cells were treated with TMZ 100 μ M for 3 h. After treatment, the cells were kept in drug-free medium (DFM). We also treated the cells on D5 with 2-deoxy-d-glucose (2-DG) – 0.8 mM, 1.6 mM or 4 mM - and dichloroacetate (DCA) – 10 mM and 20 mM - at D5. The cell number was determined on D3, D5, D6, D7, D10 and D14 and the cumulative population doubling (CPD) was calculated through the equation $PD = [\log N(t) - \log(t_0)] / \log 2$, where N(t) is the number of cells per well at the time of count and N(t₀) is the initial number of cells. The sum of PDs was then plotted versus time in culture.

Statistical analysis

Three independent experiments were performed for each analysis, except for the RT-PCR, which was performed only once, and the Cumulative Population Doubling, which was performed twice. Differences between controls and cells treated with TMZ within experimental groups were analysed by Student t test. Analyses between days were performed using ANOVA followed by Dunnet test. Significance was considered at $p < 0.05$. Results are expressed as means \pm SD.

AUTHOR CONTRIBUTION

Conceived and designed the experiments: MMBS, ECFC, GL. Performed the experiments: MMBS, IJB, ECFC. Analyzed the data: MMBS, IJB, ECFC, FK, GL. Wrote the manuscript: MMBS, IJB, ECFC, FK, GL.

REFERENCES

1. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):552-65.
2. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, D'Haese JG, Philippov PP, Werner J, et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. *J Cell Physiol.* 2016.
3. Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(6):447-64.
4. Ohta S. Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. *Oncogene.* 2006;25(34):4768-76.
5. Barrera G, Gentile F, Pizzimenti S, Canuto RA, Daga M, Arcaro A, et al. Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products. *Antioxidants (Basel).* 2016;5(1).
6. Pokorný J, Foletti A, Kobilková J, Vrba J. Mitochondrial Dysfunction and Disturbed Coherence: Gate to Cancer. *Pharmaceuticals (Basel).* 2015;8(4):675-95.
7. Clark PM, Mai WX, Cloughesy TF, Nathanson DA. Emerging Approaches for Targeting Metabolic Vulnerabilities in Malignant Glioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2016;16(2):17.
8. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):211-8.
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
10. Kennedy CR, Tilkens SB, Guan H, Garner JA, Or PM, Chan AM. Differential sensitivities of glioblastoma cell lines towards metabolic and signaling pathway inhibitions. *Cancer Lett.* 2013;336(2):299-306.
11. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* 2010;285(51):39759-67.
12. Cao X, Fang L, Gibbs S, Huang Y, Dai Z, Wen P, et al. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59(4):495-505.
13. Prasanna VK, Venkataramana NK, Dwarakanath BS, Santhosh V. Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-DG and radiation in glioblastoma. *J Cancer Res Ther.* 2009;5 Suppl 1:S44-7.
14. Kolesnik DL, Pyaskovskaya ON, Boichuk IV, Solyanik GI. Hypoxia enhances antitumor activity of dichloroacetate. *Exp Oncol.* 2014;36(4):231-5.
15. Abildgaard C, Dahl C, Basse AL, Ma T, Guldborg P. Bioenergetic modulation with dichloroacetate reduces the growth of melanoma cells and potentiates their response to BRAFV600E inhibition. *J Transl Med.* 2014;12:247.
16. Li C, Meng G, Su L, Chen A, Xia M, Xu C, et al. Dichloroacetate blocks aerobic glycolytic adaptation to attenuated measles virus and promotes viral replication leading to enhanced oncolysis in glioblastoma. *Oncotarget.* 2015;6(3):1544-55.
17. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010;2(31):31ra4.

