

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

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA DEFICIENTES E
PROFICIENTES EM AAG AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA EM COMBINAÇÃO
COM AGENTES INDUTORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

CAROLINE GONÇALVES VIEIRA

PORTO ALEGRE
2018

Caroline Gonçalves Vieira

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA DEFICIENTES E PROFICIENTES EM AAG AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA EM COMBINAÇÃO COM AGENTES INDUTORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

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

Área de habilitação: Biologia molecular

Orientador Prof^o Dr^o João Antônio Pêgas
Henriques

Coorientadora Dra Larissa Milano

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Caroline Gonçalves

Avaliação da resposta de linhagens de glioblastoma deficientes e proficientes em AAG ao tratamento com Temozolomida em combinação com agentes indutores do estresse do retículo endoplasmático / Caroline Gonçalves Vieira. -- 2018.

76 f.

Orientador: João Antônio Pêgas Henriques.

Coorientadora: Larissa Milano de Souza.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Reparação de DNA. 2. Glioblastoma. 3. Temozolomida. I. Henriques, João Antônio Pêgas, orient. II. Souza, Larissa Milano de, coorient. III. Título.

Caroline Gonçalves Vieira

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA DEFICIENTES E PROFICIENTES EM AAG AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA EM COMBINAÇÃO COM AGENTES INDUTORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

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

Aprovado em: 21 de dezembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Michelle Lima

Prof^a Dr^a Márcia Wink - UFCSPA

ORIENTADOR

Prof^o Dr^o João Antônio Pêgas Henriques - UFRGS

RESUMO

O glioblastoma multiforme é o tumor primário adulto mais prevalente e agressivo do sistema nervoso central. Atualmente o tratamento padrão inclui: cirurgia, radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ) adjuvante. A TMZ é um agente alquilante que danifica as bases do DNA e provoca adutos de metila especialmente nas posições N⁷-MeG, N³-MeA e resíduos O⁶-MeG na molécula do DNA. Mecanismos de reparo específicos atuam para reparar estas lesões, como a O⁶-MeG que é removida pela metil-guanina metil-transferase (MGMT) e as lesões N⁷-MeG e N³-MeA reparadas pelo reparo por excisão de bases (BER). Estas vias de reparo interferem no tratamento e, apesar de ser muito utilizado a associação de cirurgia, radioterapia e TMZ como tratamento de GBM, este tratamento não é plenamente eficiente, uma vez que após o tratamento os pacientes têm uma sobrevivência de cerca de quinze meses. Por esse motivo, tem se desenvolvido muitas pesquisas com o intuito de descobrir novas terapias afim de se aumentar a eficiência do tratamento de pacientes com GBM. A Salinomicina (SLN) é um fármaco indutor de estresse no retículo endoplasmático (RE) e recentemente seu uso tem sido explorado no tratamento de diversos tipos de tumor. O estresse no RE ativa a resposta de proteínas desenoveladas (UPR- unfolded protein response), responsável pela manutenção de um proteoma funcional, e essa resposta ativa três eixos principais para lidar com esse estresse no RE. As proteínas transmembranares residentes no RE que iniciam a UPR são: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1 α), activating transcription factor 6 (ATF6) e protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). Embora essas proteínas transdutoras sejam reguladas negativamente por chaperonas como a BiP em células saudáveis, o aumento do estresse do RE provoca a dissociação das chaperonas, induzindo assim a UPR. A alquiladenina DNA glicosilase (AAG) inicia o BER para danos induzidos por TMZ e é fundamental para as respostas celulares frente a alquilação afetando a sobrevida de pacientes com GBM. Aqui demonstramos que SLN sinergiza com o tratamento de alquilante para promover a citotoxicidade de um modo dependente de AAG. A caracterização do mecanismo molecular de suporte a essa citotoxicidade induzida de forma dependente de AAG indica que o UPR induzido pelo tratamento de TMZ e SLN envolve os eixos PERK e IRE1 α . Ainda, o tratamento combinado de SLN e TMZ prejudica o fluxo autofágico em células proficientes em AAG. Em conjunto estes dados sugerem um papel para AAG no estresse do RE que poderia ser abordado para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas combinando agentes alquilantes com ativadores farmacológicos da UPR no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Alquiladenina DNA glicosilase, Salinomicina, Temozolamida, Reparo por excisão de bases, Resposta de proteína desenovelada (UPR).

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is the most prevalent and aggressive adult primary tumor of the central nervous system. Currently, the standard treatment includes surgery, radiotherapy and chemotherapy with adjuvant temozolomide (TMZ). TMZ is an alkylating agent that damages the DNA bases and causes methyl adducts especially in the positions N7-Meg, N3-MeA and residues O6-Meg in the DNA molecule. Specific repair mechanisms act to repair these lesions, such as the O6-Meg that is removed from the methyl-guanine-methyl-transferase (MGMT), and the N7-Meg and N3-MeA lesions, repaired by base excision repair (BER). These repair pathways interfere on the treatment, and even if Glioblastoma Multiforme has surgical, radiotherapeutic and Temozolomide chemotherapeutic possibilities, these are not efficient, with results showing only 15 months average survival. For this reason, many studies are exploring several mechanisms in order to increase the efficiency of treatment. Salinomycin (SLN) is a stress inducing drug of the endoplasmic reticulum (RE) and has recently been studied as therapy in the treatment of various types of cancers. The stress in the RE activates a response of the unstained protein (UPR), responsible for the maintenance of the functional proteome, and this response activates three main axes to cope with RE stress. The transmembrane proteins residing in the RE that initiate the UPR are: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1A), activating transcription factor 6 (ATF6) and protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). Although these transducer proteins are negatively regulated by chaperones such as BiP in healthy cells, the increase in RE stress provokes the dissociation of the chaperones, thus inducing UPR. Alkyladenine DNA glycosylase (AAG) initiates base excision repair (BER) for TMZ-induced base damage and is fundamental for cellular responses to alkylation affecting the survival of glioblastoma patients. Here we show that SLN synergizes with alkylation treatment to promote an AAG dependent cytotoxicity. The characterization of the molecular mechanism that supports this induced AAG dependent cytotoxicity shows that UPR induced by TMZ and SLN treatment involves PERK and IRE1 axis. Still, SLN and TMZ combined treatment hinders autophagic flow in AAG proficient cells. As a whole, these data support a role for AAG in RE stress which could be used for the development of new therapeutic strategies which combine alkylating agents with pharmacological activators of UPR in cancer treatment.

Keywords: Alkyladenine DNA glycosylase, Temozolomide, Salinomycin, Base excision repair, Response of the unstained protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e via de ativação da pró-droga Temozolamida	10
Figura 2. Via alternativa de BER	13
Figura 3 Complexidade e interferentes nos três eixos da UPR	19
Figura 4 Estrutura da Salinomicina	21
Figura 5. Apresentação esquemática da formação de autofagossomos e maturação por fusão com endossomos e lisossomos	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAG	Alquiladenina DNA Glicosilase
APE1	Endonuclease Apurinica / Apirimidinica
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
BER	Reparo por Excisão de Base de DNA
BiP	Binding Protein
DNTs	Doenças não Transmissíveis
GBM	Glioblastoma Multiforme
IRE1 α	Inositol-requiring Kinase 1 α
MGMT	Metilguanina-DNA Metiltransferase
MMR	Mismatch Repair (Reparo por Emparelhamentos Errados)
MTIC	Monometil-triazeno-5- (3-metiltriazen-1-il) -imidazole-4-carboxamida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Dissulfeto isomerase
PERK	Protein Kinase-like ER
RE	Retículo Endoplasmático
SLN	Salinomicina
SNC	Sistema Nervoso Central
TMZ	Temozolomida
XRCC1	X-ray Repair Cross-complementing Protein 1
UPR	Unfolded- Protein Response

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 CÂNCER.....	9
1.2 GLIOBLASTOMA.....	9
1.3 TEMOZOLAMIDA.....	10
1.4 MECANISMOS DE REPARO.....	11
1.4.1 Mecanismo de Reparo e Resistência a Temozolamida.....	11
1.4.2 Reparo por excisão de base de DNA (BER).....	12
1.5 ALQUILADENINA DNA GLICOSILASE.....	14
1.6 RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	15
1.7 RESPOSTA DE PROTEÍNA DESENOVELADA.....	16
1.7.1 Sinalização por IRE1 α	16
1.7.2 Sinalização por PERK.....	17
1.7.3 Sinalização por ATF6.....	18
1.7.4 Estresse no Retículo Endoplasmático e Câncer.....	20
1.8 INDUTORES DE ESTRESSE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	21
1.8.1 Salinomicina	21
1.9 AUTOFAGIA	22
2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
3. CONCLUSÃO.....	50
4. PERSPECTIVAS.....	51
5.REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO A: NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA DNA REPAIR.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

Dentre as doenças não transmissíveis (DNTs), que são responsáveis pela maior causa de óbito do mundo (63% das mortes globais), as mortes relacionadas ao câncer ocupam a segunda colocação com cerca de 21% de todos óbitos relacionados às DNTs (INCA,2018). No Brasil a estimativa para o ano de 2018 é a ocorrência de 600 mil casos novos de cânceres, dos quais presume-se que ocorrerão cerca de 11.320 casos novos de câncer do Sistema Nervoso Central (SNC). A partir desse número estima-se que há um risco de 5,62 novos casos de câncer no SNC a cada 100 mil homens e 5,17 a cada 100 mil mulheres (INCA,2018).

Os cânceres do SNC abrangem os gliomas que correspondem a 27% de todos os tumores do SNC e totalizam cerca de 80% dos tumores malignos cerebrais, com pico aos 65 anos e no sexo masculino (OSTROM et al., 2016). O tumor mais comum e agressivo do SNC que acomete os seres humanos é o glioblastoma multiforme (GBM), também chamado de glioblastoma ou astrocitoma grau IV. Um recente levantamento estatístico nos Estados Unidos da América (CBTRUS) aponta para uma estimativa de 12.000 novos casos de GBM no país no ano de 2018. Tendo uma incidência de 3,21 casos de GBM a cada 100 mil habitantes, seguido por 0,46/100 mil hab. para os astrocitomas (OSTROM et al., 2016).

1.2 GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Os GBM são classificados segunda a Organização Mundial da Saúde (OMS), com base nas suas características de diferenciação, anaplasia e agressividade, como sendo considerados gliomas de alto grau (ou grau IV) (OLAR; ALDAPE, 2015).

O GBM origina-se de células da zona subventricular do SNC e representa o tipo mais comum de tumor primário de cérebro na vida adulta (46,6%) (LEE et al., 2018; OSTROM et al., 2016). A denominação multiforme caracteriza esse tipo de tumor por ter uma proliferação celular descontrolada, pleomorfismo celular e nuclear, infiltração difusa, resistência à apoptose, angiogênese robusta, instabilidade genômica e necrose de coagulação ou isquêmica. Tais características histopatológicas o classificam com um perfil agressivo, maligno e indiferenciado (KLEIHUES et al., 2002; OLAR; ALDAPE, 2015).

Atualmente o tratamento padrão dos glioblastomas inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ) adjuvante (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW,

2012). A TMZ é um agente alquilante que danifica as bases do DNA, apresentando um caráter tóxico e mutagênico (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

1.3 TEMOZOLAMIDA

A TMZ é um agente alquilante oral da classe das imidotetrazinas. Esse fármaco é quimicamente classificado como uma metilimidazotetrazina e é composta por um anel de imidazolólico com um grupo amídico ligado a C1 (imidazol-carboxamida) condensado com um sistema de anel de segunda-tetrazinona, que contém três nitrogênios adjacentes (Fig. 1). Esta parte da molécula confere elevada reatividade ao composto (MARCHESI et al., 2007).

A ativação do fármaco ocorre após a absorção intestinal, onde é ativado espontaneamente em solução aquosa com pH fisiológico, não precisando de ativação enzimática. Após a absorção a molécula sofre uma ruptura das suas ligações químicas para formar uma segunda molécula chamada monometil-triazeno-5- (3-metiltriazen-1-il) -imidazole-4-carboxamida (MTIC). O MTIC reage ainda com água para liberar 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e o cátion metildiazônio altamente reativo (Fig. 1) (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

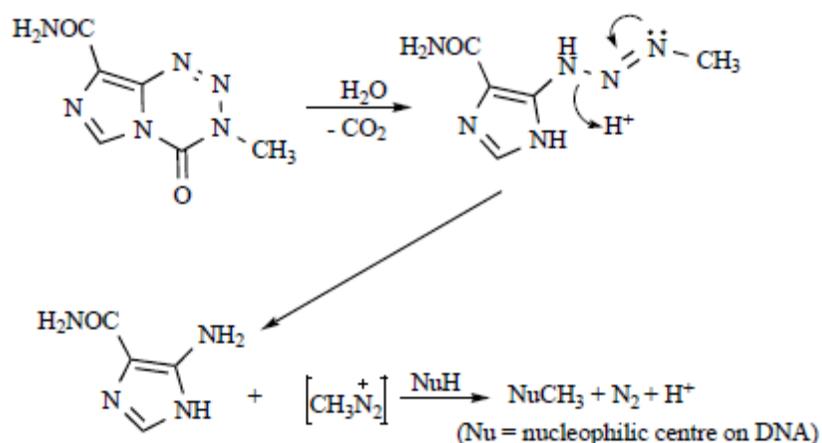


Figura 1: Estrutura e via de ativação da pró-droga Temozolamida. (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012)

A TMZ é um agente não específico de fase de ciclo celular, atuando na interfase, fase mitótica e citocinese, e também atravessa facilmente a barreira hematoencefálica de forma intacta (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). O seu mecanismo de ação consiste de uma interação com o DNA, tendo a capacidade de formação de adutos de metila. A citotoxicidade da TMZ ocorre pela transferência de grupos metil do íon metildiazônio para bases do DNA, gerando principalmente as lesões N⁷-metilguanina (60-80%), N¹ e N³-metiladenina e N³ metilcitosina (25%)

e O⁶-metilguanina (5%) (FU; CALVO; SAMSON, 2012). Estas lesões são mais numerosas em posições relacionadas a guanina, no entanto, esse tipo de lesão é considerada pouco tóxica, pois não bloqueia a progressão das polimerases replicativas e não pareia erroneamente durante a replicação celular. Quando se compara a alquilação N⁷-meG e O⁶-meG, o segundo tipo de lesão é notavelmente mais citotóxica, pois pode parear erroneamente com a timina durante a replicação celular e causar a sua parada (FU; CALVO; SAMSON, 2012).

Dentre as principais vias de reparo envolvidas na citotoxicidade da TMZ se destacam a via de reparo por reversão direta com a enzima metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) que remove o aduto O⁶-MeG da guanina, a via de reparo por mal emparelhamentos (*MMR-Mismatch repair*) e a via de reparo por excisão de base de DNA (*BER- Base excision repair*) que remove as N⁷-MeG e N³-MeA, quantitativamente mais abundantes (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

1.4 MECANISMO DE REPARO

1.4.1 Mecanismo de Reparo e Resistência a Temozolamida

A citotoxicidade da TMZ é principalmente mediada por O⁶-MeG, uma lesão mutagênica e tóxica (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). A enzima MGMT remove o aduto da guanina restaurando-a, promovendo assim a reparação do dano. Em contrapartida, a não reparação da alquilação de O⁶-MeG com timina durante a replicação do DNA sinaliza a ativação do reparo por MMR que resultará em ciclos de reparo ineficientes levando ao processo de apoptose. Logo, uma resposta eficiente a TMZ requer, MMR funcional e baixos níveis de MGMT (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). As lesões na posição N⁷-MeG são potencialmente citotóxicas, em contraste, as lesões N³-MeA são letais, se não corrigidas. Apesar de cerca de 70% das lesões alquilantes no DNA serem na N⁷-metil-guanina (7meG), estas não representam potencial citotóxico ou mutagênico. No entanto, quando sofrem depurinação espontânea ou processamento por uma DNA glicosilase formam sítios apurínicos/apirimidínicos que são tóxicos e mutagênicos. N³- metil-adenina (3meA) representa de 10-20% das lesões alquilantes, ao contrário da primeira, esta lesão é altamente citotóxica uma vez que é capaz de inibir a síntese de DNA por sua habilidade de bloquear DNA polimerases (DRABLØS et al., 2004; FU; CALVO; SAMSON, 2012). Bem menos frequente que as anteriores, O⁶-metilguanina (O⁶meG) provoca a maior parte dos efeitos citotóxicos e mutagênicos dos agentes alquilantes por permitir

o emparelhamento errôneo com a timina durante a replicação celular (FU; CALVO; SAMSON, 2012).

