

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

Marcos Paulo Thomé

# Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina

Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina

**Orientador:** Guido Lenz, PhD

**Co-orientador:** MSc. Eduardo C. F. Chiela

Porto Alegre, Abril de 2013.

MARCOS PAULO THOMÉ

Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador  
Laranja de acridina

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

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Porto Alegre

Abril de 2013.

## Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio institucional e aos mestres da casa pelos conhecimentos transmitidos;

Ao professor e orientador Guido Lenz pelo apoio, disponibilidade e encorajamento contínuos;

Ao Eduardo pelos ensinamentos, colaboração e disponibilidade irrestrita que facilitaram a realização deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Sinalização Celular pela troca de experiências;

Aos colegas da Biomedicina e amigos que contribuíram para formação intelectual;

Em especial aos meus pais, Tânia (*in memoriam*) e Ademir, pela educação e dedicação e a minha irmã, Franciele, pela presença constante;

## Sumário

Resumo .....	5
1 Introdução geral.....	6
1.1 Autofagia.....	6
1.2 Métodos para análise de autofagia .....	8
1.2.1 Microscopia Eletrônica.....	8
1.2.2 Ensaio de agregação de GFP-LC3 ( <i>GFP-LC3 puncta formation</i> ) .....	9
1.2.3 Ensaio de conversão de LC3 I/II através de western blot .....	10
1.2.4 Níveis de p62.....	10
1.3 Laranja de acridina .....	11
2 Trabalho experimental.....	14
2.1 Abbreviations.....	15
2.2 Abstract.....	16
2.3 Introduction .....	17
2.4 Materials and methods.....	19
2.5 Results.....	22
2.6 Discussion.....	25
2.7 References .....	27
3 Conclusões e perspectivas .....	29
4 Anexos.....	31

## Resumo

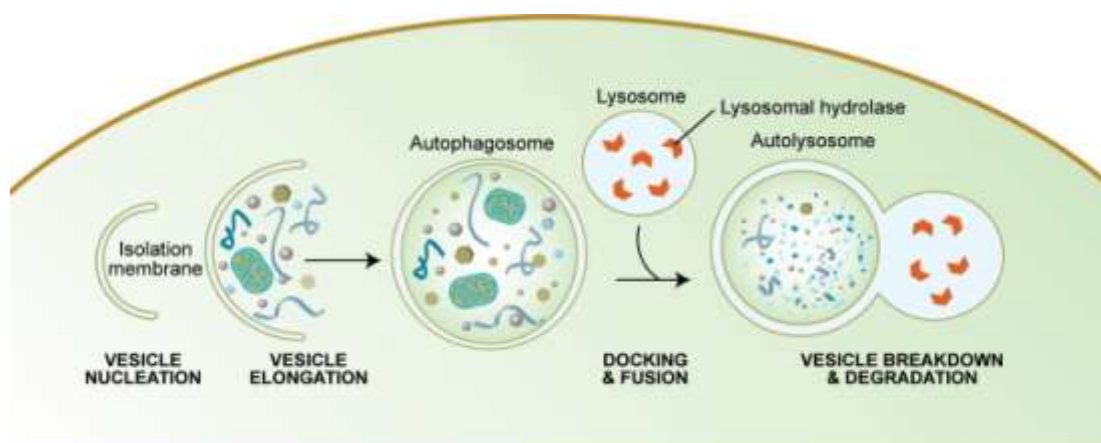
Autofagia é um processo de degradação intracelular amplamente distribuído entre eucariotos, responsável pela degradação de proteínas envelhecidas e de organelas. Constituintes citoplasmáticos são sequestrados em organelas de dupla membrana, os autofagossomos, que posteriormente se fundem com os lisossomos onde ocorre a degradação do conteúdo autofagocitado por hidrolases ácidas. Esse sistema tem sido implicado em vários processos patológicos e fisiológicos, incluindo o *turnover* de proteínas e organelas, resposta a privação de nutrientes e morte celular. Vários métodos para avaliação de autofagia estão disponíveis, dentre eles microscopia eletrônica, microscopia de fluorescência, métodos bioquímicos e avaliação dos níveis de expressão de proteínas ligadas ao processo autofágico. Laranja de acridina é um marcador acidotrópico cujas características permitem seu uso como marcador de autofagossomos maduros. Apresenta fluorescência verde ao entrar na célula e ao ficar retido em compartimentos ácidos sua fluorescência é vermelha, o que permite a quantificação do volume dos compartimentos ácidos da célula por citometria de fluxo, sendo um fácil método de triagem para avaliação de autofagia. O atual método de quantificação leva em consideração a fluorescência vermelha absoluta. Propomos, a partir das características físico-químicas do corante laranja de acridina, uma quantificação que leva em conta a razão de fluorescência verde e vermelha. Demonstramos aqui que, em comparação com a abordagem usual de análise de laranja de acridina, os dados obtidos através da nova abordagem de quantificação apresentam maior correlação com os dados obtidos por outros métodos bem estabelecidos em autofagia.

**Palavras-chave:** Autofagia, laranja de acridina, citometria de fluxo.

# 1 Introdução geral

## 1.1 Autofagia

Autofagia é um processo pelo qual os constituintes citoplasmáticos e organelas são direcionados para degradação por enzimas lisossomais. O processo autofágico inicia com o sequestro do material alvo por uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo, seguido da fusão do autofagossomo com o lisossomo para formar o autofagolisossomo e o processo é concluído com a completa digestão do material autofagocitado por hidrolases ácidas.<sup>[1]</sup> A autofagia constitutiva permite uma reciclagem fisiológica de componentes intracelulares, desempenhando assim uma função importante na homeostase celular, podendo ser rapidamente induzida como um mecanismo de defesa para a depuração de organelas desnecessárias ou danificadas ou de agregados macromoleculares prejudiciais a célula.<sup>[2]</sup> Neste sentido, a autofagia é considerada uma resposta defensiva ao estresse. No entanto, superindução de autofagia e consequente degradação lisossomal excessiva de constituintes celulares pode resultar em uma forma de auto canibalismo que leva à morte celular, chamado de morte celular autofágica.<sup>[3]</sup> A figura 1 ilustra de maneira simplificada o complexo mecanismo da autofagia.