18. Shen H, Decollogne S, Dilda PJ, Hau E, Chung SA, Luk PP, et al. Dual-targeting of aberrant glucose metabolism in glioblastoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34:14.
19. Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy.* 2015;11(7):1099-113.
20. Audet-Walsh É, Papadopoli DJ, Gravel SP, Yee T, Bridon G, Caron M, et al. The PGC-1 α /ERR α Axis Represses One-Carbon Metabolism and Promotes Sensitivity to Anti-folate Therapy in Breast Cancer. *Cell Rep.* 2016;14(4):920-31.
21. McGuirk S, Gravel SP, Deblois G, Papadopoli DJ, Faubert B, Wegner A, et al. PGC-1 α supports glutamine metabolism in breast cancer. *Cancer Metab.* 2013;1(1):22.
22. Kubli DA, Gustafsson Å. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res.* 2012;111(9):1208-21.
23. Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging Cell.* 2015;14(1):1-7.
24. Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell.* 2013;23(6):811-25.
25. Schöpf B, Schäfer G, Weber A, Talasz H, Eder IE, Klocker H, et al. Oxidative phosphorylation and mitochondrial function differ between human prostate tissue and cultured cells. *FEBS J.* 2016.
26. Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem.* 2009;109(4):1179-91.
27. Nicholls DG. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 6):1385-8.
28. Nickens KP, Wikstrom JD, Shirihai OS, Patierno SR, Ceryak S. A bioenergetic profile of non-transformed fibroblasts uncovers a link between death-resistance and enhanced spare respiratory capacity. *Mitochondrion.* 2013;13(6):662-7.
29. Xun Z, Lee DY, Lim J, Canaria CA, Barnebey A, Yanonne SM, et al. Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells. *Mech Ageing Dev.* 2012;133(4):176-85.
30. Chen KF, Chen HL, Tai WT, Feng WC, Hsu CH, Chen PJ, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337(1):155-61.
31. Viale A, Pettazoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sánchez N, Marchesini M, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature.* 2014;514(7524):628-32.
32. Yang HZ, Ma Y, Zhou Y, Xu LM, Chen XJ, Ding WB, et al. Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. *Cancer Lett.* 2015;361(1):128-36.
33. Xu ZY, Tang JN, Xie HX, Du YA, Huang L, Yu PF, et al. 5-Fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells. *Int J Biol Sci.* 2015;11(3):284-94.

4. DISCUSSÃO

Tanto a patogênese tumoral quanto a resposta do tumor à terapia já foram correlacionadas com disfunções mitocondriais. Como resultados anteriores do nosso grupo já haviam demonstrado que o tratamento agudo de 3 h com TMZ em células de GBM é capaz de induzir a produção de ROS, autofagia transiente e senescência celular a longo prazo (Filippi-Chiela *et al.*, 2015) nós propusemos no presente estudo elucidar se esse tratamento também induziria alterações mitocondriais e no metabolismo celular, e se elas estão correlacionadas com os dados anteriores.

Após o tratamento de 3 h com TMZ, pode-se observar um aumento transitório tanto na massa mitocondrial como no MMP. Para a manutenção da homeostase celular, é importante que exista um equilíbrio entre a biogênese e a degradação mitocondrial. PGC1a é um co-ativador transcricional que interage com o fatores de transcrição responsáveis pela síntese de novas mitocôndrias, e pode ser induzida por estresse oxidativo (Mcguirk *et al.*, 2013; Audet-Walsh *et al.*, 2016). No geral, o presente estudo demonstrou que o tratamento com TMZ induziu alterações tanto na massa mitocondrial e no MMP como de metabolismo. O aumento da massa mitocondrial parece ocorrer independentemente da expressão de PGC1-a, portanto o que estaríamos observando é um acúmulo de mitocôndrias ao invés da biogênese de novas organelas. Quando avaliamos os dados de autofagia, observa-se que a mesma se encontra progressivamente aumentada nos dias após a retirada do quimioterápico. No entanto, não é observada uma degradação de mitocôndrias no D5 mesmo que os níveis de autofagia estejam aumentados. Isso pode ocorrer justamente por as mitocôndrias acumuladas no D5 também apresentarem uma hiperpolarização da membrana mitocondrial, uma vez que a degradação dessas organelas por mitofagia só é sinalizada por uma perda no potencial de membrana. Quando há uma depolarização da membrana das mitocôndrias, PINK1 não é ubiquitinada e pode recrutar Parkin para a membrana mitocondrial. Parkin então é responsável pelo recrutamento do restante das proteínas envolvidas na via autofágica. Logo, o observado nos experimentos pode ser descrito como uma autofagia não-mitocondrial, uma vez que a hiperpolarização da membrana dessas organelas impede que elas sejam degradadas.