Portanto, os sistemas de reparo de DNA mais importantes que afetam a citotoxicidade da TMZ são MGMT (reparo direto), MMR e BER (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012). O mecanismo de reparação do DNA por reversão do dano pela proteína MGMT é reconhecido como um fator relevante na sobrevivência de pacientes com GBM (HEGI et al., 2005). A hipermetilação na região promotora do gene MGMT causa a sua inativação que resulta num melhor prognóstico após a terapia de TMZ com radiação quando comparado apenas com radiação, pois os pacientes apresentam uma grande sensibilidade a este fármaco nessa condição (HEGI et al., 2005). Infelizmente, os tumores de GBM apresentam resistência ao tratamento com TMZ e esta resistência não é explicada totalmente pela atuação da MGMT. A terapia com TMZ também produz lesões como a ⁷meG ou a ³meA, e ambas podem levar à citotoxicidade.

1.4.2 Reparo por excisão de base de DNA (BER)

A via do BER é um complexo conjunto de reações enzimáticas com função de controle de danos contra lesões devido ao metabolismo celular (por exemplo, metilação ou oxidação de bases de DNA) e contra modificações de bases determinadas por agentes físicos ou químicos (MAYNARD et al., 2009). O aumento da mutagênese e a incidência de tumores são observados em modelos animais deficientes no BER (ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

O processo de reparo é iniciado pelo reconhecimento e excisão de bases danificadas pelas glicosilases que são específicas para um número limitado de bases modificadas e, ainda, podem ser ou não associadas com atividade de 3'-AP liase. A presença da atividade de liase (glicosilase bifuncional) possibilita a excisão no sítio AP com incisão 3', já a glicosilase monofuncional resulta numa excisão no sítio AP sem a incisão 3' (Fig 2). Esse sítio apurinérgico/apirimidinico (abásico) resultante é adicionalmente clivado pela endonuclease apurinica / apirimidinica (APE1) que cliva a cadeia no local 5' do sítio abásico, gerando uma lacuna e deixando na fita danificada uma extremidade 3' OH e outra 5' desoxirribose-fosfato (5'dRP) (MARCHESI et al., 2007; SOBOLT et al., 2003; ZHANG; F.G. STEVENS; D. BRADSHAW, 2012).

Após a remoção da base o reparo pode seguir através de duas vias: a via curta (Short-Patch Repair) que envolve a substituição de um nucleotídeo, ou a via longa (Long-Patch Repair) que envolve preenchimento de 2-10 nucleotídeos. Na via curta de BER, o espaço de nucleotídeo único é preenchido por DNA polimerase β (pol β) que hidrolisa a 5'dRP e preenche a lacuna deixada na fita, para que ocorra a ligação pela DNA ligase III. Sendo esse processo auxiliado pela

proteína XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) que desempenha a função de recrutar e agrupar as proteínas que executam o processo. Já na via longa de reparo o segmento de DNA é reparado pelas DNA polimerase β , δ ou ϵ , e pela DNA ligase I (Fig. 2) (SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003).

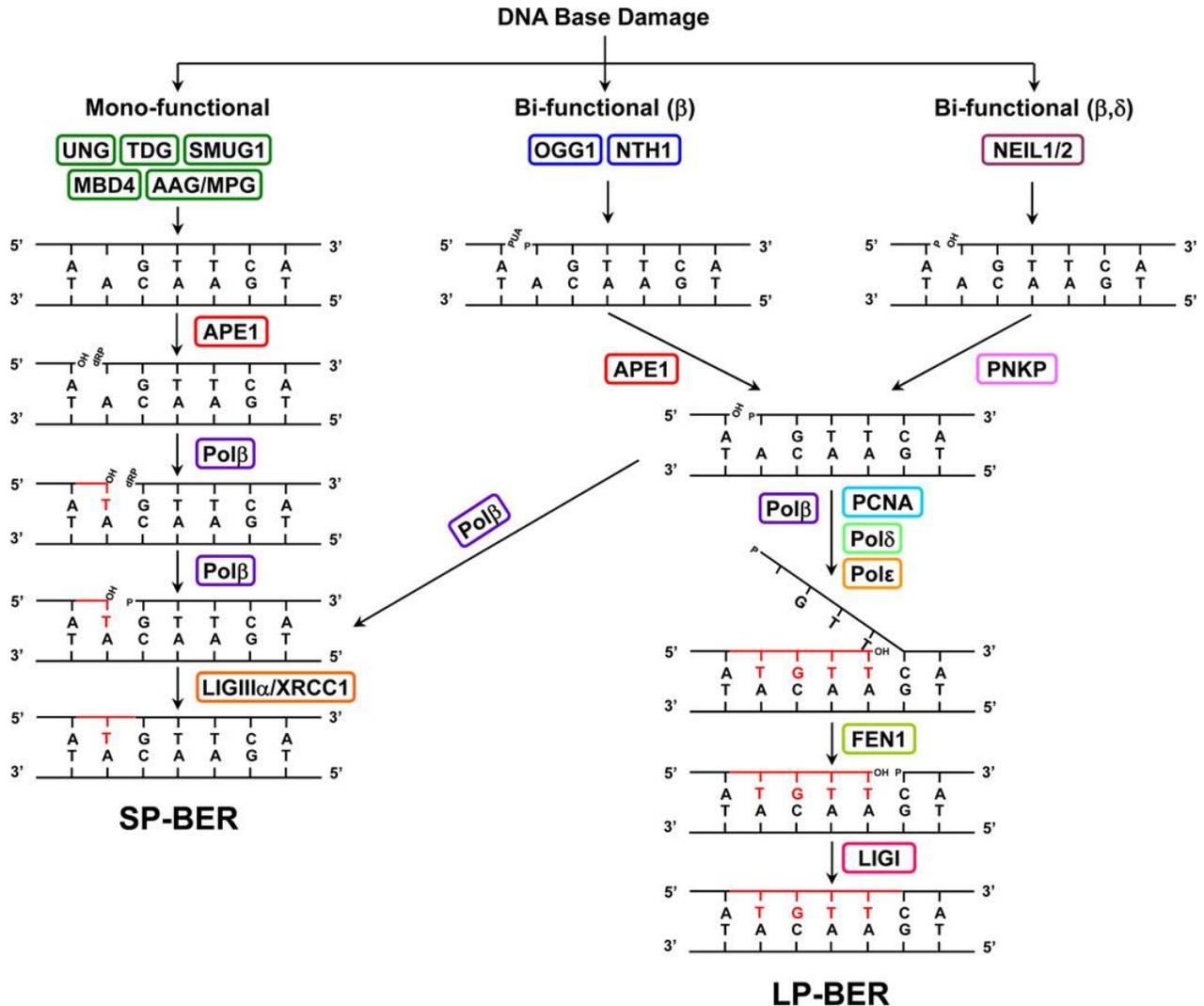


Figura 2: Via alternativa de BER. Via curta: iniciada pela glicosilase bifuncional (hOGG1) ou monofuncional (UNG). Os sítios AP não modificados conduzem a uma via de reparação pela pol β que liga novos nucleotídeos, e posteriormente é realizada a ligação. Via Longa: Os sítios AP reduzidos ou oxidados são processados através da via dependente de PCNA e envolve a clivagem de uma parte de dois a oito nucleotídeos pela FEN1. Adaptada de (KIM; WILSON III, 2013).

1.5 ALQUILADENINA DNA GLICOSILASE

A enzima glicosilase conhecida como Alquiladenina DNA Glicosilase (AAG), também chamada de MPG (*N-methylpurine DNA glycosylase*) ou APNG (*enzyme alkylpurine-DNA-N-glycosylase*), inicia o processo de reparação de base para bases alquiladas. Esta é responsável pelo reconhecimento e início do processo de BER, através da hidrólise da ligação N-glicosídica para liberar as bases de purina danificadas pela alquilação, formando um sítio abásico no DNA (SOBOLT et al., 2003). Após o processamento por enzimas subsequentes na via, será inserido um nucleotídeo complementar levando a restauração da quebra na fita. Neste processo, iniciado por AAG, após a quebra de fita simples há a presença de terminos 3'-hidroxila (3'OH) e 5'deoxyribose fosfato (5'dRP) que são tóxicos e depende da atividade liase de DNA poli β para uma reparação bem sucedida (SOBOLT et al., 2003). Por conseguinte, a falha no mecanismo levará a níveis aumentados de danos no DNA e problemas na homeostase celular e do organismo (LEE CY, 2010; SOBOLT et al., 2003). A importância da AAG foi demonstrada utilizando modelos animais em que Aag foi ausente (knock-out) ou super-expressa. Nestes se evidencia que a super-expressão desta enzima pode levar à citotoxicidade e que animais e tecidos deficientes em Aag são mais resistentes ao tratamento com agentes alquilantes (CALVO et al., 2012, 2013, MEIRA et al., 2008, 2009). Outro dado que colabora com esse argumento é a análise do dano celular induzido por isquemia/reperfusão, onde animais "Aag knock-out" são também mais resistentes a isquemia/reperfusão (EBRAHIMKHANI et al., 2014). Recentemente, também foi demonstrado que a expressão de AAG é um fator determinante na sobrevivência global de pacientes com glioblastoma (AGNIHOTRI et al., 2012).

Além de levar a danos no DNA, agentes alquilantes podem levar a lesões em outras macromoléculas como RNA e proteínas. A análise transcriptômica realizada em fígados de camundongos proficientes (wild-type) e deficientes (Aag knock-out) que foram tratados com um agente alquilante modelo metanossulfonato de metila (MMS), demonstrou um número superior de transcritos nos fígados "wild-type" tratados comparados aos deficientes em Aag. Estes resultados indicam um papel crucial desta enzima na resposta transcricional induzida pelo tratamento alquilante (Milano, 2018 submetido). Ainda, as análises de enriquecimento destes transcritos mostram que a indução de transcritos relacionados ao estresse do retículo endoplasmático (RE) foi detectada de forma Aag-dependente. Estes dados sugerem que a enzima Aag pode estar modulando o estresse no RE e uma possível relação entre vias de reparo, como o processo de BER, com a regulação da indução de estresse no RE.

1.6 RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela de células eucarióticas que consiste em um labirinto de túbulos ramificados e de vesículas achatadas que se estendem através do citosol (VOELTZ; ROLLS; RAPOPORT, 2002). Essa organela desempenha um papel fundamental na biossíntese de lipídeos e de proteínas, além de atuar como uma fonte de reserva de cátions de cálcio (Ca^{2+}) que é utilizado por muitas células na sinalização de respostas (ALMANZA et al., 2018; CHAUDHARI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2018). A membrana do RE é o local onde é produzida todas as proteínas transmembrana e lipídeos para a maioria das organelas celulares, incluindo o próprio RE, o aparelho de Golgi, os lisossomos, os endossomos, as vesículas secretoras e a membrana plasmática. Também é responsável pela produção da maioria dos lipídeos para membranas mitocondriais e peroxissomais (ALMANZA et al., 2018). Outro papel importante é a incorporação ao lúmen do RE de quase todas as proteínas que serão secretadas para o exterior celular, ou seja, secretadas para o aparelho de Golgi ou aos lisossomos, inclusive a incorporação daquelas que são destinadas ao próprio lúmen do RE (ALMANZA et al., 2018).

No lúmen do RE estão presentes dois tipos diferentes de perfis de proteínas: as que estão em trânsito a outros destinos e as residentes no RE. Algumas dessas proteínas residentes agem cataliticamente para auxiliar as muitas proteínas que são transportadas para o RE a enovelar-se corretamente. Uma dessas proteínas residentes é a proteína dissulfeto isomerase (PDI) que catalisa a oxidação de grupos sulfidril (SH) livres nas cisteínas para formar ligações dissulfeto (S-S). Essas ligações S-S irão colaborar com a troca aleatória das ligações dissulfeto nas proteínas até que estas formem seus pares dissulfetos nativos, facilitando assim o dobramento correto das proteínas que desnaturam na ausência de ligações dissulfeto ativas (KHAN; SIDDIQUI; SALAHUDDIN, 2016) Outra proteína residente do RE que se deve destacar é a BiP (binding immunoglobulin protein), pertencente à família das Hsp70 que são chaperonas moleculares denominadas *proteínas de choque térmico* (*Hsp, heat shock proteins*), responsáveis pelo auxílio na translocação de proteínas ao lúmen do RE. Esta chaperona se deposita na cadeia polipeptídica da proteína em translocação, à medida que esta emerge do poro para o lúmen do RE. Esse transporte unidirecional é sustentado por ciclos de ligação e liberação de BiP (ALBERTS, 2009). Além disso, a BiP, como outras chaperonas, reconhece proteínas enoveladas incorretamente, bem como subunidades proteicas que ainda não se agregaram aos seus complexos oligoméricos finais e atua ligando-se à sequência de aminoácidos exposta, que em proteínas enoveladas corretamente estaria oculta no interior das cadeias polipeptídicas (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). A BiP ligada impede a agregação de proteínas e auxilia na manutenção

delas no RE, evitando o seu avanço ao aparelho de Golgi e das etapas posteriores da via secretora (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008).

O RE sendo uma organela multifuncional que acumula diferentes funções desde a modulação da estrutura correta das proteínas, promoção da síntese de lipídeos, esteróis e a manutenção do cálcio intracelular é, também, dependente de perturbações na homeostase celular (ALMANZA et al., 2018). Estas perturbações são desencadeadas por diferentes tipos de estresse, como por exemplo, danos químicos, mutações gênicas, insuficiência de nutrientes, diferenciação celular e também infecções por diferentes patógenos, distúrbios na homeostase de cálcio, estresse oxidativo e/ou por acúmulo de colesterol e ácidos graxos. A ocorrência de um determinado estresse pode causar alterações na estrutura das proteínas nascentes levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, que levarão a ativação de uma cascata de sinalização celular em resposta ao estresse com o objetivo de restaurar a homeostase celular, sendo denominada de resposta de proteína desenovelada (UPR, *Unfolded-Protein Response*) (CHAUDHARI et al., 2014).

1.7 RESPOSTA DE PROTEÍNAS DESENOVELADAS (UPR)

A UPR integra três principais vias de transdução de sinal iniciadas pelas proteínas transmembrana da UPR do RE proximal: o “*inositol-requiring kinase 1*” (IRE1 α), “*activating transcription factor 6*” (ATF6) e “*protein kinase-like ER kinase*” (PERK). Estas proteínas de UPR são reguladas negativamente pela chaperona BiP que em condições de não estresse estão presentes ligadas ao terminal amino dessas proteínas. Quando em situação de estresse, no qual há acúmulo de proteínas desenoveladas, a BiP se dissocia dessas proteínas o que permite o desencadeamento da UPR por meio das três proteínas sensoras citadas (CHAUDHARI et al., 2014).

1.7.1 Sinalização por IRE1 α

IRE1 α contém dois domínios: um cinase serina/-treonina (Ser/Thr) e um endorribunuclease C-terminal. Na presença de proteínas desenoveladas BiP desliga-se de IRE1 α e desencadeia a via que tem início através da homo-oligomerização de IRE1 α ativando e abrindo o domínio de cinase Ser/Thr no terminal carbóxico citosólico e dessa forma permitindo sua autofosforilação, que então ativa o domínio de endorribunuclease (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). O mRNA de XBP1 (*X-box-binding protein 1*) é processado de forma não convencional pelo domínio de

endorribonuclease de IRE1 α , removendo um íntron de 26 nucleotídeos para produzir o mRNA que codifica o fator de transcrição XBP1s (*XBP1 spliced*) pertencente à família b-ZIP (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2016). Após a clivagem por IRE1 α , XBP1s transloca-se para o núcleo para induzir a transcrição de uma gama de genes alvos de UPR que auxiliam na síntese e secreção de proteínas (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). Estes incluem a proteína EDEM de degradação associada ao RE (ERAD - ER-associated degradation); chaperonas localizadas no RE, tais como DNAJ4 localizada no RE (ERDNAJ4 -RE-localized DNAJ4), DNAJ associado ao RE humano (HEDJ-human ER-associated DNAJ) e p58IPK (também conhecido como DNAJC3); proteína de glicosilação da proteína de membrana 4 associada a ribossoma (RAMP4- ribosome-associated membrane protein 4); e proteína dissulfeto isomerase P5 (PDI P5), que facilita a formação de ligações dissulfureto (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). Além de induzir a transcrição de genes que auxiliam na síntese e secreção de proteínas nas células, a XBP1s aumenta a biossíntese de lipídios e a biogênese do RE (CHAUDHARI et al., 2014; TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). Outra função desempenhada pela IRE1 α ativada é a sua ligação ao fator associado ao receptor TNF 2 (fator de necrose tumoral) o TRAF2, uma proteína adaptadora que promove a ativação da cinase N-terminal JUN (JNK) através da regulação da cinase 1 pelo sinal de regulação da apoptose (ASK1) (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). Isso pode permitir que as células se adaptem ao estresse, iniciando a autofagia que pode atuar a favor da sobrevivência celular eliminando as organelas danificadas em condições de privação de nutrientes. Além disso, a ativação da JNK pode promover a apoptose em células com níveis irreversíveis de estresse de RE através da ativação de caspases, especificamente a caspase-12 (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008).