**Figura 1: Diagrama esquemático das etapas da autofagia.** Autofagia inicia com a formação do fagóforo ou isolamento da membrana (nucleação vesicular). A ação precisa das proteínas centrais para a autofagia levam à expansão do fagóforo formando o autofagossomo (elongação da vesícula). O autofagossomo pode engolfar partes não específicas do citoplasma, incluindo organelas inteiras, ou alvos específicos. Quando a membrana externa do autofagossomo se funde com um endossomo (formando um anfissomo antes da fusão com o lisossomo) ou diretamente com o lisossomo (etapas de acoplamento e fusão), forma-se o autolisossomo. Finalmente, o material sequestrado é degradado dentro do autolisossomo (quebra de vesículas e degradação) e os componentes são reciclados.<sup>[4]</sup>

---

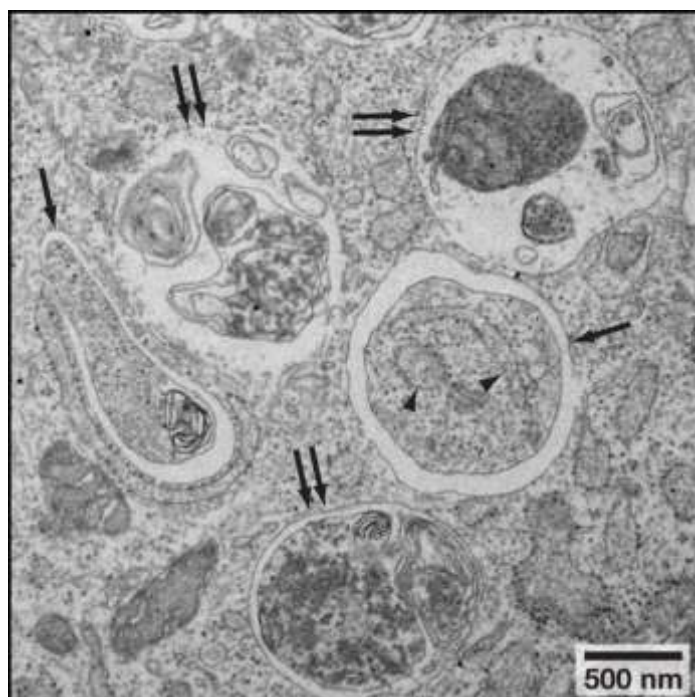
Molecularmente, a autofagia é regulada por proteínas da família Atg, cujos membros exercem funções específicas em cada fase do processo. Adicionalmente, este mecanismo é modulado positiva ou negativamente por vias de sinalização clássicas, as quais modulam a atividade da proteína *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR). Entre estas vias destacam-se PI3k/Akt and MAPK (reguladores positivos de mTOR e, como consequência, inibidores da autofagia), AMPK and p53 (reguladores negativos de mTOR e, consequentemente, ativadores da autofagia).

## 1.2 Métodos para análise de autofagia

Devido às crescentes relações entre autofagia e fisiologia celular, este campo tem atraído cada vez mais atenção, o que, por sua vez, levou a uma renovação no interesse por métodos para monitorar esse processo. Três tipos gerais de métodos têm sido predominantes: microscopia, métodos bioquímicos e detecção de alteração de níveis de proteínas por SDS-PAGE e Western blotting.<sup>[5]</sup>

### 1.2.1 Microscopia Eletrônica

O método mais tradicional é a microscopia eletrônica e, de fato, a autofagia em mamíferos foi originalmente descoberta no final da década de 1950 por microscopistas eletrônicos que estudavam os lisossomos. Ao nível estrutural, um autofagossomo é definido como uma estrutura de dupla membrana contendo material citoplasmático não digerido e ainda não fusionado com lisossomos<sup>[6]</sup> (Fig. 2).



**Figura 2: Morfologia de autofagossomos e autolisossomos.** Microscopia eletrônica de fibroblastos embrionários murinos após privação de nutrientes. As setas indicam autofagossomos, as setas duplas apontam os autolisossomos e as pontas de seta fragmentos de retículo endoplasmático dentro do autofagossomo.

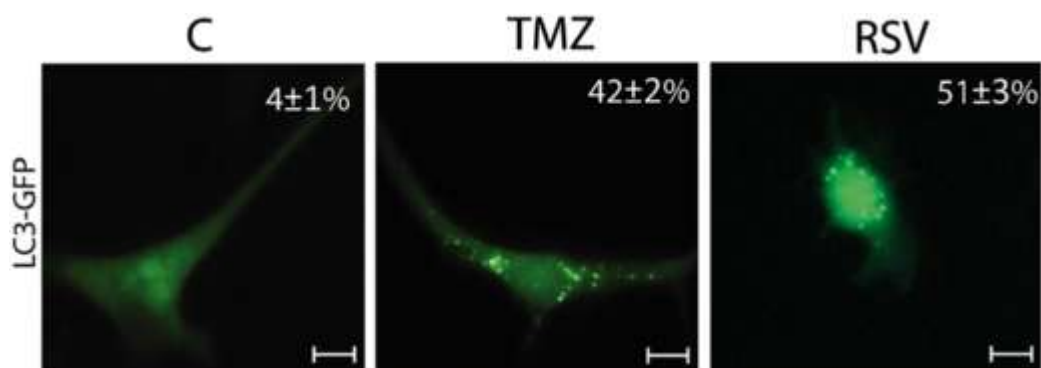
Adaptado de "Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell 2010, 140, 313-326"



Os autofagossomos frequentemente englobam organelas intracelulares como mitocôndrias e fragmentos de retículo endoplasmático sendo, usualmente, facilmente identificados. Em contraste, a distinção de autolisossomos de outros compartimentos celulares membranosos é muitas vezes difícil. O autolisossomo é uma organela gerada pela fusão de um autofagossomo e um lisossomo, possui uma membrana simples e material citoplasmático em vários estágios de degradação. Assim, embora a microscopia eletrônica seja uma ferramenta poderosa, não é um método perfeito e está limitado no seu potencial de aplicação.<sup>[6]</sup>

### **1.2.2 Ensaio de agregação de GFP-LC3 (*GFP-LC3 puncta formation*)**

A avaliação por microscopia eletrônica requer conhecimento especializado e está sendo substituída por métodos de microscopia de luz e bioquímicos, sendo mais acessíveis a pesquisadores em diferentes campos. A proteína LC3 é um marcador de autofagossomos. Logo após a síntese, ela é processada pela proteína Atg4 e torna-se LC3-I, a qual possui um resíduo de lisina na extremidade C-terminal. LC3-I é subsequentemente conjugado com fosfatidiletanolamina para tornar-se LC3-II através de uma reação enzimática *ubiquitination-like*. Em contraste com a localização citoplasmática de LC3-I, LC3-II se associa com ambas as membranas interna e externa dos autofagossomos. Após a fusão com o lisossomo, a LC3 da membrana externa é clivada por Atg4 e a LC3 da membrana interna é degradada pelas enzimas lisossomais, resultando em baixo conteúdo de LC3 no autolisossomo. Assim, LC3 endógena ou GFP-LC3 é visualizada por microscopia de fluorescência difusa no citoplasma ou como estruturas puntiformes que representam os autofagossomos (Fig. 3).<sup>[15]</sup>

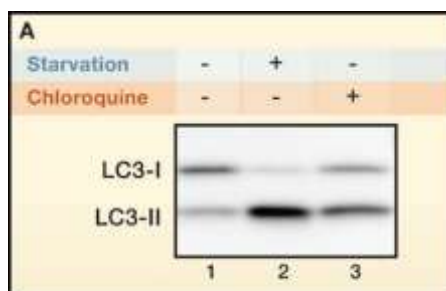


**Figura 3: Indução de autofagia em células U87.** Formação de LC3 puncta (pontos verdes) pelo tratamento com Resvetratrol e Temozolomida. Os pontos verdes observados representam os autofagossomos.