Além disso, TMZ induz um aumento na porcentagem de células positivas para DCFH e C12FDG também no D5. C12FDG é um substrato para a enzima beta-galactosidase, que se encontra super-expresso em células senescentes. Portanto, pode-se observar um aumento das células senescentes após o tratamento com TMZ. As células senescentes também aumentam em tamanho; e este aumento já tem sido apontado como um sinal para produzir novas organelas, incluindo as mitocôndrias (Ziegler *et al.*, 2015). Isso pode explicar a correlação do aumento da massa mitocondrial e aumento dos níveis de senescência observados com a co-marcação de *Mitotracker* e C12FDG no D5.

Ao analisarmos a taxa de consumo de oxigênio (OCR) por HRR, pudemos observar que as células tratadas com TMZ aumentam seu consumo de oxigênio em todos os parâmetros analisados. Com a medida de respiração máxima, podemos inferir a capacidade do sistema de transferência de elétrons (ETS), responsável pela transferência de elétrons a partir de substratos reduzidos fornecidos externamente em oxigênio. Em um estudo recente, a maior atividade na ETS tem sido positivamente correlacionada com a manutenção de melanomas e o seu fenótipo de resistência a múltiplas drogas (Roesch *et al.*, 2013), porém ao nosso conhecimento não há dados na literatura correlacionando a respiração máxima em GBM e quimioresistência. Células tratadas com TMZ também têm uma respiração ROX superior. Muitas enzimas que consomem oxigênio e têm reações de auto-oxidação podem contribuir para ROX, incluindo as atividades de peroxidases e oxidases, que contribuem em parte para a produção de ROS (Schöpf *et al.*, 2016). O que poderia explicar por que se observa um aumento das células positivas DCFH no D5 após o tratamento TMZ.

A capacidade respiratória de reserva (SRC) é a capacidade extra disponível em células para a produção de energia em resposta ao aumento da tensão e, como tal, está associada com a sobrevivência celular. Se sabe também que há uma forte correlação entre SRC e a resistência à morte celular (Choi *et al.*, 2009; Nicholls, 2009). Ser capaz de evadir apoptose tem sido mostrado como necessário para células altamente proliferativas, o que estabelece uma ligação entre a bioenergética alterada e fenótipo tumoral agressivo. Esse aumento na SRC também já foi demonstrado em células de neuroblastoma tratadas com ácido retinóico (Chen *et al.*, 2011) e existe a hipótese de que a via da PI3K/Akt seja necessária para

uma alteração na bioenergética mitocondrial que levaria a um aumento da SRC (Viale *et al.*, 2014). Em geral, o nosso estudo também demonstrou que a TMZ reduz a dependência de células GBM a glicólise, já que elas apresentam um maior OCR e pelo fato de as células tratadas com TMZ serem mais sensíveis a inibidores OXPHOS que os inibidores de glicólise. Um estado mais oxidativo já foi observada em células de câncer pancreático, colo-retal e gástrico após quimioterapia, demonstrando que esta resposta para ser comum em diferentes tipos de câncer e pode ser correlacionada com quimioresistência nos mesmos (Xu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015).

Apesar de já existirem diversos estudos com relação à análises de expressão gênica e de proteínas em GBM, pouco se sabe sobre as alterações metabólicas que podem promover seu fenótipo agressivo. Sabe-se que TMZ provoca uma remodelação do cadeia transportadora de elétrons (ETC) e que quimioresistência poderia ser provavelmente uma resposta adaptativa ao estresse genotóxico provocado pela quimioterapia (Oliva *et al.*, 2010). Neste estudo demonstramos que a resposta após o tratamento com TMZ também consiste em alterações na rede mitocondrial e que levam a um maior OCR e SRC. Além disso, as células após o tratamento com TMZ aparentam ser mais dependentes de fosforilação oxidativa do que glicólise. Fato que observamos através da maior diminuição do número de células tratadas com inibidores de OXPHOS. Também foi observado um aumento na SRC que pode estar correlacionada com a quimioresistência das células. O que poderia indicar que uma modulação de OXPHOS em células previamente tratadas com TMZ pode sensibilizar essas células à um segundo tratamento.