1.7.2 Sinalização por PERK

A PERK é uma proteína transmembranar de tipo I com um domínio luminal no RE que se assemelha ao do IRE1 α e um domínio citoplasmático que possui atividade de proteína cinase. Semelhante ao IRE1 α , a porção luminal no RE da PERK está ligada a BiP nas células em condições normais e atua como um sensor de estresse no RE. Quando BiP dissocia-se de PERK, esta é ativada no domínio PERK cinase e inicia a transfosforilação de outras moléculas de PERK promovendo a sua oligomerização. (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2016). A PERK também fosforila e inativa o fator de iniciação da tradução eucariótica 2 α (EIF2 α ; também conhecido como EIF2S1), interrompendo assim a maioria da tradução de mRNA para aliviar fontes adicionais de estresse ao RE (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). EIF2 α por sua vez, quando fosforilado, aumenta os níveis de expressão do fator ativador de transcrição 4 (ATF4), um membro da família de fatores de

transcrição das proteínas de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB - cAMP response element binding protein) (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). ATF4 é um fator de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos no enovelamento de proteínas, respostas antioxidantes, autofagia, metabolismo de aminoácidos e apoptose (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). Esta indução traducional de ATF4 aumenta a transcrição de vários genes centrais da sobrevivência celular e de UPR, regulando positivamente a transcrição de genes, como a CHOP (*CCAAT/enhancer binding protein homologous protein*, também conhecida como GADD153 e DDIT3) (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). CHOP tem ação relacionada a apoptose, direcionando a célula para morte celular programada no caso de níveis irrecuperáveis de estresse no RE. CHOP promove tanto a transcrição do BIM (*mediator of cell death*) quanto a regulação negativa da expressão de BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) que interage com BIM, contribuindo para a indução da apoptose (HETZ, 2012). A ATF4 também aumenta a transcrição de genes relacionados ao feedback negativo no eixo de PERK, como o gene 34 de dano ao DNA e parada de crescimento (GADD34), através de desfosforilação mediada por GADD34 de eIF2 α (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008). Outro aspecto interessante da ativação de ATF4 é a indução da transcrição de genes UPR que estão envolvidos no metabolismo de aminoácidos e respostas ao estresse oxidativo (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2016).

1.7.3 Sinalização por ATF6

O ATF6 é um fator de transcrição ancorado à membrana transmembrana de tipo II cujo domínio contém um motivo bZIP em sua porção citosólica e sua ativação controla principalmente o mecanismo envolvido no enovelamento de proteínas e controle de qualidade do RE. O domínio luminal de RE de ATF6 contém sequências de localização no complexo de Golgi, mas estas são encobertas pela ligação de BiP sob condições de não estresse. O estresse de RE induz a dissociação de BiP de ATF6, resultando na translocação de ATF6 α para o complexo de Golgi, onde é sequencialmente clivado pelas proteases de sítio 1 e sítio 2 (S1P e S2P), e seu domínio citoplasmático é liberado. O fragmento de ATF6 citoplasmático (ATF6f) transloca-se então para o núcleo, onde ativa a transcrição de seus genes alvos como BiP e XBP1 (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2016).

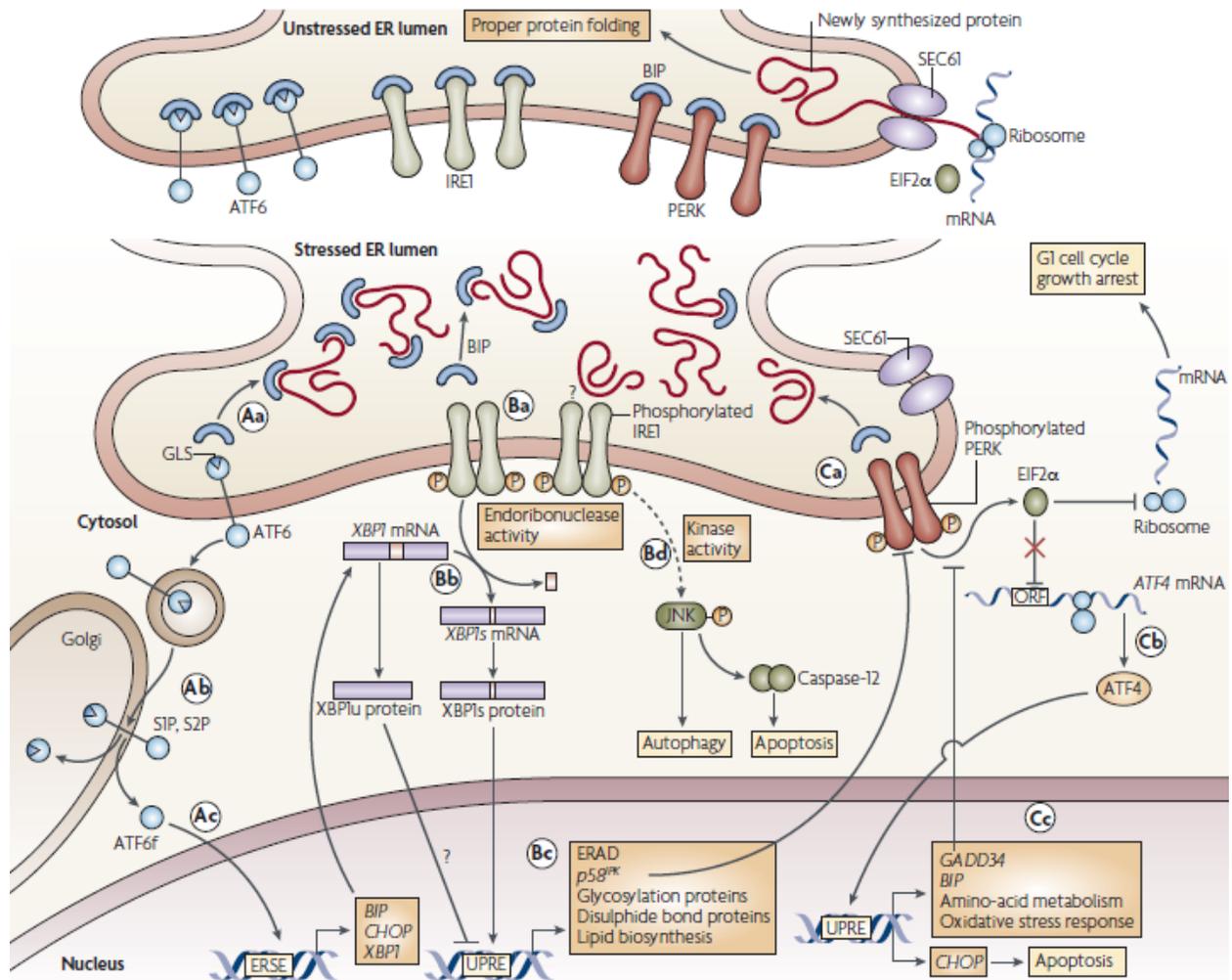


Figura 3: Complexidade e interferentes nos três eixos da resposta de proteína desenvolvida. Em condições normais BIP liga-se e inibe as três proteínas do RE. Em condições de UPR, BiP se dissocia ativando ATF6(Aa), IRE1 α (Ba) e PERK(Ca). A | A liberação do BIP expõe uma sequência de localização do Golgi (GLS) dentro de ATF6 (Aa), visando a molécula para o Golgi. No Golgi, o ATF6 é sequencialmente clivado pelas proteases local-1 (S1P) e S2P (Ab). Isso libera o fator de transcrição do fragmento ATF6 (ATF6f), que se transloca para o núcleo, e se liga aos elementos de resposta ao estresse RE (ERSE) e induz a transcrição de vários genes, incluindo BIP, CHOP e XBP1 (Ac). B | A dissociação de BIP do IRE1 α permite homodimerização e ativação de IRE1 α por autofosforilação. O IRE1 α fosforilado possui atividade de endorribonuclease que processa mRNA de XBP1 (Bb). Proteína XBP1s transloca-se para o núcleo, onde se liga a elementos UPR (UPREs) e ativa muitos genes que são cruciais para a secreção e função RE. O IRE1 α fosforilado também leva a ativação da quinase JNK através do TRAF2 (fator 2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TNF) que pode promover a sobrevivência celular por indução de autofagia ou pode levar a morte celular programada através de vias de apoptose mediada por caspase-12 (Bd). C PERK é ativado por autofosforilação após a liberação do BIP, após fosforilada também fosforila a eIF2 α , causando parada translacional da maioria das proteínas e subsequente parada do crescimento do ciclo celular (Ca).

No entanto, ATF4 escapa da supressão translacional, pois possui ORFs (Cb). ATF4 se transloca para o núcleo, onde ele ativa um terceiro conjunto de genes alvo de UPR (Cc). Estes incluem GADD34, feedbacks para inibir PERK, e CHOP, que pode induzir a apoptose em células com níveis irrecuperáveis de estresse no RE. Adaptada de (TODD; LEE; GLIMCHER, 2008).

1.7.4 Estresse no Retículo Endoplasmático e Câncer

O estresse do RE está presente na patogênese de várias doenças, incluindo câncer, autoimunidade, diabetes, isquemia e neurodegeneração (HETZ, 2012). O desencadeamento de UPR acontece em decorrência a um determinado estresse, como o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, porém quando ativada a UPR restaura a homeostase do RE. Em alguns casos a UPR não consegue lidar com esse estresse e pode ativar processos de apoptose ou autofagia. Esses processos podem atuar ora proporcionando maior sobrevivência a células tumorais e ora promovendo a morte dessas células (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2016). O mecanismo molecular que ativa a apoptose ou autofagia ainda não está bem elucidado, por isso vem sendo alvo de muitas pesquisas. A sinalização de estresse de RE é desregulada em muitas formas de cânceres e contribui para o crescimento do tumor como um fator de sobrevivência, além de modular outros processos associados a doenças, incluindo migração celular, transformação celular e angiogênese (CHEVET; HETZ; SAMALI, 2016).

Em estudos recentes, tem sido demonstrado que fármacos indutores do estresse no RE têm sido úteis como tratamentos coadjuvantes na terapia de cânceres como o mieloma. Outro estudo, ainda, aponta o envolvimento do estresse no RE na degradação de Rad51, uma proteína de reparo de DNA que desempenha um papel fundamental na resposta à radioterapia. Este exemplo, sugere que outras proteínas de reparo de DNA podem ser moduladas pelo estresse RE (XIPELL et al., 2016).

1.8 INDUTORES DE ESTRESSE NO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

1.8.1 Salinomicina

A molécula da Salinomicina (SLN) (Fig. 4) foi inicialmente isolada da espécie de bactéria *Streptomyces albus* e foi inicialmente caracterizada por apresentar atividade antibacteriana, especialmente contra bactérias gram-positiva. Posteriormente, também apresentou atividade antifúngica, antiparasitária, antiviral e anti-inflamatória. A SLN é um ionóforo que mostra afinidade

por íons alcalinos, preferencialmente os íons potássio (DEWANGAN; SRIVASTAVA; RATH, 2017). Essa propriedade facilita o fluxo iônico através da membrana citoplasmática e da membrana mitocondrial, funcionando como um transportador móvel que descarrega K^+ rapidamente. Essa molécula também facilita o transporte de outros cátions como o Na^+ , Ca^{2+} , e Mg^{2+} através da membrana celular o que acaba aumentando os níveis de cálcio e desencadeando um desequilíbrio osmótico (ZHOU et al., 2013).

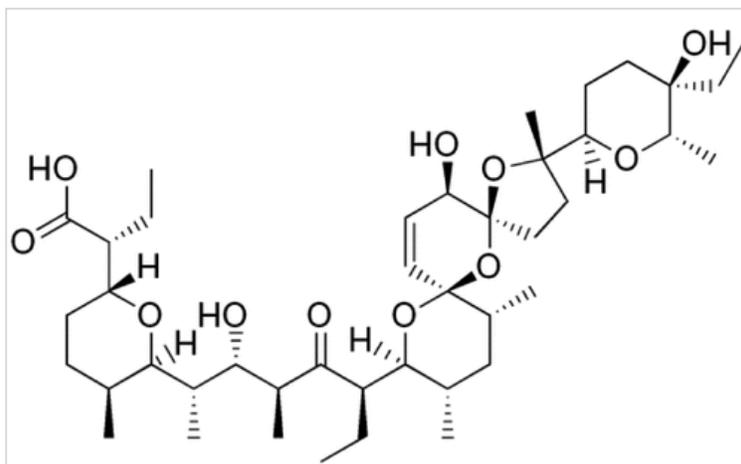


Figura 4: Estrutura da Salinomicina.(DEWANGAN; SRIVASTAVA; RATH, 2017)

Estudos recentes mostram que a SLN possui atividade antitumoral. Por exemplo, foi capaz de obter uma atividade 100 vezes superior à atividade do fármaco antitumoral paclitaxel, que atua através da ligação tubulina dos microtúbulos impedindo a divisão descontrolada da célula, num estudo com células-tronco do câncer de mama (ZHOU et al., 2013) e também induziu a apoptose em células T humana $CD4^+$ de leucemia aguda (FUCHS et al., 2009). A SLN também foi capaz de reduzir uma subpopulação de células mesenquimais do carcinoma de células escamosas que apresenta resistência a cisplatina, expressando alto ou baixos níveis de E-caderina *in vitro* (BASU et al., 2016). Também induziu apoptose em células de carcinoma hepatocelular humano e resposta autofágica em células de câncer de próstata e mama (REDDY et al., 2013; WANG et al., 2012).

O papel da SLN na indução de autofagia é abordado por *Li* (LI et al., 2013) mostrando que células humanas NscLc (non-small cell lung cancer) tratadas com SLN além de induzirem o processo de autofagia também estimulavam o estresse no RE. A autofagia foi mediada através do eixo ATF4-DDIT3 / chOP-TRiB3-AKT1-MTOR e descobriu-se que a autofagia induzida pela SLN estimulava a sobrevivência em células humanas NscLc e atenuava a cascata apoptótica (LI et al., 2013). SLN também desencadeou mais apoptose e menos autofagia em células A549 nas quais a expressão de CDH1 foi inibida, sugerindo que a inibição da autofagia pode representar uma

estratégia promissora para atingir as células-tronco Tumorais (LI et al., 2013). Em um estudo de *Jangamreddy* (JANGAMREDDY et al., 2009) também é mostrado o envolvimento de SLN na indução de autofagia. Neste estudo o tratamento de células cancerígenas com SLN sob condições de privação de glicose e soro não apenas aumentou a atividade da caspase apoptótica, como também diminui a autofagia protetora normalmente desencadeada pelo tratamento com SLN isolada (JANGAMREDDY et al., 2009).

1.7 AUTOFAGIA

A autofagia consiste num processo de degradação pelos lisossomos que visa o descarte de estruturas supérfluas ou danificadas da célula, como material citoplasmático e organelas. Esse processo de degradação, além de desempenhar o importante papel de manter as funções básicas da célula no equilíbrio, também atua na reestruturação das células, descartando partes desnecessárias no processo de diferenciação e no auxílio ao sistema imunitário na defesa contra vírus e bactérias invasoras. Através desse mecanismo a célula é capaz de remover organelas inteiras ou grandes agregados proteicos (ESKELINEN; SAFTIG, 2009).