Adaptado de “Filippi-Chiela, EC; Thomé, MP; Bueno e Silva, MM; Pelegrini, AL; Ledur, PF; Garicochea, B; Zamin,, LL; Lenz, G. Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. BMC Cancer 2013, 13:147.”

### 1.2.3 Ensaio de conversão de LC3 I/II através de western blot

Além da sua utilidade em ensaios de microscopia de fluorescência, LC3 é também útil em ensaios bioquímicos para avaliar a formação de autofagossomos. A conversão de LC3-I em LC3-II ou GFP-LC3-I em GFP-LC3-II pode ser detectada por imunodeteccção com anticorpos contra LC3 ou GFP. Embora o peso molecular (MW) real de LC3-II é maior do que o de LC3-I, LC3-II migra mais rapidamente (MW aparente de 14kD) do que LC3-I (MW aparente de 16kD) em SDS-PAGE devido a maior hidrofobicidade da LC3-II (Fig. 4). A quantidade de LC3-II correlaciona-se bem com o número de autofagossomos.<sup>[6]</sup>



**Figura 4: Conversão de LC3-I em LC3-II.**

Lisado de fibroblastos embrionários murinos submetidos ou não a privação de nutrientes e tratados ou não com cloroquina por 1 hora. Anticorpos anti LC3.

Adaptado de “Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. Cell 2010, 140, 313-326”

### 1.2.4 Níveis de p62

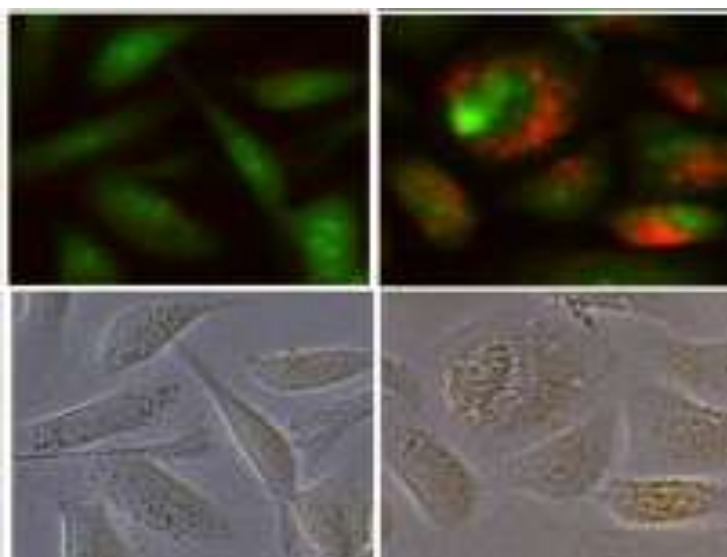
p62, também conhecido como SQSTM1, é um substrato da autofagia, sendo seletivamente incorporado dentro dos autofagossomos por ligação direta com LC3 e degradada com a conclusão do processo autofágico. Com isso, os níveis de p62

estão aumentados quando a autofagia está inibida e diminuídos quando há atividade autofágica aumentada.<sup>[6]</sup>

Além desses métodos de detecção da formação de autofagossomos, existem inúmeros outros disponíveis para avaliar o fluxo autofágico que permitem distinguir se o acúmulo de autofagossomos acontece por indução de autofagia ou por bloqueio dos passos seguintes a formação dos autofagossomos. Tais métodos avaliam a degradação de LC3 ou de outros substratos específicos.

### 1.3 Laranja de acridina

Várias substâncias lipofílicas sem carga são capazes de cruzar membranas biológicas por um mecanismo de permeação não seletivo. O marcador fluorescente laranja de acridina (AO) é uma base fraca. Em pH ácido, bases fracas aceitam um próton e são convertidas em substâncias carregadas positivamente que não são mais capazes de atravessar livremente as membranas celulares. Em função dessa propriedade, AO se acumula e fica retido em compartimentos ácidos.<sup>[7]</sup> Isso permite o seu uso como um marcador de autofagossomos maduros. Em células marcadas com laranja de acridina, o citoplasma e o nucléolo fluorescem verde, enquanto que compartimentos ácidos fluorescem vermelho. A intensidade da fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez, permitindo assim, que tanto o número de células autofágicas quanto a intensidade de autofagia, inferida pela avaliação do volume de compartimentos celulares ácidos, possam ser quantificados.<sup>[7]</sup>

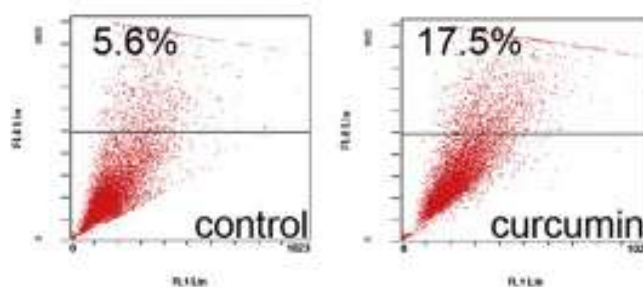


**Figura 5: Marcação com laranja de acridina em células PC3 (câncer de próstata) tratadas com ácido ursólico.** As figuras superiores mostram a marcação com Laranja de acridina, à esquerda o controle e à direita o tratamento, mostrando indução de autofagia. Abaixo está apresentado a morfologia das células.

Adaptado de “Shin SW, Kim SY, Park JW. Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Biochim Biophys Acta* 2012, 1823: 451–457.

A figura 5 mostra a marcação de células com laranja de acridina, onde o citoplasma e nucléolo fluorescem verde, enquanto compartimentos ácidos fluorescem vermelho ou alaranjado.<sup>[8]</sup>

Atualmente, a quantificação da marcação com AO por citometria de fluxo é feita traçando um limiar no eixo da fluorescência vermelha (FL3-H, eixo y) de maneira que no controle haja uma população positiva de 5 a 10% (Figura 6).<sup>[9]</sup> A partir dessa configuração, é feita a análise para as demais situações para avaliar o desenvolvimento de AVOs (Organelas Vesiculares Ácidas). No presente trabalho, nós propomos uma nova abordagem para quantificação dos dados de citometria de fluxo com laranja de acridina, como apresentado nas seções a seguir.