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho apontam que:

- O tratamento agudo com TMZ induz um aumento transitório tanto na massa mitocondrial como no MMP.
- O aumento nesses dois parâmetros parece ser causado por um aumento de mitocôndrias com alto MMP e não por um aumento na sua biogênese.
- TMZ também induz um aumento nos níveis de ROS e senescência. Esses valores podem ser correlacionados com o aumento na massa mitocondrial.
- Células de GBM tratadas com o quimioterápico apresentam maiores taxas de consumo de oxigênio e um aumento na sua capacidade reserva.
- Células tratadas com TMZ parecem ser mais sensíveis a inibição de fosforilação oxidativa do que glicólise.

Em conjunto, esses resultados demonstram que em células de GBM a resposta adaptativa após quimioterapia consiste em parte por alterações na rede mitocondrial, que levam a uma maior dependência de fosforilação oxidativa. O que pode indicar que a modulação dessa via em células previamente tratadas com TMZ pode sensibilizar as células a um segundo tratamento. Logo, uma modulação racional desse processo pode surgir como um potencial terapêutico promissor a ser testado, em uma tentativa para superar a resistência do tumor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILDGAARD, C. et al. Bioenergetic modulation with dichloroacetate reduces the growth of melanoma cells and potentiates their response to BRAFV600E inhibition. **J Transl Med**, v. 12, p. 247, 2014. ISSN 1479-5876. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25182332> >.

AUDET-WALSH, É. et al. The PGC-1 α /ERR α Axis Represses One-Carbon Metabolism and Promotes Sensitivity to Anti-folate Therapy in Breast Cancer. **Cell Rep**, v. 14, n. 4, p. 920-31, Fev 2016. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26804918> >.

BARRERA, G. et al. Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products. **Antioxidants (Basel)**, v. 5, n. 1, 2016. ISSN 2076-3921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907355> >.

CAO, X. et al. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 495-505, Mar 2007. ISSN 0344-5704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16906425> >.

CHEN, K. F. et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 337, n. 1, p. 155-61, Abr 2011. ISSN 1521-0103. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205925> >.

CHEN, X.; QIAN, Y.; WU, S. The Warburg effect: evolving interpretations of an established concept. **Free Radic Biol Med**, v. 79, p. 253-63, Fev 2015. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25277420> >.

CHOI, S. W.; GERENCSEK, A. A.; NICHOLLS, D. G. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. **J Neurochem**, v. 109, n. 4, p. 1179-91, Mai 2009. ISSN 1471-4159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19519782> >.

CLARK, P. M. et al. Emerging Approaches for Targeting Metabolic Vulnerabilities in Malignant Glioma. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 16, n. 2, p. 17, Fev 2016. ISSN 1534-6293. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26759318> >.

COURTNAY, R. et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. **Mol Biol Rep**, v. 42, n. 4, p. 841-51, Abr 2015. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689954> >.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p.

1099-113, 2015. ISSN 1554-8635. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701485> >.

_____. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer**, v. 13, p. 147, 2013. ISSN 1471-2407. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23522185> >.

FU, V.; MOROISHI, T.; GUAN, K. L. Glycolysis Anonymous: Cancer Sober Up with mTORC1. **Cancer Cell**, v. 29, n. 4, p. 432-4, Abr 2016. ISSN 1878-3686. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27070696> >.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 6, p. 447-64, Jun 2010. ISSN 1474-1784. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20467424> >.

GARCIA-HEREDIA, J. M.; CARNERO, A. Decoding Warburg's hypothesis: tumor-related mutations in the mitochondrial respiratory chain. **Oncotarget**, v. 6, n. 39, p. 41582-99, Dez 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26462158> >.

GATTO, F.; NIELSEN, J. In search for symmetries in the metabolism of cancer. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 1, p. 23-35, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1939-005X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538017> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HATTORI, N.; SAIKI, S.; IMAI, Y. Regulation by mitophagy. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 53, p. 147-50, Ago 2014. ISSN 1878-5875. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24842103> >.

HIROSE, Y. et al. Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. **Cancer Res**, v. 65, n. 11, p. 4861-9, Jun 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930307> >.