O mecanismo de autofagia é ativado quando em ambiente de estresse, como falta de aminoácidos, resposta a proteínas desenoveladas ou infecção viral (ESKELINEN; SAFTIG, 2009). O mecanismo pode ser classificado conforme a via de entrega do material citoplasmático ao lúmen do lisossomo. Essas rotas são: a macroautofagia (que será denominada apenas autofagia), microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (ESKELINEN; SAFTIG, 2009). Na primeira, a macroautofagia ocorre a nucleação e extensão da membrana delimitante em uma estrutura de forma crescente que engolfa uma porção do citoplasma. Posteriormente, ocorre o fechamento dessa estrutura que é limitado por uma membrana dupla onde o conteúdo a ser degradado é envolvido dentro de uma organela especializada, o autofagossomo. Este autofagossomo se funde com as vesículas lisossômicas e a digestão da membrana interna do autofagossomo e de seu conteúdo se inicia (Figura 5) (ESKELINEN; SAFTIG, 2009). A microautofagia refere-se ao englobamento de componentes celulares diretamente pelos lisossomos. Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas alvo são translocadas através da membrana lisossômica em um complexo com proteínas chaperonas tais como Hsc-70 (heat shock cognate 70), que quando associadas são reconhecidas por um receptor de membrana lisossômica LAMP-2A (proteína de membrana associada ao lisossomo 2A), resultando na degradação (OKU; SAKAI, 2018).

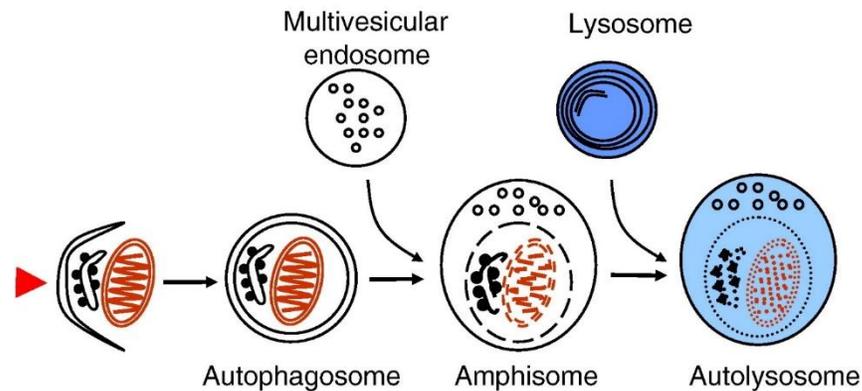


Figura 5: Apresentação esquemática da formação de autofagossomos e maturação por fusão com endossomos e lisossomos. Nucleação e extensão da membrana delimitante em uma estrutura de forma crescente que engolfa uma porção do citoplasma. Fechamento, formando o autofagossomo que se funde com as vesículas lisossômicas e ocorre a progressão da digestão da membrana interna do autofagossomo e de seu conteúdo. Adaptada de (ESKELINEN; SAFTIG, 2009).

Esse complexo processo é regulado pelas proteínas da família Atg, que exercem suas funções de acordo com fases específicas do processo. De maneira simplificada, a Atg 1 é uma serina-treonina quinase que funciona na via de sinalização ativando a autofagia. A Atg6 funciona na via de sinalização ou no início da formação de autofagossomos, cujo homólogo mamífero é a Beclin 1. A Beclin 1 pode se associar a genes como o UVRAG (gene associado a resistência a irradiação UV) e induzir a autofagia ou, também, pode associar-se as proteínas proto-oncogênicas Bcl-2 e Bcl-XL inibindo a formação de autofagossomos. Outros dois sistemas de conjugação importantes para a formação do autofagossomo são os sistemas Atg12-Atg5 e Atg8-fosfatidil etanolamina. O sistema associado Atg12-Atg5 auxilia a formação do autofagossomo, mas não está presente nos autofagossomos, após a sua estrutura estar fechada. Atg8 (LC3 em mamíferos) também auxilia a formação de autofagossomos, possivelmente aumentando a fusão de membranas e está presente dentro da estrutura. A LC3 solúvel é chamada LC3-I e a forma lipídica, específica do autofagossomo, é chamada LC3-II. A LC3-I se liga à fosfatidil etanolamina lipídica em reações intermediadas por Atg4, Atg7 e Atg3. Nessas reações o terminal carboxílico de LC3-I é clivado por Atg4 para expor um resíduo de glicina. Já Atg7 e Atg3 auxiliam na conjugação com o lipídio. Acredita-se que o lipídio ancore o Atg8 / LC3-II nas membranas (ESKELINEN; SAFTIG, 2009; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010)

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Intenção de submissão ao periódico “DNA Repair”, elaborado conforme suas normas de padronização.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA DEFICIENTES E PROFICIENTES EM AAG AO TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA EM COMBINAÇÃO COM AGENTES INDUTORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Caroline Gonçalves Vieira^a, Larissa Milano de Souza^{ab}, Lisiane Meira^b, João Antônio Pêgas Henriques^a

^aDepartamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^bDepartamento de Medicina Clínica e Experimental, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, UK

Autor Correspondente:

Caroline Gonçalves Vieira

Caroline.gvieira@gmail.com

Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos, Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43431 – Lab. 114, Bairro Agronomia, CEP 915001970, Porto Alegre-RS

RESUMO

A enzima alquiladenina DNA glicosilase (AAG) possui um importante papel no desenvolvimento de mecanismo de resistência frente ao tratamento do glioblastoma multiforme por Temozolamida (TMZ). A AAG é uma glicosilase que inicia o reparo por excisão de bases (BER) induzido pelo agente alquilante TMZ que gera lesões no DNA, como a 3meA e 7meG. A indução de estresse no retículo endoplasmático é principalmente mediada por acúmulo de proteínas desenoveladas e tem sido relatado como estratégia no tratamento antitumoral. O estresse do RE ativa a resposta a proteínas desenoveladas (UPR-unfolded protein response) que ativa diferentes eixos, como IRE1 α , ATF6 e PERK. Esses eixos são responsáveis modular uma resposta celular complexa com o objetivo de resolver esse estresse. Neste trabalho, procuramos avaliar se os fármacos indutores do estresse de RE eram capazes de alterar a sobrevivência e viabilidade celular quando combinados TMZ em células de glioblastoma (GBM) com diferentes níveis de AAG. AAG foi capaz de modular a resposta frente ao tratamento com Salinomicina (SLN) e TMZ. AAG também parece desempenhar um papel importante no desencadeamento de UPR, mostrando que o nível de sua atividade pode modular diferentes eixos de UPR. A indução de um fluxo autofágico também parece ser dependente da atividade de AAG. Esses achados indicam o envolvimento de AAG na ativação do UPR, além de sugerirem que a combinação de TMZ com drogas indutoras de estresse de RE pode ser utilizada como uma estratégia terapêutica alternativa para o GBM.

Palavras-chave: Alquiladenina DNA glicosilase, Salinomicina, Temozolamida, Reparo por excisão de bases (BER), Resposta de proteína desenovelada (UPR).

1. Introdução

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor primário adulto mais prevalente e agressivo do sistema nervoso central, cujas características incluem proliferação celular descontrolada, infiltração difusa, resistência à apoptose, angiogênese robusta e instabilidade genômica [1]. Atualmente o tratamento padrão inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia com Temozolomida (TMZ) [2]. A TMZ é um agente alquilante oral que insere grupos metila nos nucleotídeos guanina e adenina, danificando as bases do DNA, apresentando um caráter tóxico e mutagênico [3]. A citotoxicidade da TMZ é principalmente mediada por: O⁶-MeG, representando 5-10% das lesões, N³-MeA que representa 10-20% das lesões e N⁷-MeG contabilizando de 60-80% das lesões induzidas [3]. Diferentes vias de reparo de DNA como o reparo por reversão direta pela enzima metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) e o pelo reparo de excisão de base de DNA (BER) protegem as células contra as lesões causadas pela TMZ. A MGMT remove o aduto de O⁶-MeG, restaurando-a. A falha neste reparo permite o emparelhamento de O⁶-MeG com timina durante a replicação do DNA, sinalizando para a ativação do reparo por mal emparelhamento (MMR-Mismatch repair). A presença de O⁶-MeG na fita molde resultará em ciclos de reparo ineficientes que levarão ao processo de apoptose [3].

As lesões N⁷-MeG e N³-MeA são quantitativamente mais abundantes e rapidamente reparadas pelo BER [3]. A enzima alquiladenina DNA glicosilase ou (AAG,) inicia o BER para danos em bases induzidos por TMZ e é fundamental para as respostas celulares frente ao tratamento alquilante [4]. Após a excisão da base danificada ocorre a formação de um sítio abásico que será subsequentemente processado permitindo a síntese e ligação do DNA. Estas etapas precisam ser coordenadas uma vez que podem gerar substratos tóxicos como sítios abásicos e quebras de fita simples no DNA [4]. Assim, uma ação incompleta desta via tem o potencial de gerar danos ao invés de repará-los.

Ambos mecanismos de reparo podem desempenhar um papel importante na resposta dos GBM a terapia alquilante e afetar a sobrevida dos pacientes. O silenciamento de MGMT, que ocorre pela metilação do seu promotor, resulta na ausência de reparo da lesão O⁶meG e desta forma leva a um melhor desfecho clínico para pacientes tratados com TMZ [4]. Por outro lado, a elevada expressão de AAG e MGMT tem sido associada com a resistência ao tratamento com TMZ [5,6].

Superar esta resistência ao tratamento com TMZ poderia melhorar significativamente o desfecho clínico dos pacientes, assim, estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento de GBMs resistentes a TMZ são necessárias. Dentre as novas estratégias de tratamento antitumoral

investigadas, encontra-se a combinação de agentes alquilantes e a agentes indutores de estresse no retículo endoplasmático (RE) [7].

O RE é uma organela multifuncional, que acumula funções como a modulação da estrutura correta das proteínas, a síntese de lipídeos e esteróis e a manutenção do cálcio intracelular [8]. Perturbações na homeostase celular desencadeadas por diferentes tipos de estresse, como por exemplo, danos químicos, mutações gênicas, insuficiência de nutrientes, desequilíbrio de cálcio e também infecções por diferentes patógenos podem causar alterações na homeostase do RE que desencadeia um estresse nesta organela levando a resposta de proteínas desenoveladas (unfolded protein response, UPR) [9]. Essa resposta inclui a ativação de três eixos principais: IRE1 α (inositol-requiring kinase 1), ATF6 (activating transcription factor 6) e PERK (protein kinase-like ER kinase). A chaperona BiP (binding immunoglobulin protein) é responsável pela ativação desses eixos cuja atividade se dá pela dissociação dessa chaperona frente ao estresse causado pelo acúmulo de proteínas desenoveladas e que está ligada a essas proteínas em condições normais [10].

De forma geral, o UPR tem como função a manutenção da proteostase através de uma resposta altamente regulada que leva a redução da síntese proteica e ao aumento da capacidade de enovelamento do RE [10]. Tal resposta pode ser tanto adaptativa promovendo a sobrevivência celular frente ao estresse de RE moderado, ou frente ao estresse severo que pode levar a morte celular [11]. Além da apoptose, a ativação desta via também induz o processo de autofagia para remover as proteínas mal enoveladas do RE [12].

A salinomicina (SLN) tem sido mostrada como um agente antitumoral promissor devido ao seu potente efeito citotóxico contra células-tronco tumorais [13]. Por se tratar de um agente ionóforo, SLN induz estresse no RE e, dependendo do tipo celular estudado pode desencadear, autofagia, necrose ou apoptose [7]. Em associação com TMZ, este agente indutor de estresse no RE também foi capaz de aumentar a citotoxicidade observada em células de GBM [7].

Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que AAG pode estar envolvida na ativação de UPR frente ao tratamento alquilante [14], assim, este trabalho que buscou avaliar se a modulação de AAG em células de GBM afetaria o aumento da atividade antitumoral de TMZ pela combinação com o indutor de estresse no RE SLN. Nossos resultados demonstraram que a citotoxicidade induzida por SLN combinada a TMZ ocorre pela ativação de UPR de forma AAG-dependente em células de GBM. Ainda, em células que expressam AAG este tratamento combinado leva a morte celular e prejudica o fluxo autofágico.

Portanto, o melhor entendimento de como os diferentes níveis de AAG afetam a resposta ao estresse do retículo endoplasmático e as respostas celulares poderiam promover avanços no diagnóstico, prognóstico e melhorar o tratamento dos pacientes de GBM.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cultivo Celular e tratamentos

Foram utilizadas linhagens celulares e T98-G derivadas de GBM humanos que foram obtidas do banco de células ATCC (American Type Culture Collection, EUA). O silenciamento de AGG na linhagem T98G foi realizado através do sistema de vetores lentivirais expressando o shRNA para AAG, como descrito em Tamajusuku ASK, et al. [15] e [14]. As linhagens foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium, low glucose* (Sigma), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1% de antibióticos e glutamina 2.5 mM (Life Technologies). As culturas celulares foram mantidas em incubadora a 5 % de CO₂ e 37 °C. As linhagens foram periodicamente verificadas quanto à ausência de micoplasma utilizando o kit MycoAlert (Lonza).

As células foram tratadas por 24 horas com o agente alquilante TMZ com uma concentração de 200µM, o agente indutor de estresse no RE a SLN com concentração de 0,1µM e o co-tratamento nas mesmas concentrações. Ademais as células foram tratadas com taspigargina (TP), um indutor de estresse no RE, como controle positivo e com uma concentração de 300nM.

No ensaio de MTS para avaliar a sobrevivência todas as culturas celulares foram pré-tratadas por 24h com uma concentração de 0.1µM SLN. Somente após este período de pré-tratamento, adicionou-se o tratamento com diferentes concentrações de TMZ ou SLN por 5 dias, conforme figura 1.

No ensaio clonogênico as células foram tratadas com TP com concentrações crescentes de 0.1, 1 e 10 nM e/ou TMZ em concentração de 0,2 µM, conforme figura 3.

2.2 Isolamento de RNA e Síntese de cDNA

As células foram cultivadas em garrafas T25 até atingirem 90% de confluência e tiveram o RNA isolado utilizando Pure Link RNA Mini Kit (Life Technologies) conforme sugerido pelo fabricante. A síntese do cDNA foi realizada com o kit Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante, utilizando 1µg de RNA total.

2.3 qPCR Para Marcadores Moleculares do Estresse do Retículo Endoplasmático

A expressão dos transcritos para as proteínas BiP e CHOP, assim como para a quantificação da “spliced form” de XBP1 foi analisada utilizando PCR quantitativa, seguindo etapas de extração do RNA, síntese do cDNA e quantificação do mRNA realizadas como descrito anteriormente. Para amplificação, os seguintes primers foram utilizados: GRP78/BiP fwd 5'-CATGGTTCTCACTAAAA TGAAAGG-3' rev 5'-GCTGGTACAGTAACAACACTG- 3' CHOP fwd 5'-GGTATGAGGACCTGCAAG AGGT3' rev 5'-CTTGTGACCTCTGCTGGT TCTG3' XBP1s: fwd 5'-TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG 3'; rev 5'-GCTGGCAGGCTCTGGGGAA 3'.

2.4 Isolamento e Quantificação de Proteínas

Para análise das expressões das proteínas as células foram lisadas, a concentração de proteína foi quantificada pelo QuantiPro BCA Assay Kit. Uma quantidade de 20 µg dos extratos proteicos foram separados de acordo com o peso molecular em SDS-PAGE a 15%, seguido por eletro transferência para uma membrana de PVDF (Millipore, Bedford, USA). Os locais de ligação não específicos foram saturados através da incubação das membranas em tampão TRIS (TBS) suplementada com 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) e 5% de leite em pó durante 1 h e depois as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo primário específico para PERK humana (PERK (D11A8) Rabbit mAb, Cell Signaling) numa diluição de 1:1000, p62 (Rabbit mAb, Cell Signaling) numa diluição de 1:1000, LC3 (Rabbit mAb, Cell Signaling) numa diluição de 1:1000, Calnexina (Rabbit mAb, Cell Signaling) numa diluição de 1:1000 e anti-β- Actina humana (Anti-βActin, A2228, Sigma Aldrich) na diluição de 1:7000. O anticorpo primário foi detectado incubando-se com anticorpo secundário conjugado a HRP (anti-Rabbit) apropriado (diluição 1: 2000) por 2 h, usando ECL e filmes de raios X (Kodak-Xmat, Rochester, NY, USA). A densidade ótica das bandas foi obtida e quantificada pelo software Image J.