**Figura 6: Indução de autofagia por curcumina em células OSCC (carcinoma oral de células escamosas).** Plotagem representativa da quantificação de células com desenvolvimento de AVOs pela marcação com laranja de acridina.

Adaptado de “Kim JY, Cho TJ, Woo BH, Choi KU, Lee CH, Ryu MH, Park HR. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. Arch Oral Biol. 2012 Aug; 57(8):1018-25”

O tamanho celular é controlado por inúmeros sinais e condições, tais como atividade de mTOR<sup>[15]</sup> ou como variações populacionais. Nesses e noutros casos, a análise da marcação com laranja de acridina por citometria de fluxo não deveria considerar somente a intensidade absoluta da fluorescência vermelha, uma vez que células menores irão incorporar uma menor quantidade da substância. Na mesma linha de raciocínio, células que apresentam aumento de volume podem apresentar maior intensidade de fluorescência vermelha não em função da indução de autofagia, mas sim pelo aumento da quantidade incorporada do marcador.

Com isso, esse trabalho tem como principal objetivo comparar os resultados do método de análise que vem sendo usado para quantificar a formação de AVOs com a marcação com laranja de acridina com um novo método de análise que permite a quantificação não somente da intensidade absoluta de fluorescência vermelha, mas a intensidade relativa da fluorescência vermelha e verde. Uma quantificação relativa vai levar em conta o fato de que células com diferentes tamanhos incorporam diferentes quantidades de laranja de acridina.

O refinamento da metodologia de análise dos dados de laranja de acridina proposto aqui deve permitir um maior uso da ferramenta na análise de autofagia. Apesar de não ser totalmente específica para análise do processo autofágico, a análise de AVOs através dessa técnica tem inúmeras vantagens com relação a outras metodologias, sendo barata, simples e permitindo uma ampla triagem inicial da modulação da autofagia.

## **2 Trabalho experimental**

Intenção de submissão ao periódico "Autophagy"

### **New approach for analysis of autophagy with acridine orange staining**

Marcos Paulo Thomé<sup>1</sup>; Eduardo Cremonese Filippi-Chiela<sup>1</sup>; Guido Lenz<sup>1,2</sup>

1 – Department of Biophysics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43431 – Lab. 107, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil

2 – Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: lenz@ufrgs.br

## 2.1 Abbreviations

AO – **A**cridine **O**range

Atg8 – **A**utophagy-related protein 8

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

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

LC3 – Microtubule-associated protein **L**ight **C**hain 3

mTOR – **m**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin

TMZ (or T) – **T**emozolomide

## **New approach for analysis of autophagy with acridine orange staining**

Marcos Paulo Thomé; Eduardo Cremonese Filippi-Chiela; Guido Lenz

### **2.2 Abstract**

Several methods have been developed and extensively employed in determining several aspects of the autophagic process. These methods are based on the levels of key components of the regulatory machinery of autophagy, post-translational modification and subcellular localization of these components, imaging and staining of subcellular compartments. Acridine orange (AO) is a cell permeable and pH sensitive fluorophore that fluoresces green at the cytosolic pH. Upon entering acidic compartments, AO is protonated and suffers a red shift in its fluorescence. Therefore, AO staining is a fast and cheap method to quantify the acidic compartments in a cell, which increase upon autophagy induction. Up to now, the majority of methods used absolute red fluorescence levels to measure autophagy, which can produce artifacts, mainly due to differences in cell size. Here we propose a threshold setting that considers the relative intensity of red and green fluorescence to quantify data obtained from AO staining by flow cytometry. Relative quantification will take into account the possibility that cells with different sizes incorporate different amount of acridine orange. Results obtained with the proposed threshold setting show closer correlation with the results of LC3-I to LC3-II conversion, p62 degradation and GFP-LC3 puncta formation assay than the current threshold setting, indicating that, with the proposed threshold, AO staining can be used as an initial method for evaluating autophagy.

**Key words:** Autophagy, Acridine orange, flow cytometry



## 2.3 Introduction

Autophagy is a highly conserved cellular mechanism that plays a key role in the turnover of long-lived proteins, RNA, and other macromolecules.<sup>[10]</sup> In certain contexts including starvation or stress,<sup>[11,12]</sup> autophagy represents an adaptive strategy by which cells clear damaged organelles and survive nutritional bioenergetic stress.

Several methods for monitoring autophagy have been developed, including methods based on electronic microscopy, fluorescent microscopy, western blot, flow cytometry and biochemical methods. Many uncharged lipophilic substances are able to cross biological membranes by an unselective permeation mechanism. The fluorescent dye acridine orange (AO) is a weak base. At acid pH, weak bases will accept a proton and be converted to a positively charged substance which is no longer capable of passing freely through cellular membranes. Thus, AO will become trapped within acid compartments.<sup>[7]</sup> This enables its use as a marker of matured autophagosomes. In acridine orange-stained cells, the cytoplasm and nucleolus fluoresce bright green and dim red, whereas acidic compartments fluoresce bright red. So, the intensity of the red fluorescence is proportional to the volume of acidic compartments. Therefore, the volume of the cellular acidic compartment can be quantified.<sup>[7]</sup>

Once autophagy is the process by which cytoplasmic constituents and entire organelles are sequestered into the lytic component and characterized by the formation and promotion of acidic vesicular organelles (AVOs), to assess the occurrence of AVOs, cells can be stained with acridine orange. It is not a specific marker for autophagy because it primarily detects all acidic compartments, such as lysosomes. However it is a good screening method for autophagy, since it is cheap and fast. For monitoring autophagy, whenever possible, additional assays, such as GFP-Atg8/LC3 fluorescence or electron microscopy, should be used to substantiate results obtained with acidotropic dyes.

Pathways that control autophagy, such as mTOR, also affect cell size.<sup>[13]</sup> Thereby, when analyzing acridine orange staining by flow cytometry, should not be considered just the absolute intensity of red fluorescence, once smaller cells will

incorporate a smaller amount of the substance and, consequently, will emit less red fluorescence, therefore potentially being considered false negatives. The opposite situation, when cells become larger, would cause an increase of false positives.

Thus, our main objective is to propose a new method for analyzing data from AO-stained cells by flow cytometry that considers the relative intensity of red and green fluorescence, contrary to the custom analysis which considers only the absolute level of red fluorescence. Relative quantification will take into account the possibility that cells with different sizes incorporate different amount of acridine orange.