HORTON, K. L. et al. Mitochondria-penetrating peptides. **Chem Biol**, v. 15, n. 4, p. 375-82, Abr 2008. ISSN 1074-5521. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420144> >.

KENNEDY, C. R. et al. Differential sensitivities of glioblastoma cell lines towards metabolic and signaling pathway inhibitions. **Cancer Lett**, v. 336, n. 2, p. 299-306, Ago 2013. ISSN 1872-7980. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23523615> >.

KENNEDY, K. M.; DEWHIRST, M. W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. **Future Oncol**, v. 6, n. 1, p.

127-48, Jan 2010. ISSN 1744-8301. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021214> >.

KHAITAN, D.; CHANDNA, S.; DWARAKANATH, S. B. Short-term exposure of multicellular tumor spheroids of a human glioma cell line to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose is more toxic than continuous exposure. **J Cancer Res Ther**, v. 5 Suppl 1, p. S67-73, Set 2009. ISSN 1998-4138. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009299> >.

LI, C. et al. Dichloroacetate blocks aerobic glycolytic adaptation to attenuated measles virus and promotes viral replication leading to enhanced oncolysis in glioblastoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 3, p. 1544-55, Jan 2015. ISSN 1949-2553. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575816> >.

_____. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. **World J Surg Oncol**, v. 14, n. 1, p. 15, 2016. ISSN 1477-7819. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791262> >.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends Biochem Sci**, v. 41, n. 3, p. 211-8, Mar 2016. ISSN 0968-0004. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778478> >.

MCGUIRK, S. et al. PGC-1 α supports glutamine metabolism in breast cancer. **Cancer Metab**, v. 1, n. 1, p. 22, 2013. ISSN 2049-3002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24304688> >.

MICHELAKIS, E. D. et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 31, p. 31ra34, Mai 2010. ISSN 1946-6242. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463368> >.

NICHOLLS, D. G. Spare respiratory capacity, oxidative stress and excitotoxicity. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 6, p. 1385-8, Dez 2009. ISSN 1470-8752. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909281> >.

OHTA, S. Contribution of somatic mutations in the mitochondrial genome to the development of cancer and tolerance against anticancer drugs. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4768-76, Ago 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892089> >.

OLIVA, C. R. et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. **J Biol Chem**, v. 285, n. 51, p. 39759-67, Dez 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870728> >.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, n. 7, p. 552-65, Jul 2003. ISSN 1471-0072. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838338> >.

POKORNÝ, J. et al. Mitochondrial Dysfunction and Disturbed Coherence: Gate to Cancer. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 8, n. 4, p. 675-95, 2015. ISSN 1424-8247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437417> >.

PRASANNA, V. K. et al. Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-DG and radiation in glioblastoma. **J Cancer Res Ther**, v. 5 Suppl 1, p. S44-7, Set 2009. ISSN 1998-4138. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009294> >.

REITMAN, Z. J.; YAN, H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 13, p. 932-41, Jul 2010. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513808> >.

ROESCH, A. et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. **Cancer Cell**, v. 23, n. 6, p. 811-25, Jun 2013. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764003> >.

SCHÖPF, B. et al. Oxidative phosphorylation and mitochondrial function differ between human prostate tissue and cultured cells. **FEBS J**, v. 283, n. 11, p. 2181-2196, Jun 2016. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060259> >.

SETTEMBRE, C.; BALLABIO, A. Cell metabolism: autophagy transcribed. **Nature**, v. 516, n. 7529, p. 40-1, Dez 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25383529> >.

SHEN, H. et al. Dual-targeting of aberrant glucose metabolism in glioblastoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 34, p. 14, 2015. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25652202> >.

SMITH, L. K.; RAO, A. D.; MCARTHUR, G. A. Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma. **Pharmacol Res**, v. 107, p. 42-7, Mai 2016. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26924126> >.

VESSONI, A. T. et al. Autophagy and genomic integrity. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 11, p. 1444-54, Nov 2013. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933813> >.

VIALE, A. et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. **Nature**, v. 514, n. 7524, p. 628-32, Out 2014. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119024> >.