2.6 Ensaio Clonogênico

Para realização do ensaio clonogênico as células foram plaqueadas em uma placa de 6 poços no dia anterior ao tratamento. No dia do tratamento as células foram tratadas com TP diluída em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, em concentrações crescentes de 0,1, 1 e 10 nM e/ou TMZ em concentração de 0,2 µM. Cada dose foi feita em triplicatas experimentais. Após 5 dias de tratamento para TG e TMZ, o meio foi removido e substituído por DMEM completo. As células foram então cultivadas por um total de 15 dias, e tiveram seu meio repostado a cada 6 dias. Finalizado o período, as placas foram lavadas com PBS e depois fixadas com metanol gelado

durante dez minutos. O metanol foi então removido e substituído por uma solução de metanol 50% e 0,5% cristal violeta, durante mais 10 minutos. O cristal violeta foi removido e as placas lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente e armazenadas até sua contagem. Como critérios de contagem foram incluídas todas as colônias compostas por mais de 50 células e poços com menos de 10 colônias foram desconsiderados.

2.7 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erros padrão da média e as análises são resultados de três ou mais experimentos independentes. A ANOVA “Two-way” foi usada para determinar a significância, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni ou Tukey para comparações múltiplas quando apropriado, a significância foi estabelecida em $p \leq 0,05$. Cálculos estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism, versão 6.0.

3.Resultados

3.1 Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento com Temozolamida, Salinomicina e Tapsigargina nas células shAAG (silenciadas)

A avaliação dos efeitos citotóxicos do agente alquilante TMZ co-administrado com um agente indutor de estresse no RE foi realizada previamente através do ensaio de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt), (dados do grupo/ Larissa Milano), no qual realizou-se um pré-tratamento de 24 h com uma dose não letal de SLN 0.1 μM , em seguida as células foram tratadas por 5 dias com a mesma dose de SLN (0.1 μM) combinadas a diferentes concentrações de TMZ. Os tratamentos foram realizados conforme mostra a figura 1.

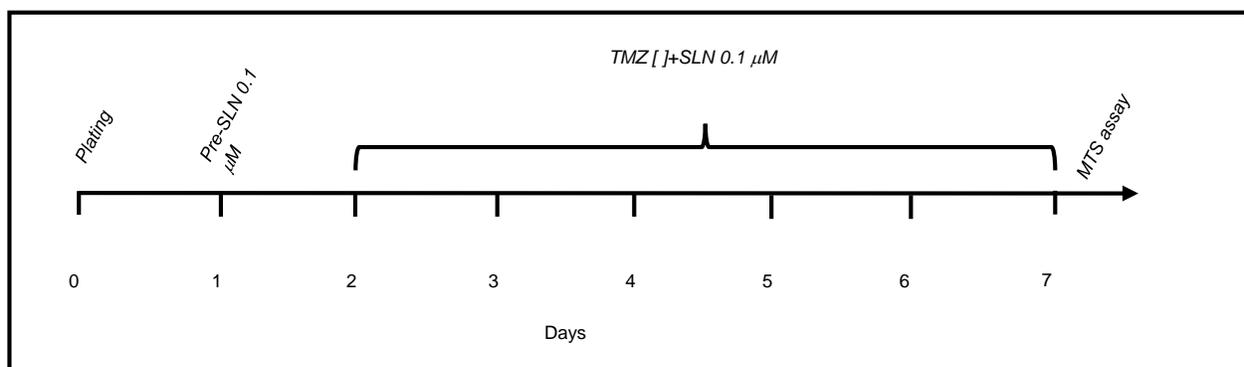


Figura 1. Esquema da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de redução de MTS nos painéis de células modulados para AAG pré-tratadas por 24h com 0.1 μM de SLN e posteriormente com diferentes concentrações de TMZ adicionada de 0.1 μM SLN por 5 dias.

A análise mostrou, como consta na figura 2 (painel A), que o co-tratamento de SLN e TMZ sensibilizou consideravelmente as linhagens controles de T98G (WT e shNS) mesmo em doses muito baixas de TMZ (0.0002 μM) reduzindo a sobrevivência aproximadamente em 50%. No entanto, as linhagens que apresentam baixos níveis de expressão de AAG (T98G shAAG 3) (figura suplementar S1) apresentaram maior resistência a este tratamento, tendo a T98G shAAG3 atingindo 50% de sobrevivência apenas quando utilizada uma alta dose de TMZ 2000 μM . No painel B, da mesma figura, pode-se ver de maneira clara que a redução nos níveis da proteína AAG por silenciamento protege células T98G contra o tratamento combinado de TMZ e SLN. No entanto, células proficientes em AAG são sensíveis ao mesmo tratamento combinado. Logo, essas

células de GBM respondem aos estresses genotóxicos (resultante do tratamento com o agente alquilante TMZ) e proteotóxicos (resultante do estresse RE induzido por SLN) de forma dependente dos níveis de expressão de AAG.

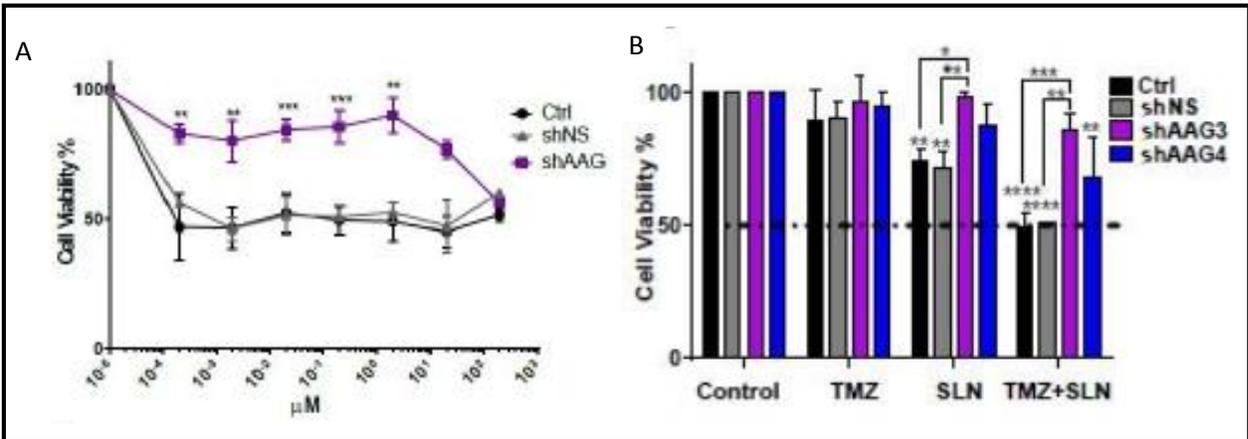


Figura 2. Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento combinado de TMZ e SLN (5 dias) de TMZ em células WT e shAAG (silenciadas). (A) e (B) Linhagens silenciadas apresentaram maior resistência ao tratamento combinado quando comparadas as linhagens controle. *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001, ****P <0.0001.

O padrão de resposta observado nas células de GBM, submetidas a essa abordagem de tratamento sugere uma forte ligação entre a AAG e a indução de estresse no RE. A fim de se investigar se esse padrão de resposta se manteria frente ao tratamento com outros fármacos indutores de estresse no RE, investigou-se como o fármaco TP atuaria em combinação com o agente alquilante TMZ.

A TP é um sesquiterpeno natural pertencente à família das lactonas, essa molécula é capaz de inibir SERCA (retículo sarcoplasmático cálcio ATPase), ou seja, é capaz de bloquear a recaptação de cálcio para o RE [8]. Esse inibidor de SERCA é altamente específico e essencialmente irreversível, e também identificado como um promotor de tumor [8]. Este desequilíbrio dos níveis do íon cálcio no RE, causado pela inibição via TP, irá desencadear uma resposta a este tipo estresse [8]. A avaliação da citotoxicidade em células deficientes e proficientes em AAG foi realizada pelo ensaio clonogênico. Para identificar a ocorrência de sinergismo entre o tratamento com um agente alquilante e um agente indutor de estresse no RE foram usados os fármacos TMZ e TP. O desenho experimental foi realizado conforme a figura 3 (painel A), compondo um total de 15 dias de experimento cujas concentrações utilizadas se encontram, também, na figura 3.

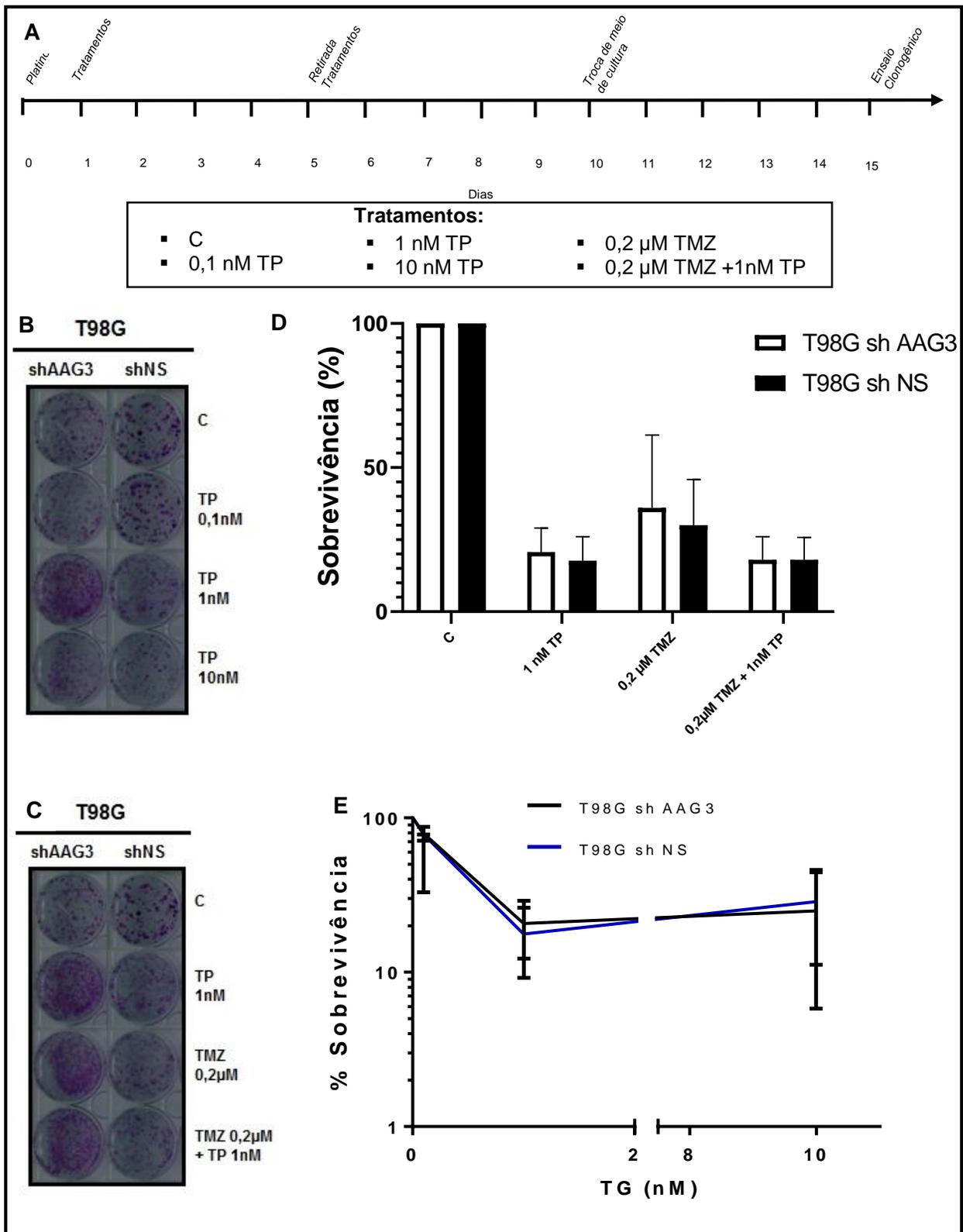


Figura 3. Avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento isolado ou combinado de TMZ e TP (5 dias) em células shAAG (silenciadas) ou shNS (não silenciadas). (A) Esquema de tratamento utilizado nas combinações com TP e TMZ. Tratamento de 5 dias com 0.1 nM, 1nM, 10nM de TP, 0.2 μ M de TMZ e 0.2 μ M

de TMZ + 1nM TP. (B,C,D e E) Avaliação da sobrevivência clonal pelo ensaio clonogênico nos painéis de células modulados para AAG. (D) e (E) Linhagens silenciadas não apresentaram diferença significativa na resistência ao tratamento com TP ou combinado com TMZ quando comparadas as linhagens controle.

Após o tratamento, já mencionados na figura 3A, com as linhagens proficientes e deficientes podemos observar que na figura 3E a linhagem deficiente em AAG não apresentou uma taxa de sobrevivência maior que a linhagem proficientes em AAG na curva de tratamento com TP. Assim como, na figura 3D não há uma diferença significativa entre os grupos de tratamento e co-tratamento. Estes resultados indicam que a deficiência em AAG, não confere resistência ao tratamento combinado de TMZ e TP não replicando o padrão visto no co-tratamento SLN e TMZ.

3.2 Avaliação do envolvimento de AAG na ativação de UPR após a exposição a agente alquilante (TMZ) e um indutor de estresse no RE (SLN)

Após verificarmos que o co-tratamento do agente alquilante TMZ com o indutor de estresse no RE, a SLN, reduz a viabilidade celular de forma AAG-dependente mas que o mesmo efeito não é observado quando TMZ é combinada com outro indutor de estresse no RE, a TP, decidiu-se então explorar se o tratamento combinado de SLN e TMZ estava ativando o UPR. Para essa avaliação foram medidos diferentes marcadores moleculares envolvidos no processo de resposta ao estresse do RE (UPR), advindos de três eixos principais (PERK, IRE1 α e ATF6) [16]. Estas proteínas de UPR são reguladas negativamente pela chaperona BiP que em condições de não estresse estão presentes ligadas ao terminal amino dessas proteínas. Quando em situação de estresse, no qual há acúmulo de proteínas desenoveladas, a BiP se dissocia dessas proteínas o que permite o desencadeamento da UPR [17]. Na via de IRE1 α , a ativação desta primeiramente causa a clivagem do mRNA de XBP1, formando o XBP1s que transloca-se para o núcleo e induz a transcrição de uma ampla gama de genes para lidar com o estresse no RE. Ademais, a IRE1 α também ativa uma quinase, a JNK, que pode atuar promovendo uma adaptação das células frente ao estresse, iniciando a autofagia ou promovendo a apoptose quando a célula não é capaz de lidar com o estresse. A modulação pela via de PERK desencadeia inúmeras respostas, incluindo a fosforilação de eIF2a que inibe a transcrição geral mas permite a tradução de ATF4 que controla a expressão de diversos genes envolvidos na UPR, sendo um desses o que transcreve a proteína CHOP envolvida no processo de ativação de apoptose [17].

Inicialmente, as linhagens celulares T98G sh AAG3E3 e T98G sh NS foram submetidas ao tratamento de TMZ ou SLN isoladas e ao co-tratamento com ambas. Os níveis de mRNA foram

então avaliados por q-PCR. Esta análise demonstrou que o tratamento combinado altera os níveis de expressão dos fatores de transcrição BiP, CHOP e XBP1s apenas na presença de AAG. As análises da figura 4 mostram que a BiP (fig.4A) apresenta níveis de expressão aumentados para a linhagem proficiente em AAG. Sendo que o grupo que apresenta o co-tratamento SLN e TMZ apresentou níveis significativamente diferentes do mesmo grupo de tratamento nas células deficientes em AAG. No quadro B da figura 4, a análise de XBP1s indica que houve um aumento expressivo somente no tratamento combinado de SLN e TMZ dos seus níveis de expressão do mRNA em células que expressam AAG. O mesmo padrão de resposta é observado na análise da expressão dos fatores de transcrição de CHOP (fig. 4C), que mostra uma indução significativa na linhagem proficiente em AAG exposta ao co-tratamento, que não ocorre nas linhagens deficientes em AAG.