## 2.4 Materials and methods

### *Antibodies and reagents*

Antibodies anti-LC3A and anti-p62 were purchased from Cell Signaling Technology. Temozolomide (TMZ) and the fluorescent dye acridine orange (AO) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Temozolomide was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Acros Organics, NJ, USA) and AO was dissolved in water. All culture materials were obtained from Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

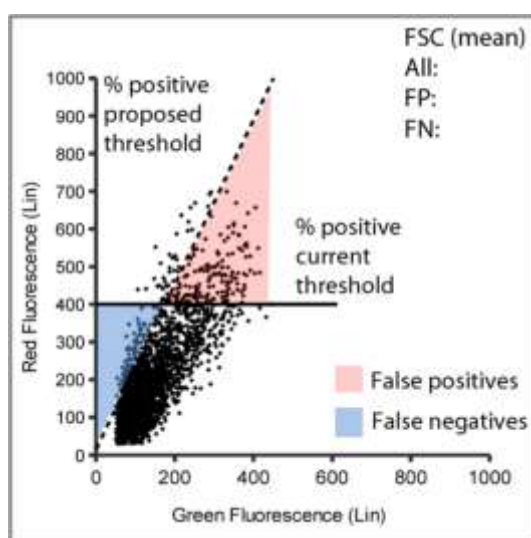
### *Cell culture and treatments*

Glioblastoma cell lines A172 and U251 were obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). U87 GFP-LC3 (permanently expressing the protein LC3 fused with GFP, elsewhere described just as U87) were kindly provided by María S. Soenga. Cell lines were cultured in DMEM low glucose supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin and 0.1% amphotericin B at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Cells were treated with TMZ (an alkylating agent that has been shown to induce autophagy in many glioma cell lines)<sup>[14]</sup> for 72h in the concentrations 50 and 75µM for A172, 25 and 50µM for U251 and 50 and 100 µM for U87.

### *Autophagy detection and quantification by Acridine Orange staining*

To quantify the development of Acidic Vesicular Organelles (AVOs), we performed vital staining with acridine orange (AO) as described previously.<sup>[14, 15]</sup> Briefly, cells were collected by trypsinization, stained with acridine orange (1 µg/mL) for 15 min at room temperature and analyzed with a GUAVA EasyCyte flow cytometer and GUAVA software ExpressPlus (Guava Technologies, Hayward, CA). Individual events data of Forward Scatter (FSC), Side Scatter (SSC), Red and Green Fluorescence were extracted by WinMDI 2.9 software for Windows (Joseph Trotter, San Diego, USA). Dot plots were produced by Apache OpenOffice.org 3.4.0. First, events were gated in a FSC vs SSC plot. For 3,000 events gated, intensity of the red fluorescence was plotted in y axis and green fluorescence in x axis, both in linear

scale. In another approach, red and green fluorescence ratio was plotted versus FSC. To quantify the development of AVOs, according to the current threshold setting, a threshold is traced perpendicular to the red fluorescence axis and events above the threshold are considered positive. Our proposal is to set an inclined threshold along population axis, so that the red:green relative fluorescence, rather than only the red fluorescence, is considered, which may be determined by a linear equation  $y = ax + b$ , where slope ( $a$ ) and y-intercept ( $b$ ) values can be set according to the population distribution. Events above the line are considered positive (Fig. 1).



**Figure 1: Legend for flow cytometry dot plots.** Perpendicular threshold (current threshold settings) and inclined threshold (proposed) are shown, as well as the percentages considered positive in each one. Considering the proposed method, blue shaded area will correspond to false negatives events (FN) and red shaded area, the false positives (FP), when analyzed with perpendicular threshold. The mean of FSC values are show for all events, FP and FN events.

### Western Blot Analysis

Analysis of protein expression was performed as described previously with minor modifications. Briefly, cells were lysed, protein concentration was quantified by QuantiPro BCA Assay Kit. Thirty  $\mu\text{g}$  of protein extracts were separated according to molecular weight on 15% SDS-PAGE, followed by electrotransfer to a PVDF membrane (Millipore, Bedford, USA). Unspecific binding sites were saturated by incubating membranes for 1h in TRIS-buffered saline (TBS) supplemented with 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) and 5% non-fat dry milk, and then membranes were incubated overnight at  $+4^{\circ}\text{C}$  with primary antibody specific for LC3 and p62 (1:500 dilution). Primary antibody was detected incubated with appropriated horseradish peroxidase (HRP) conjugated-secondary antibody (1:2000 dilution) for

2h, using ECL and X-ray films (Kodak-Xmat, Rochester, NY, USA). Optical density of the bands were obtained and quantified.

#### *GFP-LC3 puncta formation assay*

GFP-LC3 cells present a diffuse distribution under control conditions, whereas a punctuate pattern of GFP-LC3 expression (GFP-LC3 dots) is induced by autophagy. U87 GFP-LC3 cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and examined under a fluorescence microscope. To quantify autophagic cells after TMZ treatment, was counted the number of autophagic cells demonstrating GFP-LC3 dots (>5 dots/cell) among, at least, 150 cells per well.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was conducted by T test to compare the correlations between data from classical methods in autophagy (i.e. LC3 I/II conversion, LC3-GFP aggregation and p62 levels) and data from AO analysis (current *versus* proposed threshold setting). 'p' value under 0.05 was considered significant (\*). Analysis were performed on GraphPad InStat Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 2.5 Results

Our first aim was to evaluate if there was difference between the current threshold setting used to quantify the development of AVOs and the new proposed method. Thus, we analyzed 10 AO-stained cell lines treated with different drugs (data not shown). We found the greatest differences in the percentages of AO-positive cells when comparing the two methodologies in U251 glioma cells treated with Temozolomide (TMZ), an alkylating agent that has been shown to induce autophagy in many glioma cell lines.<sup>[8]</sup> Thereby, we performed AO staining in U251 cells treated with TMZ 25 and 50 $\mu$ M for 3 days. Complementarily, we analyzed autophagy induction in U87 cells treated with TMZ 50 and 100 $\mu$ M.

By the classical threshold setting, TMZ 25 and 50 $\mu$ M induced an increase of AO-positive stained cells in comparison with non-treated controls, indicating the development of AVOs, but this increase was not observed when the same data were analyzed with the proposed threshold setting (Fig. 2A, 2B and 2C). As a specific method to measure autophagy induction, we assessed the conversion of LC3-I to LC3-II protein by western blot, where we do not observe increased levels of LC3-II (Fig. 2D and 2E).