XU, Z. Y. et al. 5-Fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells. **Int J Biol Sci**, v. 11, n. 3, p. 284-94, 2015. ISSN 1449-2288. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678847> >.

YAMADA, Y.; HARASHIMA, H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, n. 13-14, p. 1439-62, 2008 Out-Nov 2008. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18655816> >.

YANG, H. Z. et al. Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. **Cancer Lett**, v. 361, n. 1, p. 128-36, Mai 2015. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749420> >.

YANG, Y. et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. **J Cell Physiol**, Fev 2016. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26895995> >.

YEN, K. E. et al. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. **Oncogene**, v. 29, n. 49, p. 6409-17, Dez 2010. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20972461> >.

ZHANG, C. et al. Inhibition of cadmium-induced apoptosis by glutathione S-transferase P1 via mitogen-activated protein kinases and mitochondrial pathways. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 30, n. 2, p. 202-8, Set 2010. ISSN 1872-7077. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787653> >.

ZIEGLER, D. V.; WILEY, C. D.; VELARDE, M. C. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. **Aging Cell**, v. 14, n. 1, p. 1-7, Fev 2015. ISSN 1474-9726. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25399755> >.

Mardja Manssur Bueno e Silva

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6836121028944714>

Última atualização do currículo em 04/08/2015

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foi bolsista do CNPq no programa Ciência sem Fronteiras realizando graduação sanduíche na University of Toronto; e estagiou no mesmo período no The Hospital for Sick Children (SickKids). Tem experiência com as principais vias de sinalização em células tumorais, uso de autofagia na terapia de gliomas, resposta de tumores à agentes farmacológicos, CRISPR e no estudo de alterações genéticas em meduloblastoma. Atualmente é aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS estudando alterações na rede mitocondrial e reprogramação metabólica em células de glioma. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Mardja Manssur Bueno e Silva



Nome em citações bibliográficas

BUENO E SILVA, M.M; SILVA, M. M. B. E; BUENO E SILVA, MARDJA MANSSUR; SILVA, MARDJA

Endereço

Endereço Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica.

Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular

Agronomia

91509900 - Porto Alegre, RS - Brasil

Telefone: (51) 33087620

URL da Homepage: <http://www.ufrgs.br/labsinal/>

Formação acadêmica/titulação

2015

Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Orientador:  Guido Lenz.

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

2010 - 2014

Graduação em Ciências Biológicas.

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

com **período sanduíche** em University of Toronto (Orientador: Michael Taylor).
Título: Alterações mitocondriais na resposta à quimioterapia em células de glioma.
Orientador: Guido Lenz.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Formação Complementar

2012

Curso de Francês.
Roche Instituto de Idiomas.

2015 - 2015

Extensão universitária em I Curso em Células Tronco Pluripotentes Induzidas. (Carga horária: 15h).
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

2013 - 2013

Extensão universitária em X Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 90h).
Universidade de São Paulo.

2013 - 2013

Extensão universitária em Proteômica aplicada ao estudo de câncer. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo.

2013 - 2013

Extensão universitária em Práticas em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 14h).
Universidade de São Paulo.

2012 - 2012

Extensão universitária em I Curso de Inverno Genética e Biologia Molecular. (Carga horária: 90h).
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2012 - 2012

Tópicos em biologia de sistemas. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

2012 - 2012

Análise in silico de proteínas. (Carga horária: 5h).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

2012 - 2012

Terapia Gênica. (Carga horária: 3h).
Federação das Sociedades de Biologia Experimental.

2009 - 2010

Curso de Inglês - Nível Avançado. (Carga horária: 180h).
Cultura Inglesa - Porto Alegre (RS).

Atuação Profissional

The Hospital for Sick Children, SICKKIDS, Canadá.

Vínculo institucional

2013 - 2014

Vínculo: Outro, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 40

Outras informações

Bolsista pelo programa Ciência sem Fronteiras, realizou estagio sob a supervisão do Dr. Michael Taylor trabalhando com o papel do promotor de Hic I e dois micro RNAs no desenvolvimento de meduloblastomas; assim como o uso de CRISPR para edição genômica em iPS cells.