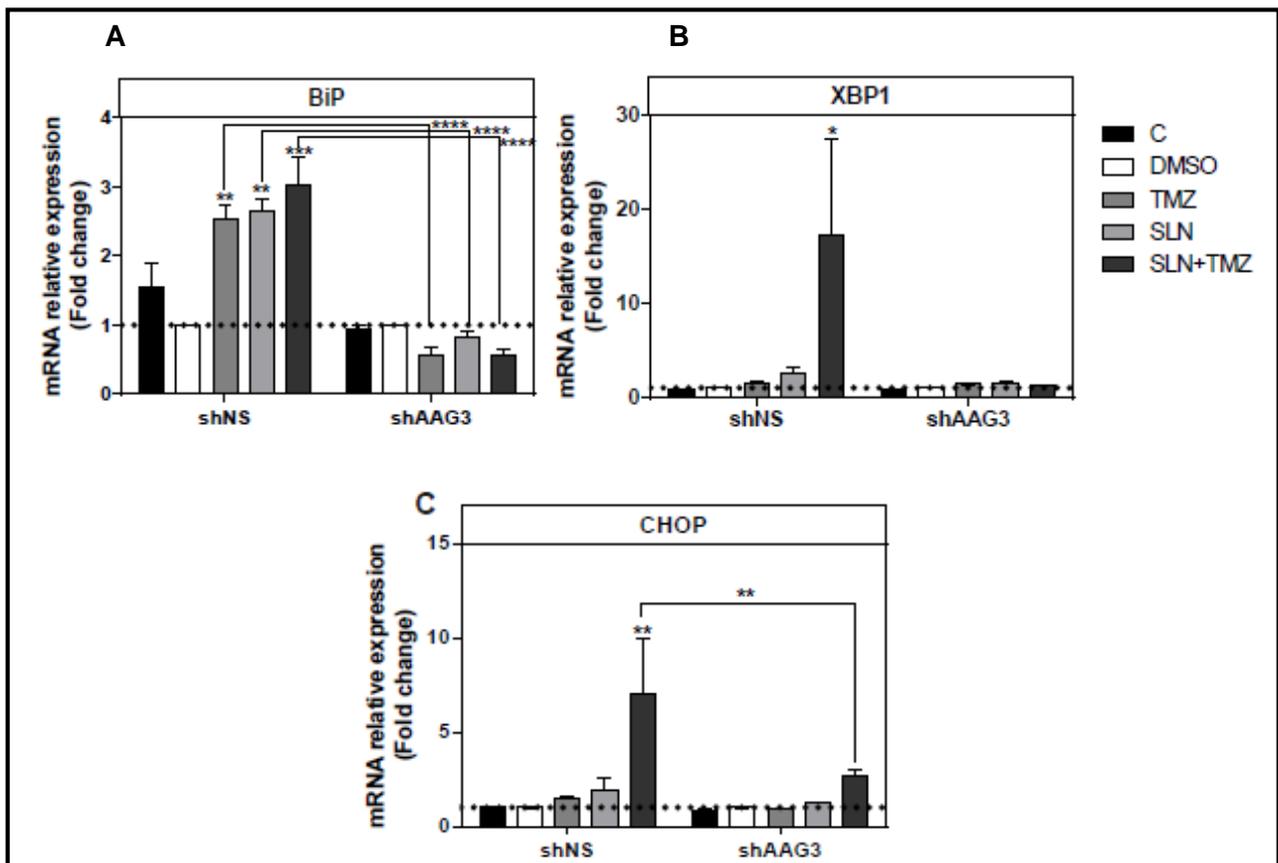


Figura 4. Expressão de BiP, CHOP e XBP1A. Através de qPCR os níveis de expressão do mRNA de BiP, CHOP e XBP1A foi quantificado. Após tratamento de 24h com 200 μ M de TMZ, 0.1 μ M de SLN e o co-tratamento nas mesmas concentrações. *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001.

Os níveis da proteína PERK foram avaliados por *immunoblotting*, no qual pode-se observar

que os níveis de PERK estão diminuídos nas células deficientes em AAG, (figura 5, painel B). Nas células proficientes em AAG os níveis de PERK são mais altos. Esses dados mostram que a modulação de AAG afeta a funcionalidade do eixo PERK quando UPR é induzida. Esse dado aliado aos níveis de expressão do mRNA de CHOP mostram que há uma ativação deste eixo quando as células são tratadas com um agente alquilante e um indutor de estresse no RE.

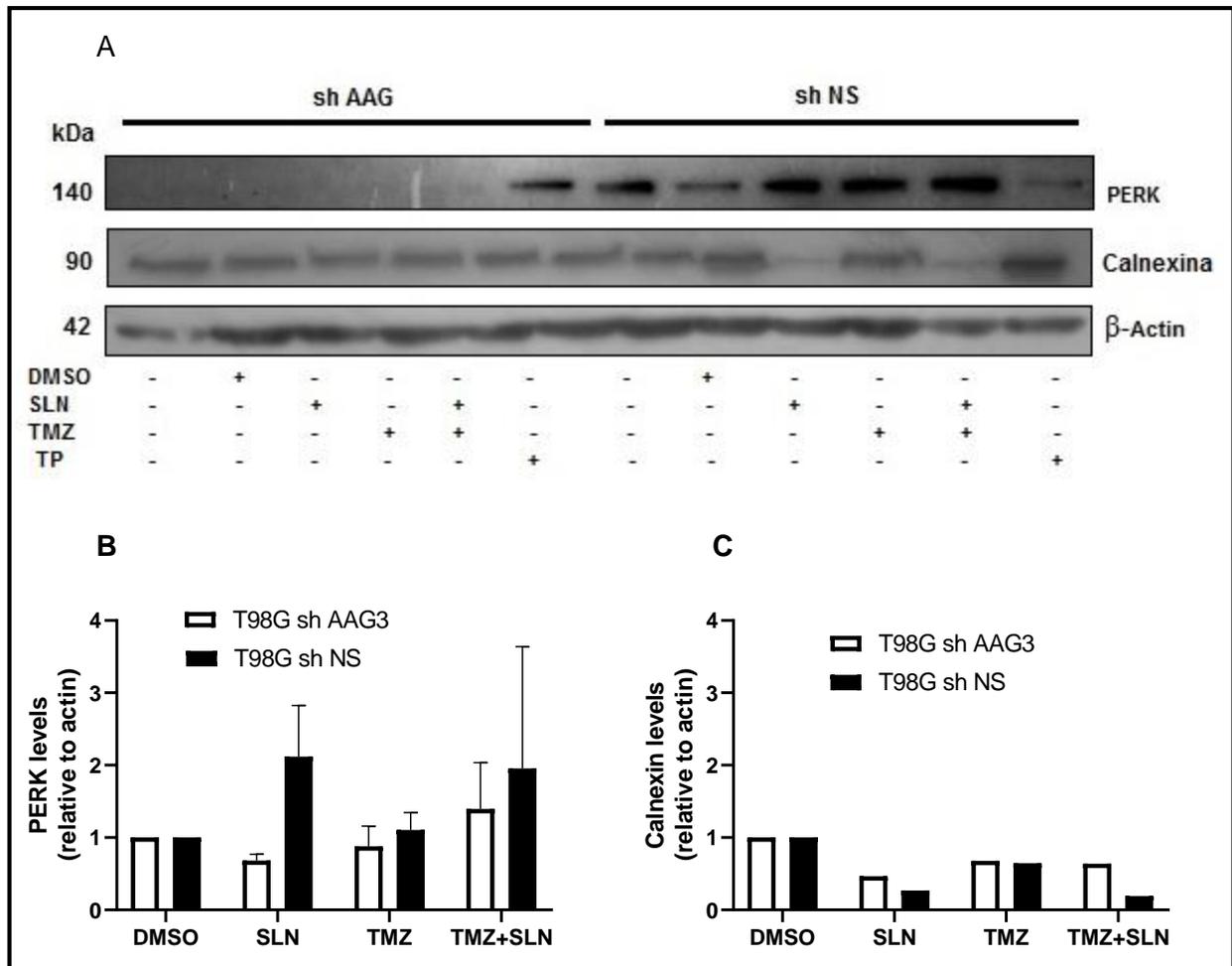


Figura 5. Expressão de PERK e Calnexina em células de gliolastoma após tratamento e co-tratamento de um alquilante (TMZ) e um indutor de estresse no RE. (A) Imagem representativa do imunoblot na análise dos níveis de PERK e Calnexina em células T98G sh AAG ou T98G sh NS. β-actina foi usada como controle, as células foram tratadas por 24h em meio de droga com 200 μm TMZ e 0,1 μm SLN. Como controle positivo células também foram tratados com tapsigargina 300nM por 24h. *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001.

No RE existem duas principais vias enovelamento, o sistema geral multichaperona BiP e o ciclo de calnexina (CNX) [18]. A calnexina é uma chaperona que promove o enovelamento de proteínas através da ligação a proteínas mal enoveladas. Essa via é específica para glicoproteínas

com estruturas de oligossacarídeos ligados a N, ou ligado à asparagina, que necessitam de glicosilação ligada ao N para o enovelamento adequado no RE [18]. O ciclo de CNX liga o processamento de glicano e a proteína desenovelada para permitir o recrutamento específico de fatores de enovelamento para proteínas recém-sintetizadas e mal enoveladas [18]. Logo, essa chaperona também é sensível a distúrbios na homeostase do RE, como a indução de estresse no RE induzida pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas.

A figura 5C mostra que há uma redução nos níveis de CNX nas células proficientes em AAG (shNS) quando tratadas com o agente indutor de estresse no RE, SLN, isoladamente ou em combinação com TMZ. Tal resultado poderia sugerir que SLN induz UPR, mas impede a ação de vias que promovem a redução do estresse no RE, como é o caso do ciclo de CNX.

3.3 Avaliação do envolvimento de AAG na regulação da autofagia mediada por TMZ e SLN

Afim de avaliar se a modulação de AAG altera a resposta autofágica de células de GBM após a exposição a TMZ e SLN foram mensuradas duas proteínas envolvidas no processo, p62 e LC3. A LC3 é uma proteína que compõe a membrana do autofagossomo e durante a autofagia a LC3 I citosólica é conjugada com fosfatidiletanolamina para formar LC3-II que, então, é incorporada na membrana autofagosomal. A p62 é incorporado aos autofagossomos, sendo degradada ao final do processo autofágico. Logo, quando há a ocorrência desse processo os níveis de p62 estarão diminuídos [19].

As linhagens celulares T98G shAAG3 e T98G shNS foram submetidas aos tratamentos de SLN e TMZ combinados ou não. SLN levou ao acúmulo de LC3-II nas células proficientes em AAG, que foi aumentado na presença de TMZ (14.7-fold, $P \leq 0.05$). No entanto, o tratamento isolado de SLN ou combinado a TMZ teve um efeito menor sobre os níveis de LC3-II nas células deficientes em AAG (DMSO=0.5-fold, SLN=0.9-fold, SLN+TMZ=1-fold, Figura 6B e C).

Nota-se na figura B, que na linhagem deficiente em AAG, a LC3 II apresenta níveis baixos em todos os tratamentos, assim como, a LC3I mostra níveis baixos em praticamente todos os tratamentos. Apresentando exceção apenas para o tratamento com TP, controle positivo, que apresenta um nível aumentado de LC3I e um nível baixo de LC3II. A linhagem proficiente em AAG, apresenta uma forte expressão de LC3I no co-tratamento, também expressando um nível aumentado de LC3II. O tratamento com TMZ, mostra que há menos expressão de LC3I e mais expressão LC3II, indicando que há uma indução de autofagia. Assim como, a TP apresentou um menor nível de LC3 I e uma maior nível de LC3 II.

A atividade autofágica mensurada através da degradação de p62 mostra que a quantidade

de p62 nas linhagens deficientes em AAG está diminuída indicando uma atividade autofágica nestas células (figura C). Ademais, o tratamento com TMZ demonstrou um valor abaixo dos outros tratamentos para p62. Em contrapartida, p62 acumula-se na a linhagem proficiente em AAG em todos os tratamentos, mostrando valores de expressão de p62 maiores que a linhagem silenciada.

Os tratamentos de SLN isolado ou em combinação com TMZ não parecem exercer efeitos sobre os níveis de p62. O aumento observado nos níveis de LC3-II associados à não degradação de p62 nas células proficientes em AAG poderia estar relacionado com um efeito inibitório de SLN na degradação dos conteúdos autofágicos, como demonstrado anteriormente por Yue et al. (2013) [20].

Nossos dados indicam que a combinação de SLN e TMZ leva a um processo autofágico degradatório debilitado que não é observado em células deficientes em AAG. Fluxos autofágicos aberrantes já foram observados com o tratamento de SLN por outros autores, mas até então não existiam evidências de um envolvimento de AAG neste processo [20,21].

Na avaliação do controle positivo utilizou-se TP com concentração de 300nM. Esse tratamento aumentou os níveis de LC3 II, porém não foi eficiente na redução dos níveis de p62 nas linhagens proficientes em AAG. No entanto as células deficientes em AAG não apresentaram nenhuma alteração das proteínas avaliadas (figura S2). Logo, esses resultados tomados em conjunto sugerem que a indução autofágica prejudicada ocorre como resultado da ativação da UPR, e que ambos estão diminuídos nas células deficientes em AAG [22].

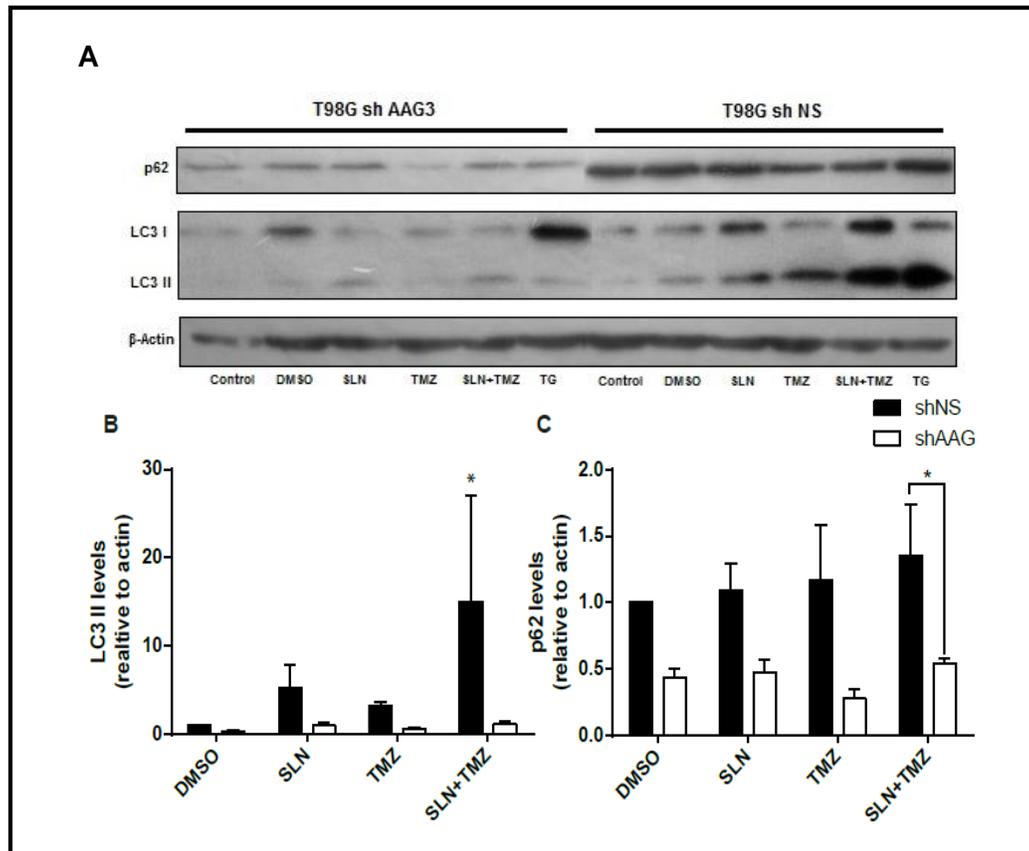


Figura 6. Expressão de LC3 e p62 em células de gliolastoma após tratamento e co-tratamento de um alquilante (TMZ) e um indutor de estresse no RE. (A) Imagem representativa do imunoblot na análise dos níveis de LC3 e p62 em células T98G sh AAG ou T98G sh NS. β -actina foi usada como controle, as células foram tratadas por 24h em meio de droga com 200 μ M TMZ e 0,1 μ M SLN. Como controle positivo células também foram tratados com tapsigargina 300nM por 24h. *P <0.05 **P <0.01, ***P <0.001.