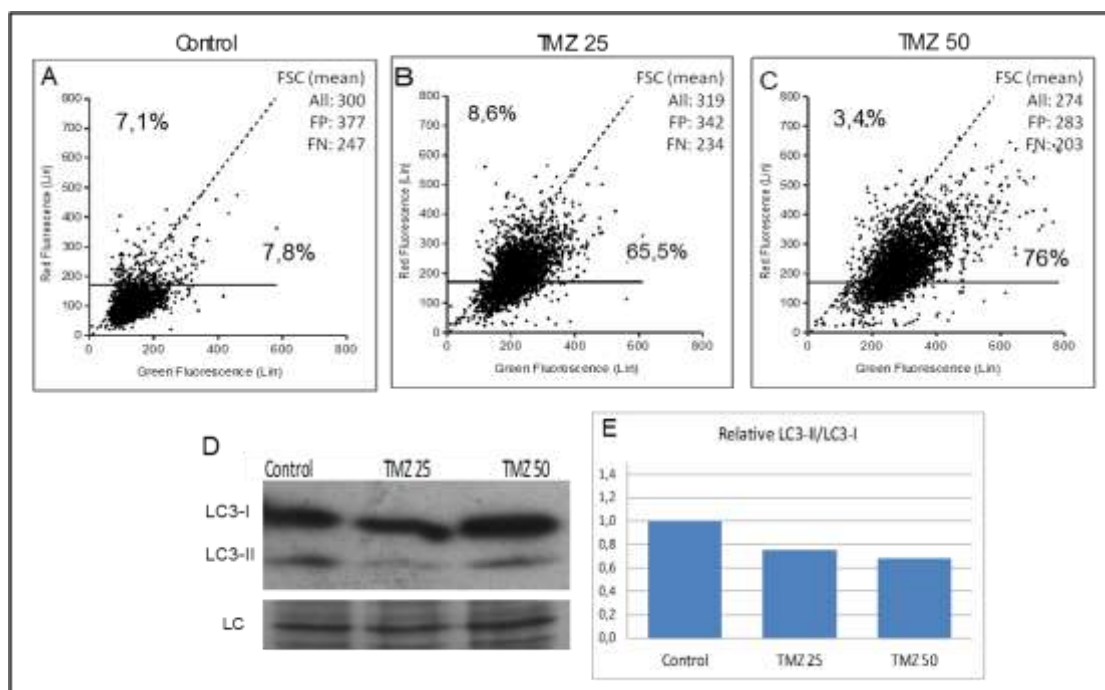
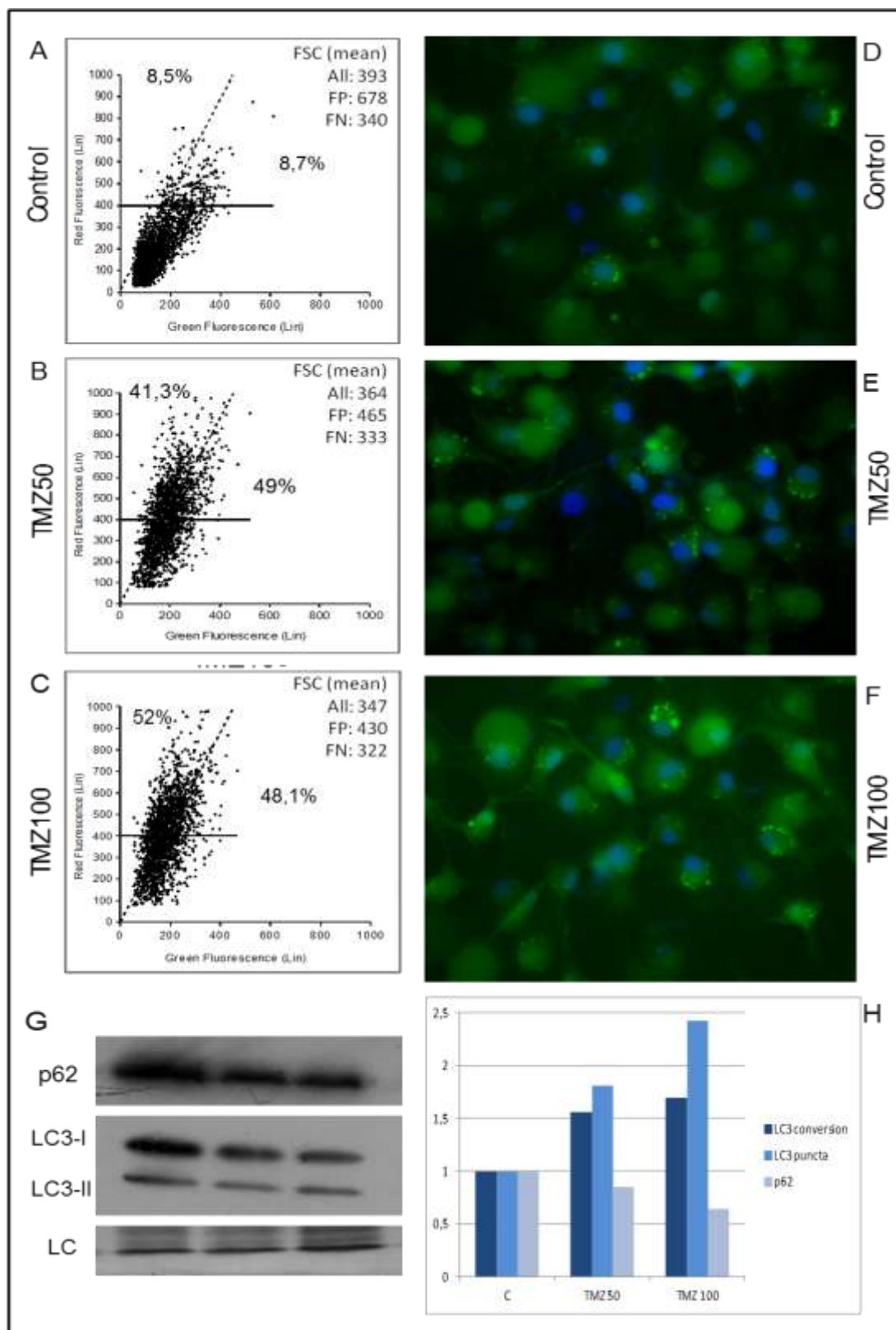


Figure 2: Detection of autophagy induction in U251 cells. A, B and C, quantification of acridine orange staining using flow cytometry and FSC mean for all, FP and FNevents. D, representative Western immunoblots showing the expression of LC3-I and LC2-II and LC (loading control). E, quantification of LC3-II/LC3-I ratio normalized to control.

For the cell line U87, considering the current threshold setting, the treatment with TMZ 50 $\mu$ M increased the percentage of AO-stained cells, relative to untreated control, but there is no further increase with TMZ 100 $\mu$ M. When analyzing with the proposed threshold setting, we observe an increased proportion of cells considered autophagic with TMZ 50 $\mu$ M and even more with TMZ 100 $\mu$ M (Fig. 3A, 3B and 3C). To accurately assess the status of autophagic activity, we measured the conversion of LC3-I to LC3-II by western blot, as well as p62 degradation. p62 is selectively incorporated into autophagosomes through direct binding to LC3 and is efficiently degraded by autophagy. Thus, the total cellular expression levels of p62 inversely correlate with autophagic activity. Western blot analysis revealed an increased conversion from LC3-I to LC3-II of 56 and 70% for TMZ 50 and TMZ 100 $\mu$ M, respectively, relative to control (Fig. 3G and 3H). Regarding to p62, relative to control, there was a reduction of 15 and 36% for TMZ 50 and 100 $\mu$ M, respectively (Fig. 3G and 3H).