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

Vínculo institucional

2012 - 2013

Vínculo: Outro (especifique), Enquadramento Funcional: Bolsista de iniciação científica, Carga horária: 20

Outras informações

Bolsista de iniciação científica pelo programa PROBIC FAPERGS-UFRGS no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular.

Projetos de pesquisa

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.

Integrantes: Mardja Manssur Bueno e Silva - Integrante / Guido Lenz - Coordenador / Eduardo Cremonese Filippi Chiela - 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: Mardja Manssur Bueno e Silva - Integrante / Guido Lenz - Coordenador / Eduardo Cremonese Filippi Chiela - Integrante.

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

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.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Francês

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2013

Menção honrosa - X Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular, USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

2013

Bolsa de graduação sanduíche pelo Ciência sem Fronteiras, CNPq.

2012

Menção honrosa, XXVII Reunião Anual da FeSBE.

2012

Destaque do XXIV Salão de Iniciação Científica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.

FILIPPI-CHIELA, EDUARDO CREMONESE ; **BUENO E SILVA, MARDJA MANSSUR** ; THOMÉ, MARCOS PAULO ; [LENZ, GUIDO](#) . Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. Autophagy (Georgetown, TX) **JCR**, v. 11, p. 00-00, 2015.

Citações: **WEB OF SCIENCE** ² | **SCOPUS** ²

2.

FILIPPI-CHIELA, EDUARDO C ; THOMÉ, MARCOS PAULO ; **BUENO E SILVA, MARDJA MANSSUR** ; PELEGRINI, ALESSANDRA LUÍZA ; LEDUR, PITIA 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** ²³ | **SCOPUS** ²⁷

3.

SILVA, MARDJA; FILIPPI-CHIELA, EDUARDO ; [LENZ, GUIDO](#) . Recent Patents on Morphometric Analysis of Eukaryotic Cells. Recent Patents on Medical Imaging, v. 3, p. 123-134, 2013.

Capítulos de livros publicados

1.

FILIPPI-CHIELA, E. C. ; **BUENO E SILVA, M.M** . Análises fisiológicas em amostras vegetais e animais. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. 1ed.Lajeado: Univates, 2014, v. , p. 102-150.

Resumos publicados em anais de congressos

1.

FILIPPI-CHIELA, E. C. ; **BUENO E SILVA, M.M** ; THOME, M. P. ; [LENZ, GUIDO](#) . AMPK1-ULK1 axis and p38 MAPK activation are early events in autophagy and senescence induction by DNA damage. In: Keystone - Autophagy: Fundamentals to Disease, 2014, Austin. Abstracts of Keystone Symposia - Autophagy: Fundamentals to Disease, 2014.

2.

[LENZ, GUIDO](#) ; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; **BUENO E SILVA, M.M** ; THOME, M. P. . An Integrative Single Cell Analysis of Autophagy and Senescence Induced by DNA-Damage. In: Keystone Symposia - Autophagy: Fundamentals to Disease, 2014, Austin. Abstracts of, 2014.

3.

BUENO E SILVA, M.M; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; THOME, M. P. ; PELEGRINI, A. L. ; ZAMIN, L. L. ; LENZ, G . Resveratrol enhances the chronic cytotoxic effect of Temozolomide in glioma cells: role of senescence and DNA damage. In: XLII Reunião Anual da SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. Resumos da XLII Reunião Anual da SBBq, 2013.

4.

SILVA, M. M. B. E; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; ZAMIN, L. L. ; THOME, M. P. ; PELEGRINI, A. L. ; LENZ, G . Resveratrol potencializa o efeito citotóxico crônico da Temozolomida em células de glioma: papel da senescência e dano ao DNA. In: XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2012, Águas de Lindóia - SP. XXVII Reunião Anual da FeSBE, 2012.

5.

BUENO E SILVA, M.M; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; THOME, M. P. ; LENZ, G . Avaliação do papel da autofagia na senescência induzida por Temozolomida em células de glioma. In: XXIV do Salão de Iniciação da UFRGS, 2012, Porto Alegre. Anais dos Salões de Iniciação Científica da UFRGS, 2012.

6.