4. Discussão

A TMZ aliada a ressecção cirúrgica e radioterapia atualmente é o padrão-ouro para tratamento do GBM [2]. Este fármaco é um agente alquilante que provoca adutos de metila causando lesões especialmente nas posições N7-MeG, N3-MeA e O6-MeG na molécula do DNA [23]. Todavia, esses danos possuem mecanismos de reparo específicos como a O6-MeG que é removida pela MGMT e as lesões N7-MeG e N3-MeA reparadas por BER [3]. Essas características de reparo interferem no tratamento e, apesar de ser um padrão muito utilizado, não é completamente eficiente, uma vez que após tratamento os pacientes têm uma sobrevivência de cerca de quinze meses [24]. Por esse motivo tem se investigado diferentes estratégias com o intuito de discorrer por diversos mecanismos afim de se aumentar a eficiência do tratamento.

A SLN é um fármaco com uma ampla variedade de aplicações desempenhando atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, antiviral e anti-inflamatória [25]. Seu mecanismo de ação ocorre por um desequilíbrio osmótico desencadeado pela troca de íons pela membrana citoplasmática e pela membrana mitocondrial, induzindo estresse no RE [13]. Recentemente, esse fármaco tem sido estudado em diferentes ramos, entre eles destaca-se a pesquisa da terapia coadjuvante no tratamento de diversos tipos de cânceres. Em alguns estudos foi, principalmente, capaz de induzir apoptose nas células humana T CD4+ de leucemia aguda de células T e teve um efeito superior a 100 vezes o efeito do paclitaxel, que atua através da ligação tubulina dos microtúbulos impedindo a divisão descontrolada da célula, num estudo com células-tronco do câncer de mama [26,27]. A associação de um agente alquilante TMZ com um indutor de estresse no RE tem sido relatada como benéfica, pois se observou o sinergismo entre essas duas drogas, aumentando a citotoxicidade nas células do GBM, além da ocorrência de regulação de enzimas de reparo de DNA [21].

Assim, estudar o modo de atividade em outras variedades de tumores se torna relevante no sentido de se estabelecer um estudo mais aprofundado sobre a maquinaria molecular que está envolvida nessa atividade antitumoral. Uma enzima que desempenha um importante papel na via de BER, a AAG, apresenta uma forte relação entre a sua atividade e a sobrevivência de células tumorais de GBM [6]. A AAG uma glicosilase de DNA que inicia BER para bases de DNA alquiladas, como 3meA e 7meG geradas por TMZ [4]. Nesse sentido, no presente trabalho foi estabelecido como objetivo avaliar como linhagens celulares de GBM com diferentes níveis de AAG responderiam frente a indução de estresse no RE. Também, foi alvo de pesquisa avaliar como o tratamento com TMZ associada ao agente indutor de estresse no RE atuaria de forma conjunta na resposta de vias de reparo ou mesmo na ativação da resposta a proteínas mal

enoveladas levando em consideração também como se desencadearia o processo autofágico nesse contexto.

Por essa perspectiva, inicialmente se avaliou como a modulação da AAG afetaria a sobrevivência celular. Os dados já mostrados (fig.2) evidenciam que os níveis da AAG afetam a sobrevivência das linhagens de GBM. No entanto, embora as células sem AAG fossem mais sensíveis aos agentes alquilantes isoladamente [6,14], aqui elas eram mais resistentes aos indutores de estresse de RE isoladamente ou combinadas com TMZ. A promoção da morte celular pelo tratamento combinado pode ocorrer por uma associação de estresse prolongado de RE e acúmulo de intermediários tóxicos com reparo mediado por AAG. Além disso, células proficientes em AAG apresentam uma maior sensibilidade aos efeitos citotóxicos do tratamento combinado de SLN e TMZ, enquanto células deficientes nesta enzima são mais resistentes ao mesmo tratamento. Esse achado corresponde a dados já discutidos na literatura que sugerem o aumento da sinalização de UPR como uma estratégia para induzir a morte celular [7]. Na sobrevivência foi avaliado também, o efeito de um outro indutor de estresse no RE a TP, que promove o bloqueio da receptação de cálcio através de SERCA [8]. Esses dados (fig.3) mostram que o perfil da modulação de AAG com TMZ e SLN não se repetiu na avaliação da TP. Na presença de TP, as células de GBM proficientes e deficientes em AAG não responderam de forma diferente como observado para o tratamento com SLN, sugerindo que a ação de TP não depende dos níveis de AAG para atuar. Por essa perspectiva, também é observado que a indução de estresse no RE, dependendo da característica do fármaco indutor de estresse, não necessariamente afeta todos os mecanismos de reparo de danos desencadeados no tratamento com TMZ. Nesse sentido, estudos apontam que outros agentes indutores de estresse no retículo endoplasmático, como a tunicamicina, que é o bloqueador da biossíntese de precursor N-glicano [28], e a TP induzem uma regulação negativa das proteínas MGMT, MPG e Rad51, envolvidas em mecanismo de resistência ao tratamento com TMZ [7].

Os dados anteriores do grupo mostram que a alquilação induz de maneira dependente de AAG a UPR e que envolve ao menos o ramo IRE1-XBP1 [14]. No entanto, é relatado que SLN induz estresse no RE administrada isolada, porém em combinação com um agente alquilante apresenta um efeito sinérgico [7,29]. Nesse sentido fez-se necessário investigar os eixos exatos de ativação de UPR. A análise de UPR se deu pela análise de BiP e pela análise dos eixos IRE1 α e PERK. A avaliação dos níveis de BiP mostrou que há uma maior expressão de mRNA de BiP na linhagem celular com AAG proficiente do que a na linhagem deficiente em AAG após tratamento tanto de SLN, TMZ quanto do co-tratamento. A mensuração dos níveis de expressão do mRNA de XBP1s mostra um aumento para o co-tratamento TMZ e SLN nas células proficientes em AAG,

padrão visto somente para esse tratamento e com presença da AAG. Esse dado mostra que há uma ativação do eixo IRE1 α causado pela dissociação de BiP, essa ativação causa a clivagem do mRNA de XBP1, formando o XBP1s que transloca-se para o núcleo e induz a transcrição de uma ampla gama de genes para lidar com UPR [9]. Um aumento significativo da expressão do mRNA de CHOP para o co-tratamento na linhagem com AAG proficiente mostra que há uma ativação do eixo PERK [9]. Esse mesmo padrão também é visto na avaliação da proteína PERK por immunoblotting que aparece com seus níveis aumentados na linhagem proficiente com AAG em comparação com as células silenciadas, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo. Os níveis de CHOP e de PERK mostram uma conformidade de que o eixo de PERK está sendo ativado após a indução de estresse no RE por um agente alquilante associado a um agente indutor de estresse no RE em linhagem proficiente em AAG. A UPR ativada durante a presença de um estresse prologado ainda não está plenamente esclarecida, no entanto é proposto que uma mudança entre os eixos de adaptação da célula ao estresse ao processo de morte celular pode resultar de uma mediação de CHOP, que resultaria numa atenuação do eixo de IRE1 α [30,31]. Os dados apresentados sugerem que pode haver essa transição para o processo de apoptose nas células com a AAG funcional e sob o co-tratamento. No entanto, esses dados ainda devem ser confirmados na avaliação de outros tempos de tratamentos, visto que esses dados correspondem a um tratamento de 24 horas.

Outra avaliação realizada da UPR foram os níveis de CNX, uma chaperona que garante que apenas proteínas adequadamente dobradas saiam do RE [32], observou-se uma diminuição desta chaperona no tratamento de SLN e também quando associada com TMZ em células com a AAG funcional. Esses dados ainda precisam ser confirmados, mas nos permitem explorar que a SLN é capaz de promover o estresse no RE, mas inibe vias que poderiam atenuar o estresse. Sendo responsáveis então pelo acúmulo excessivo de estresse no RE que pode promover a indução de morte celular [11].

Quanto aos processos ativados após UPR avaliou-se duas proteínas envolvidas no processo de autofagia a p62 e a LC3. Os dados demonstram que as células proficientes em AAG (T98G sh NS) apresentaram níveis aumentados em todos os tratamentos para a proteína p62 e LC3 II estavam elevados. Estes dados apresentam uma discordância quanto a indução do processo de autofagia. Visto que, a LC3 I citosólica é convertida a LC3 II durante o processo autofágico. No entanto, a p62 está com níveis aumentados, sabe-se que essa proteína liga-se diretamente à mAtg8/LC3 através da região citosólica de interação da LC3, também conhecida por sequência de reconhecimento LC3 (LRS – “LC3 recognition sequence”), e que ao final do processo tem seus níveis diminuídos [33]. Esses resultados tomados em conjunto sugerem que o

processo autofágico é afetado nas células tratadas com SLN e TMZ proficientes em AAG, pois há o desencadeamento do processo, mostrados pelos níveis de LC3. No entanto, o seguimento do processo parece sofrer alguma interferência, pois os níveis de p62 estão aumentados, isso sugere que o fluxo autofágico é prejudicado, pois há a formação de autofagossomos, mas não ocorre a degradação de p62. Essa hipótese é suplementada pelos dados encontrados por Booth [20,34]. Já a linhagem deficiente em AAG parece sofrer os eventos da autofagia, pois seus resultados mostram que tanto p62 quanto LC3II estão diminuídos sugerindo uma ocorrência rápida do fluxo autofágico. Esses dados mostram que ocorre a indução do processo de autofagia nas células GBM proficientes e deficientes em AAG, porém as proficientes apresentam um fluxo autofágico interrompido. No entanto, esses dados não sugerem a autofagia paralisada irá induzir a morte celular, conforme dados de Booth [20,34].

A utilização de uma agente alquilante TMZ associado com um agente indutor de estresse no RE parecem atuar de maneira conjunta, apresentando um sinergismo no tratamento antitumoral. Esses dois fármacos, por apresentarem esse sinergismo, podem ser usados em conjunto e com baixas dosagens que levará a uma diminuição dos seus efeitos colaterais. No tratamento de GBM, pode-se inferir que essa estratégia de tratamento pode trazer benefícios a terapia, assim como um aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes. Por último, os dados encontrados demonstram uma hipótese assertiva de que a AAG é necessária para a indução de estresse no RE culminando em citotoxicidade. E que inibir a autofagia, associada ao dano ao DNA e ao estresse no RE, como forma de estratégia de tratamento pode ser benéfico à pacientes com GBM. No entanto, investigações adicionais são necessárias para uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na UPR que podem auxiliar no tratamento antitumoral.

Referências

- [1] A. Olar, K.D. Aldape, NIH Public Access, 232 (2015) 165–177. doi:10.1002/path.4282.Using.
- [2] C. Happold, N. Stojcheva, M. Silginer, T. Weiss, P. Roth, G. Reifenberger, M. Weller, Transcriptional control of O6-methylguanine DNA methyltransferase expression and temozolomide resistance in glioblastoma, *J. Neurochem.* 144 (2018) 780–790. doi:10.1111/jnc.14326.
- [3] J. Zhang, M. F.G. Stevens, T. D. Bradshaw, Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance, *Curr. Mol. Pharmacol.* 5 (2012) 102–114. doi:10.2174/1874467211205010102.
- [4] D. Fu, J.A. Calvo, L.D. Samson, Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents, *Nat Rev Cancer.* 12 (2012) 104–120. doi:10.1038/nrc3185.
- [5] S.Y. Lee, Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes Dis.* 3 (2016) 198–210. doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007.
- [6] S. Agnihotri, A.S. Gajadhar, C. Ternamian, T. Gorlia, K.L. Diefes, P.S. Mischel, J. Kelly, G. McGown, M. Thorncroft, B.L. Carlson, J.N. Sarkaria, G.P. Margison, K. Aldape, C. Hawkins, M. Hegi, A. Guha, Alkylpurine - DNA - N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 253–266. doi:10.1172/JCI59334.
- [7] E. Xipell, T. Aragón, N. Martínez-Velez, B. Vera, M.A. Idoate, J.J. Martínez-Irujo, A.G. Garzón, M. Gonzalez-Huarriz, A.M. Acanda, C. Jones, F.F. Lang, J. Fueyo, C. Gomez-Manzano, M.M. Alonso, Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51, *Neuro. Oncol.* 18 (2016) 1109–1119. doi:10.1093/neuonc/now022.
- [8] D. Ribeiro, M. Freitas, S. Rocha, J. Lima, F. Carvalho, E. Fernandes, Calcium Pathways in Human Neutrophils—The Extended Effects of Thapsigargin and ML-9, *Cells.* 7 (2018) 204. doi:10.3390/cells7110204.
- [9] C. Hetz, The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 89–102. doi:10.1038/nrm3270.
- [10] A. Almanza, A. Carlesso, C. Chintha, S. Creedican, D. Doultzinos, B. Leuzzi, A. Luís, N. McCarthy, L. Montibeller, S. More, A. Papaioannou, F. Püschel, M.L. Sassano, J. Skoko, P. Agostinis, J. de Belleruche, L.A. Eriksson, S. Fulda, A.M. Gorman, S. Healy, A. Kozlov, C. Muñoz-Pinedo, M. Rehm, E. Chevet, A. Samali, Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications, *FEBS J.* (2018). doi:10.1111/febs.14608.
- [11] M. Corazzari, P.E. Lovat, J.L. Armstrong, G.M. Fimia, D.S. Hill, M. Birch-Machin, C.P.F.

Redfern, M. Piacentini, Targeting homeostatic mechanisms of endoplasmic reticulum stress to increase susceptibility of cancer cells to fenretinide-induced apoptosis: The role of stress proteins ERdj5 and ERp57, *Br. J. Cancer*. 96 (2007) 1062–1071. doi:10.1038/sj.bjc.6603672.

[12] S. Song, J. Tan, Y. Miao, Q. Zhang, Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 3867–3874. doi:10.1002/jcp.26137.

[13] S. Zhou, F. Wang, E. Wong, E. Fonkem, T.-C. Hsieh, J. Wu, E. Wu, Salinomycin: A Novel Anti-Cancer Agent with Known Anti-Coccidial Activities, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 4095–4101. doi:10.2174/15672050113109990199.

[14] L. Milano, C. Charlier, A. Andregueti, Rafaela Aljohani, E. Healing, M.P. Thomé, R. Elliott, L.D. Samson, G. Lenz, J.A. Henriques, A. Nohturfft, L.B. Meira, A novel role for alkyladenine DNA glycosylase in regulating alkylation-induced ER stress, *Biol. Sci. Cell Biol.* (n.d.).

[15] A.S.K. Tamajusuku, E.S. Villodre, R. Paulus, R. Coutinho-Silva, A.M.O. Battasstini, M.R. Wink, G. Lenz, Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma, *J. Cell. Biochem.* 109 (2010) 983–991. doi:10.1002/jcb.22478.

[16] D.J. Todd, A.H. Lee, L.H. Glimcher, The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 663–674. doi:10.1038/nri2359.

[17] E. Chevet, C. Hetz, A. Samali, Endoplasmic reticulum stress–activated cell reprogramming in oncogenesis, *Cancer Discov.* 5 (2016) 586–597. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1490.

[18] G. Kozlov, J. Muñoz-Escobar, K. Castro, K. Gehring, Mapping the ER Interactome: The P Domains of Calnexin and Calreticulin as Plurivalent Adapters for Foldases and Chaperones, *Structure*. 25 (2017) 1415–1422.e3. doi:10.1016/j.str.2017.07.010.

[19] E.L. Eskelinen, P. Saftig, Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793 (2009) 664–673. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.014.

[20] W. Yue, A. Hamai, G. Tonelli, C. Bauvy, V. Nicolas, H. Tharinger, P. Codogno, M. Mehrpour, Inhibition of the autophagic flux by salinomycin in breast cancer stem-like/progenitor cells interferes with their maintenance, *Autophagy*. 9 (2013) 714–729. doi:10.4161/auto.23997.

[21] E. Xipell, M. Gonzalez-huarriz, J. Jose, M. De Irujo, F. Fred, H. Jiang, J. Fueyo, C. Gomez, M.M. Alonso, Salinomycin induced ROS results in abortive autophagy and leads to regulated necrosis in glioblastoma, *Oncotarget*. 7 (2016) 1–16. doi:10.18632/oncotarget.8905.

[22] M. Ogata, S. -i. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J.A. Hammarback, F. Urano, K. Imaizumi, Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress, *Mol. Cell. Biol.* 26

(2006) 9220–9231. doi:10.1128/MCB.01453-06.