Using sub-confluent U87 cells stably expressing GFP-LC3, after treatment with TMZ in the indicated concentrations, the visualization by fluorescence microscopy demonstrated predominantly diffuse cytoplasmic distribution for controls which displayed 19% of cells considered autophagic (more than 5 LC3 puncta/cell). For TMZ 50 and 100  $\mu$ M there was an increase to 34 and 46% of autophagic cells, respectively, what represents an increase of 1,8 and 2,4 times relative to control (Fig. 3D, 3E, 3F and 3H).



**Figure 3: Detection of autophagy induction in U87 cells.** **A, B and C**, quantification of acridine orange staining using flow cytometry, showing the percentage of AO-positive cells in both classical and proposed way of analysis as well as FSC mean for all, FP and FN events. **D, E and F**, representative micrographs of GFP-LC3 puncta formation analysis in U87 cells stably expressing LC3 protein. **G**, representative Western immunoblots showing the expression of p62, LC3-I, LC2-II and LC (loading control). **H**, quantification of LC3-II/LC3-I ratio and p62 expression normalized to control and quantification of cells that exhibit 5 or more green dots (autophagic cells).



## 2.6 Discussion

After literature review, we found several works using acridine orange staining for monitoring autophagy. When analyzing the results by flow cytometry, 58 works of the 59 analyzed, trace a threshold parallel to the axis of red fluorescence and just one along axis of population. Due to the physical-chemical properties of this dye, we hypothesized that an inclined threshold may be more correct to the analysis, since it would take into account red and green fluorescence ratio.

Treatment with TMZ 25 and 50 $\mu$ M did not induce autophagy in U251 cells, since no increase in the conversion from LC3-I to LC3-II was observed. The perpendicular threshold used to quantify AO-stained cells showed a strong increase in the positive population, whereas when the same dot plot was analyzed with the proposed threshold setting, taking into account red and green fluorescence ratio, this induction was not observed, likewise the result of LC3 conversion assay. This fact supports that the proposed analysis provides trustworthy results and could avoid false positives and false negatives which are present in the classical method. False negatives are mainly small cells that have low fluorescence intensity but greater red:green fluorescence ratio, while false positives are mainly observed when there are more events with FSC increased, what well correlates with increased cell size (Fig. 2A, 2B and 2C).

For the cell line U87 there are not results as divergent as in U251, but since they are evident, we tested the correlation between results from the two methods (inclined and perpendicular thresholds) against results of LC3 conversion and p62 western blot and GFP-LC3 puncta formation assay. As expected, LC3-I to LC3-II conversion and LC3 puncta formation assay have strong correlation between them (0,99), as well with p62 detection by western blot (-0,96 and -0,98), but inverse correlation because p62 levels decrease with increased autophagic activity. Correlation between these three methods are always stronger with the results for inclined threshold rather than perpendicular threshold (Table 1) and these different correlations are statistically significant, reinforcing the idea that our proposed method provides more reliable results.

	LC3 conversion	LC3 punta	p62
LC3 conversion		0,99	-0,96
LC3 punta			-0,98
Perpendicular	0,87	0,80	0,64
Inclined	0,99*	0,96*	0,86*

**Table 1: Correlation between methods.** Correlation between LC3-II to LC3-I conversion, LC3 punta formation and p62 expression and between these methods and the current threshold setting to quantify acridine orange staining (perpendicular) and the proposed threshold setting (inclined) in U87 cells. \*p<0,05 in relation to perpendicular threshold

Similarly to U251, for U87 we also observed that false negatives correspond to small cells, as evidenced by lower FSC, and false positives correspond to big cells, since they present higher FSC (Fig. 2A, 2B and 2C).

Taken together, our results support our initial hypothesis that smaller cells incorporate a smaller amount of acridine orange and, consequently, emit less red fluorescence, being considered false negatives, and the opposite situation, that larger cells are easily considered false positives because they have more absolute red fluorescence, but not increased red:green fluorescence ratio. Therefore, our proposed threshold setting, which considers the relative intensity of red and green fluorescence, is useful as an initial method for evaluating autophagy.

## 2.7 References

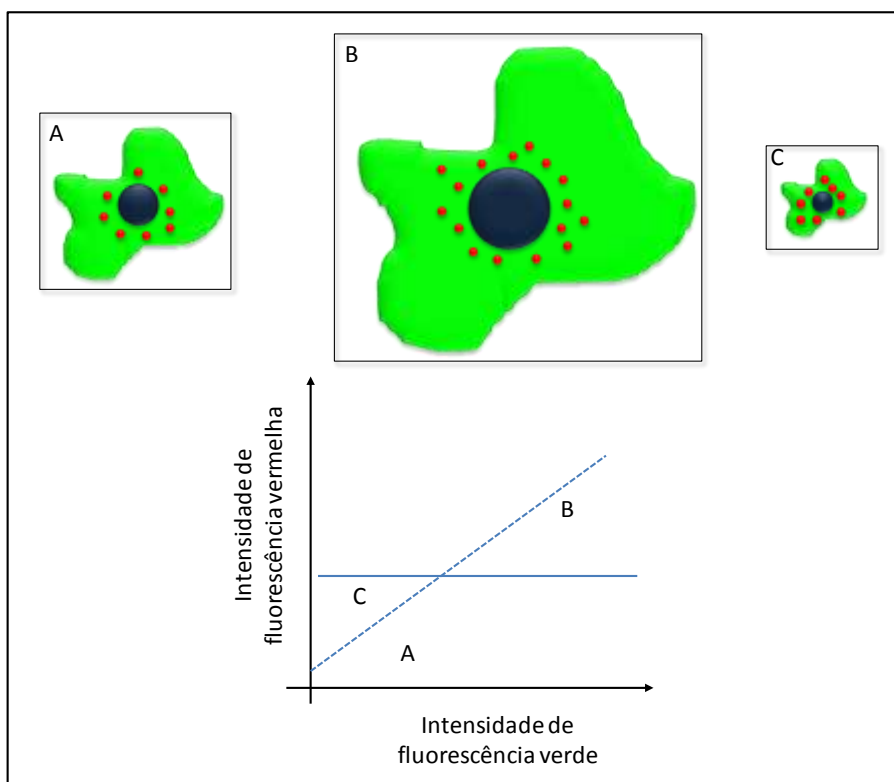
- (1) Eskelinen, E. L., and Saftig, P. (2009). Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 664–673.
- (2) Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys* 462, 245–253.
- (3) Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 741–752.
- (4) Meléndez, A. and Levine, B. Autophagy in *C. elegans* (2009), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.147.1.
- (5) Klionsky D. J.; Cuervo A. M.; Seglen P.O. (2007) Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 3:3, 181-206.
- (6) Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. (2010) Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* 140, 313-326.
- (7) Traganos F., Darzynkiewicz Z. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations. *Methods Cell Biol.*, 41: 185-194, 1994.
- (8) Shin SW, Kim SY, Park JW (2012) Autophagy inhibition enhances ursolic acid-induced apoptosis in PC3 cells. *Biochim Biophys Acta* 1823: 451–457.
- (9) Kim JY, Cho TJ, Woo BH, Choi KU, Lee CH, Ryu MH, Park HR. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. *Arch Oral Biol.* 2012 Aug; 57(8):1018-25.
- (10) Cuervo AM. Autophagy: Many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; 263:55-72.
- (11) Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6:463-77.
- (12) Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: Cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:439-48.