FILIPPI-CHIELA, E. C. ; **BUENO E SILVA, M.M** ; THOME, M. P. ; LENZ, G . Papel da autofagia na senescência induzida por Temozolomida em células de glioma. In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, 2012, Porto Alegre. Resumos da XIV Reunião Anual do PPGBCM, 2012.

Apresentações de Trabalho

1.

BUENO E SILVA, M.M. CRISPR - Edição Genômica. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2.

THOME, M. P. ; **BUENO E SILVA, M.M** . Autofagia - aula prática. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

3.

BUENO E SILVA, M.M; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; THOME, M. P. ; PELEGRINI, A. L. ; ZAMIN, L. L. ; LENZ, G . Resveratrol enhances the chronic cytotoxic effect of Temozolomide in glioma cells: role of senescence and DNA damage. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

4.

SILVA, M. M. B. E; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; ZAMIN, L. L. ; THOME, M. P. ; PELEGRINI, A. L. ; LENZ, G . Resveratrol potencializa o efeito citotóxico crônico da Temozolomida em células de glioma: papel da senescência e dano ao DNA. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5.

BUENO E SILVA, M.M; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; THOME, M. P. ; LENZ, G . Avaliação do papel da autofagia na senescência induzida por Temozolomida em células de glioma. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

Epigenetic mechanisms in cancer. 2014. (Simpósio).

2.

XLII Reunião Anual da SBBq. Resveratrol enhances the chronic cytotoxic effect of Temozolomide in glioma cells: role of senescence and DNA damage. 2013. (Congresso).

3.

1st International Meeting of Laboratory Animals. 2012. (Encontro).

4.

I Semana Acadêmica da Biotecnologia - UFRGS. 2012. (Outra).

5.

Workshop - Microbiologia Aplicada. 2012. (Oficina).

6.

XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS. Resveratrol potencializa o efeito citotóxico crônico da Temozolomida em células de glioma: papel da senescência e dano ao DNA. 2012. (Encontro).

7.

XXIV Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Avaliação do papel da autofagia na senescência induzida por Temozolomida em células de glioma. 2012. (Outra).

8.

XXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Resveratrol potencializa o efeito citotóxico crônico da Temozolomida em células de glioma: papel da senescência e dano ao DNA. 2012. (Congresso).

9.

Jornada Acadêmica da Biologia UFRGS - JABURGS. 2011. (Outra).

10.

XXIII Salão de Iniciação Científica UFRGS. Aspectos reprodutivos de *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) e *Corbicula largillierti* (Philippi, 1844), no reservatório de Peixe-Angical, rio Tocantins, TO (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). 2011. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1.

LENZ, GUIDO ; FILIPPI-CHIELA, EDUARDO ; SILVA, A.O ; KIPPER, F. C ; LEDUR, P. F ; VILLODRE, E. S ; DALBERTO, T. P ; FELIPE, K. B. ; **BUENO E SILVA, M.M** ; MINUSSI, D. C. ; HÜTTEN, M. O ; THOME, M. P. ; OYAMA, M. Z. ; DALSIN, E. ; BIANCHIN, I. ; MENDONCA, L. C. ; MIGLIAVACA, C. B. . IV Curso de sinalização celular no câncer. 2014. (Outro).

2.

BUENO E SILVA, M.M; GONCHOROSKI, T. ; FRANCO, D. ; FLORES, A. M. . Jornada Acadêmica da Biologia UFRGS - JABURGS 2014. 2014. (Outro).

3.

LENZ, G ; FILIPPI-CHIELA, E. C. ; SILVA, A.O ; VILLODRE, E. S ; LEDUR, P. F ; KIPPER, F. C ; VARGAS, J. E ; DALBERTO, T. P ; **BUENO E SILVA, M.M** ; THOME, M. P. ; DA ROSA, C. D ; HÜTTEN, M. O ; SUHRE, T. . II Curso de sinalização celular no câncer - teoria e prática da biologia celular tumoral. 2012. (Outro).

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1.

BUENO E SILVA, M.M. CRISPR - Edição Genômica. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).

2.

THOME, M. P. ; **BUENO E SILVA, M.M** . Autofagia - aula prática. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Outras informações relevantes

Atividades práticas do I Curso de Inverno em Genética e Biologia Molecular Humana realizadas no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).