[23] F. Marchesi, M. Turriziani, G. Tortorelli, G. Avvisati, F. Torino, L. De Vecchis, Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacol. Res.* 56 (2007) 275–287. doi:10.1016/j.phrs.2007.08.003.

[24] M. Ameratunga, N. Pavlakis, H. Wheeler, R. Grant, J. Simes, M. Khasraw, Anti-angiogenic therapy for high-grade glioma (Review), (2018). doi:10.1002/14651858.CD008218.

[25] J. Dewangan, S. Srivastava, S.K. Rath, Salinomycin : A new paradigm in cancer therapy, (2017). doi:10.1177/1010428317695035.

[26] F. Wang, L. He, W. Dai, Y. Xu, D. Wu, C. Lin, S. Wu, P. Cheng, Y. Zhang, M. Shen, C. Wang, J. Lu, Y. Zhou, X. Xu, L. Xu, Salinomycin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo, 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0050638.

[27] D. Fuchs, A. Heinold, G. Opelz, V. Daniel, C. Naujokat, Biochemical and Biophysical Research Communications Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 743–749. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.042.

[28] B. Ahmed, M.N. Khan, M.A. Nisar, S. Kampo, Q. Zheng, Y. Li, Q. Yan, Tunicamycin enhances the suppressive effects of cisplatin on lung cancer growth through PTX3 glycosylation via AKT/NF- κ B signaling pathway, *Int. J. Oncol.* (2018) 1–12. doi:10.3892/ijo.2018.4650.

[29] S.N. Yu, S.H. Kim, K.Y. Kim, J.H. Ji, Y.K. Seo, H.S. Yu, S.C. Ahn, Salinomycin induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis through generation of reactive oxygen species in human glioma U87MG cells, *Oncol. Rep.* 37 (2017) 3321–3328. doi:10.3892/or.2017.5615.

[30] U. Woehlbier, C. Hetz, Modulating stress responses by the UPRosome: A matter of life and death, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 329–337. doi:10.1016/j.tibs.2011.03.001.

[31] Y. Chen, F. Brandizzi, IRE1: ER stress sensor and cell fate executor, *Trends Cell Biol.* 23 (2013) 547–555. doi:10.1016/j.tcb.2013.06.005.

[32] Y. Okuda-Shimizu, Y. Shen, L. Hendershot, Protein quality control in the endoplasmic reticulum, *Handb. Cell Signaling*, 2/E. 3 (2010) 2471–2476. doi:10.1016/B978-0-12-374145-5.00294-1.

[33] E. Itakura, N. Mizushima, p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 17–27. doi:10.1083/jcb.201009067.

[34] L. Booth, J.L. Roberts, A. Conley, N. Cruickshanks, T. Ridder, S. Grant, A. Poklepovic, P. Dent, HDAC inhibitors enhance the lethality of low dose salinomycin in parental and stem-like GBM

cells, *Cancer Biol. Ther.* 15 (2014) 305–316. doi:10.4161/cbt.27309.

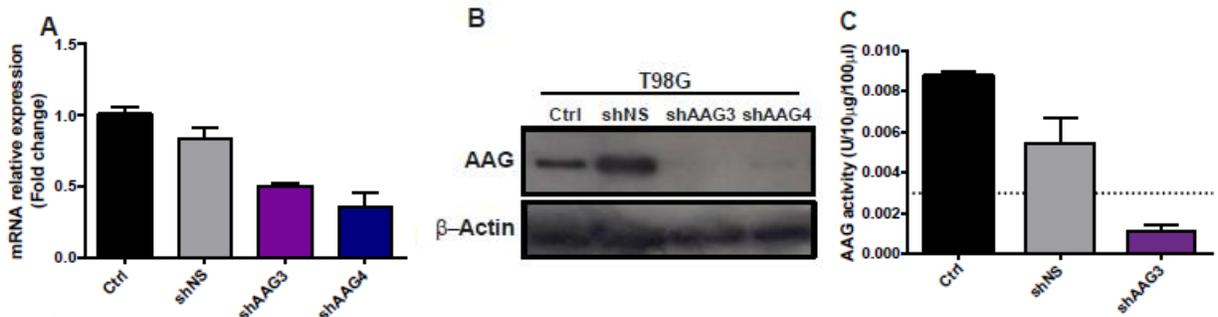


Figura. S1. Caracterização da expressão e atividade de AAG em células de glioblastoma manipuladas para expressar diferentes níveis de AAG. As células T98G foram transduzidas com partículas virais produzidas a partir do sistema lentiviral pGIPZ shRNA para AAG knock down. (A) Níveis de mRNA de AAG em células T98G (controle), shNS (controle de não silenciadas) e células ShAAG3 e shAAG4 knockdown de AAG. (B) Os níveis de proteína AAG foram quantificados em lisados de células inteiras por imunotransferência. (C) A atividade de AAG foi quantificada em lisados nucleares.

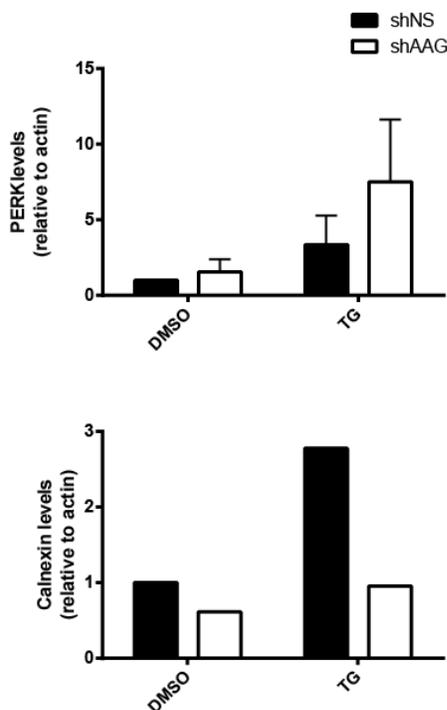


Figura S2. Níveis de PERK e de calnexina após o tratamento com TG. As células foram tratadas com 300 nM de taspigargina (TP). Os níveis de proteína PERK e Calnexin medidos por imunoblotting, a quantificação dos níveis de proteína foram normalizados para β -actina e expressos em relação ao controle do veículo (DMSO).

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que o processo de reparo por excisão de bases (BER) possui um papel importante no processamento das lesões induzidas pelo agente alquilante Temozolamida. Assim como, a enzima Alquiladenina DNA Glicosilase (AAG) possui uma propriedade relevante no desfecho da sinalização de indução de autofagia. Mais especificamente, pode-se concluir que:

- A sensibilidade conferida pelo tratamento com agentes indutores de estresse de RE combinados ou não com TMZ é dependente dos níveis de AAG;
- AAG é necessária para ativação do UPR no tratamento combinado de TMZ e SLN em células de GBM;
- A combinação de SLN e TMZ resulta em um fluxo autofágico anormal na presença de AAG;

4 PERSPECTIVA

Os resultados obtidos nesse trabalho não elucidaram completamente todas as informações sobre o papel da AAG no processo de indução de estresse no RE, assim como, no processo de indução ao processo autofágico. E em como esses aspectos podem influenciar na sobrevivência de pacientes com glioblastomas. Logo, estudos adicionais devem ser realizados afim suprir essa carência de informações. Como perspectivas para novos estudos, destacam-se:

- Avaliar o resgate do fenótipo nas células após a complementação com AAG funcional e mutante;
- Examinar outros marcadores importantes do UPR como ATF6, IRE1a e PERK, bem como a fosforilação destes;
- Avaliar a indução de danos no DNA nas células deficientes e proficientes em AAG após tratamento com TG, TN e SLN;

5. REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. et al. Alkylpurine - DNA - N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *Journal of Clinical Investigation*, [s. l.], v. 122, n. 1, p. 253–266, 2012.
- ALBERTS, B. *Molecular Biology of the Cell*. 5th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- ALMANZA, A. et al. Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS Journal*, [s. l.], 2018.
- BASU, D. et al. Detecting and targeting mesenchymal-like subpopulations within squamous cell carcinomas. [s. l.], v. 4101, 2016.
- CALVO, J. A. et al. DNA repair is indispensable for survival after acute inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, [s. l.], v. 122, n. 7, p. 2680–2689, 2012.
- CALVO, J. A. et al. Aag DNA Glycosylase Promotes Alkylation-Induced Tissue Damage Mediated by Parp1. *PLoS Genetics*, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–13, 2013.
- CHAUDHARI, N. et al. A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 8, n. July, p. 1–15, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00213/abstract>>
- CHEVET, E.; HETZ, C.; SAMALI, A. Endoplasmic reticulum stress–activated cell reprogramming in oncogenesis. *Cancer Discovery*, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 586–597, 2016.
- DEWANGAN, J.; SRIVASTAVA, S.; RATH, S. K. Salinomycin : A new paradigm in cancer therapy. [s. l.], 2017.
- DRABLØS, F. et al. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair*, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1389–1407, 2004.
- EBRAHIMKHANI, M. R. et al. Aag-initiated base excision repair promotes ischemia reperfusion injury in liver, brain, and kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 111, n. 45, p. E4878–E4886, 2014. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1413582111>>
- ESKELINEN, E. L.; SAFTIG, P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, [s. l.], v. 1793, n. 4, p. 664–673, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.014>>
- FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, [s. l.], v. 12, p. 104–120, 2012.
- FUCHS, D. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications, [s. l.], v. 390, n. 3, p. 743–749, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.042>>
- GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy. Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy : cellular and molecular mechanisms. Journal of Pathology The, 221, 3–12. <http://doi.org/10.1002/path.2697>. Autophagy : cellular and molecular mechanisms. Journal of Pathology The, [s. l.], v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225336>>
- HEGI, M. E. et al. *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. New England Journal of Medicine, [s. l.], v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa043331>>
- HETZ, C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nature Reviews Molecular Cell Biology, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 89–102, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrm3270>>
- JANGAMREDDY, J. R. et al. Glucose starvation-mediated inhibition of salinomycin induced autophagy amplifies cancer cell specific cell death. [s. l.], v. 6, n. 12, 2009.
- KHAN, R. H.; SIDDIQUI, M. K.; SALAHUDDIN, P. Protein Disulfide Isomerase: Structure, Mechanism of Oxidative Protein Folding and Multiple Functional Roles. Journal of Biochemistry and Molecular Biology Research, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 173–179, 2016. Disponível em: <<http://www.ghrnet.org/index.php/jbmb/article/view/1764>>
- KIM, Y.-J.; WILSON III, D. M. Overview of Base Excision Repair Biochemistry COPING WITH ENDOGENOUS DNA DAMAGE. [s. l.], v. 5, n. 1, p. 3–13, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3459583/pdf/nihms405813.pdf>>
- KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 215–225, 2002.
- LEE CY, S. L. Recognition and processing of a new repertoire of DNA substrates by human 3-methyladenine DNA glycosylase (AAG). [s. l.], v. 48, n. 9, p. 1850–1861, 2010.
- LEE, J. H. et al. Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. Nature, [s. l.], v. 560, n. 7717, p. 243–247, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>>
- LI, T. et al. Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. [s. l.], v. 8627, 2013.
- MARCHESI, F. et al. Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems. Pharmacological Research, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 275–287, 2007.
- MAYNARD, S. et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer

- and aging. *Carcinogenesis*, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 2–10, 2009.
- MEIRA, L. B. et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *Journal of Clinical Investigation*, [s. l.], v. 118, n. 7, p. 2516–2525, 2008.
- MEIRA, L. B. et al. Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 888–893, 2009. Disponível em:
<<http://www.pnas.org/content/106/3/888.abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19139400%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2621254>>
- OKU, M.; SAKAI, Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays*, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 1–6, 2018.
- OLAR, A.; ALDAPE, K. D. NIH Public Access. [s. l.], v. 232, n. 2, p. 165–177, 2015.
- OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-Oncology*, [s. l.], v. 18, p. v1–v75, 2016.
- REDDY, J. et al. Biochimica et Biophysica Acta Salinomycin induces activation of autophagy , mitophagy and affects mitochondrial polarity : Differences between primary and cancer cells. [s. l.], v. 1833, p. 2057–2069, 2013.
- RIBEIRO, D. et al. Calcium Pathways in Human Neutrophils—The Extended Effects of Thapsigargin and ML-9. *Cells*, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 204, 2018. Disponível em:
<<http://www.mdpi.com/2073-4409/7/11/204>>
- SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. [s. l.], v. 531, p. 231–251, 2003.
- SOBOLT, R. W. et al. Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. *Journal of Biological Chemistry*, [s. l.], v. 278, n. 41, p. 39951–39959, 2003.
- TODD, D. J.; LEE, A. H.; GLIMCHER, L. H. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 663–674, 2008.
- VOELTZ, G. K.; ROLLS, M. M.; RAPOPORT, T. A. Structural organization of the endoplasmic reticulum. [s. l.], v. 3, n. 10, p. 944–950, 2002.
- WANG, F. et al. Salinomycin Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. [s. l.], v. 7, n. 12, 2012.
- XIPELL, E. et al. Endoplasmic reticulum stress-inducing drugs sensitize glioma cells to temozolomide through downregulation of MGMT, MPG, and Rad51. *Neuro-Oncology*, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1109–1119, 2016.
- ZHANG, J.; F.G. STEVENS, M.; D. BRADSHAW, T. Temozolomide: Mechanisms of Action,

Repair and Resistance. *Current Molecular Pharmacology*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 102–114, 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1874-4672&volume=5&issue=1&spage=102>>

ZHOU, S. et al. Salinomycin: A Novel Anti-Cancer Agent with Known Anti-Coccidial Activities. *Current Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 20, n. 33, p. 4095–4101, 2013. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=20&issue=33&spage=4095>>

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA DNA REPAIR

AUTHOR INFORMATION

GUIDE FOR AUTHORS

YOUR PAPER YOUR WAY

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Introduction

DNA Repair provides a forum for the comprehensive coverage of DNA repair and cellular responses to DNA damage. The journal publishes original observations on genetic, cellular, biochemical, structural and molecular aspects of DNA repair, mutagenesis, cell cycle regulation, apoptosis and other biological responses in cells exposed to genomic insult, as well as their relationship to human disease.

Please note the new 'Graphical abstract' and 'Research highlights' features under the 'PREPARATION' section of the DNA Repair Guide for Authors.

Authors are required to disclose in their cover letter if their manuscript has been previously posted on a preprint server. Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

TYPES OF PAPER

DNA Repair publishes full-length research articles, brief reports on research, and reviews. The journal welcomes articles describing databases, methods and new technologies supporting research on DNA repair and responses to DNA damage. Letters to the Editor, hot topics and classics in DNA repair, historical reflections, book reviews and meeting reports also will be considered for publication.

Paper Requirements:

All articles should be prepared as outlined in this Guide - with the exception of the following:
 Brief Communication: No more than 3000 words (excluding references) - no more than 3 supplementary figures and/or tables can be included in a manuscript.

Book Review

Correspondence to the Editor

Historical Reflections

Meeting Report

SUBMISSION CHECKLIST

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed

- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

DNA Repair requires full disclosure of all potential conflicts of interest. At the end of the manuscript text (and in the cover letter of the manuscript), under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest." Signed copies of the DNA Repair Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded here. In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript. The corresponding author is responsible for sharing this document with all co-authors. Each and every co-author must sign an individual disclosure form. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping

(e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain

written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is USD 3700, excluding taxes.

For all articles submitted before 31-Jan-2019, there is a 38% discount off the open access publication fee so authors pay USD 2300, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before

an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3-6 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstract should not exceed 300 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

Authors are requested to adopt the nomenclature system for human gene mutations recommended by the HUGO MDI Nomenclature Working Group. Guidelines for this system can be found at <http://journals.wiley.com/1059-7794/nomenclature.html>.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in the printed version (unless you specify otherwise). Please indicate your preference for color: in print and on the Web, or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be

sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or

'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references

should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in

the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/dna-repair>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data

will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

This policy notwithstanding, the journal prefers that information provided in manuscripts be largely if not exclusively confined to the main body of the article. If deemed necessary, Supplementary Material must therefore be limited and will be at the discretion of the Editor-in-Chief and Associate Editors.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for Data in Brief as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be

editorially reviewed and published in the open access data journal, Data in Brief. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in Data in Brief. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will

automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Additional Information

In papers mentioning chemicals, authors are requested to include CAS registry numbers.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.