- 
- (13) Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 2002; 16:1472–1487.
- (14) Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S: **Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells.** *Cell Death Differ* 2004, **11**:448-457
- (15) Filippi-Chiela, EC; Thomé, MP; Bueno e Silva, MM; Pelegrini, AL; Ledur, PF; Garicochea, B; Zamin,, LL; Lenz, G. Resveratrol abrogates the Temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the Temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer* 2013, **13**:147.

### 3 Conclusões e perspectivas

Propomos neste trabalho uma nova maneira de analisar dados de marcação com laranja de acridina por citometria de fluxo. Partindo da premissa que células de diferentes tamanhos incorporam quantidades diferentes do marcador, julgamos que a análise não deve levar em conta somente intensidade absoluta de fluorescência vermelha para delimitar um ponto a partir do qual células com valores de fluorescência acima desse limiar sejam consideradas positivas. Essa é a atual forma utilizada para quantificar o desenvolvimento de AVOs e, sendo assim, células menores ou cujo tratamento leva a uma redução do tamanho, mesmo que apresentem uma indução de autofagia poderão ser consideradas negativas pelo fato de terem incorporado uma menor quantidade de AO e não terem atingido um valor de fluorescência vermelha além do valor do limiar reto (ilustrado na Fig. 7, situação A e C. Observe que com a forma de análise proposta essa indução seria detectada). De forma contrária, células maiores serão facilmente consideradas positivas mesmo que não tenham uma indução de autofagia, pelo fato de terem maior volume de compartimentos ácidos (Fig. 7, situação A e B. Neste caso, a análise proposta não consideraria a célula B como positiva, apesar de ter uma intensidade maior de fluorescência vermelha, mas não um aumento na proporção das fluorescências vermelho:verde).

A nova proposta sugere levar em conta a razão da fluorescência vermelha pela fluorescência verde. Uma vez que a fluorescência verde está proporcionalmente relacionada ao tamanho da célula, essa análise se torna mais abrangente e consegue avaliar a indução de autofagia em células maiores ou menores. Para isso, pode-se obter os valores de fluorescência individuais, calcular a razão de fluorescência vermelha:verde e então fazer a análise ou simplesmente traçar um limiar inclinado ao longo do eixo da população no gráfico de fluorescência verde *versus* vermelha, que corresponde matematicamente à razão das fluorescências.



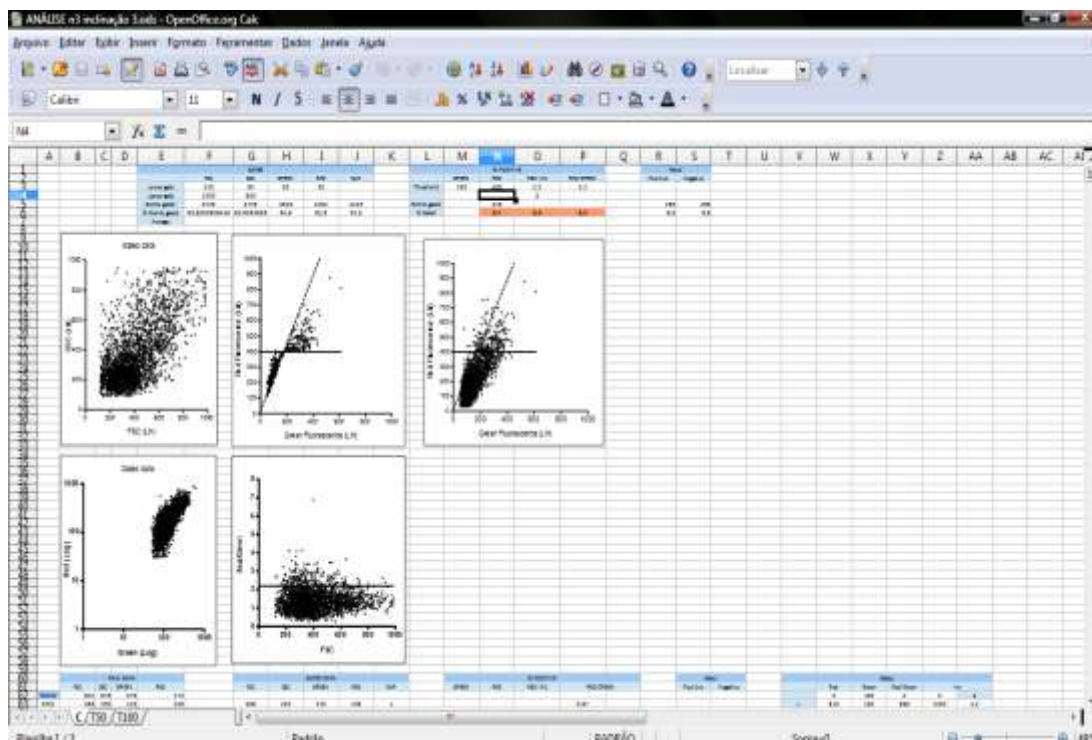
**Figura 7: Representação esquemática da indução ou não de autofagia em células de diferentes tamanhos.**

A partir de resultados obtidos com as duas formas de análise, comparamos com outros métodos bem estabelecidos para avaliar autofagia (conversão de LC3-I em LC3-II, degradação de p62 e ensaio de formação de GFP-LC3 dots). Encontramos melhor correlação dos resultados desses três métodos com o método proposto, o que reforça a ideia que esse método possui resultados mais fiáveis.

Temos a perspectiva de publicar os resultados para que futuras análises de marcação com laranja de acridina levem em consideração a nossa proposta.

## 4 Anexos

Planilha do OpenOffice desenvolvida para analisar os dados de citometria de fluxo.



*Formatação exigida pelo periódico*

Intenção de submissão do trabalho para o periódico "Autophagy".

Formatação exigida disponível no endereço eletrônico:

<http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/guidelines/#submission>