

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIHEL STUMPF VIEGAS

**AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR E DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA EM
LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO POR MEIO DO
TRATAMENTO COMBINADO *IN VITRO* COM 5-FLUORACILA E SMER28**

PORTO ALEGRE

2015

GABRIHEL STUMPF VIEGAS

**AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR E DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA EM
LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO POR MEIO DO
TRATAMENTO COMBINADO *IN VITRO* COM 5-FLUORACILA E SMER28**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

PORTO ALEGRE

2015

GABRIHEL STUMPF VIEGAS

**AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR E DA INDUÇÃO AUTOFÁGICA EM
LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO POR MEIO DO
TRATAMENTO COMBINADO *IN VITRO* COM 5-FLUORACILA E SMER28**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito parcial para obtenção do título de bacharel
em Ciências Biológicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Aprovado em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Guido Lenz

Prof. Jenifer Saffi

Dr. Eduardo Chiela

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família querida (Mãe, Pai, Mi e Paty) pela boa educação, pela dedicação constante, pelo exemplo de conduta, pelo incentivo nas escolhas e pelo apoio incondicional, desde sempre. Nada é mais importante que vocês para mim.

Agradeço os meus familiares... Avó, tios, tias, primos e primas pela companhia nos finais de semana, nos aniversários e em nossas comemorações constantes.

Agradeço ao Professor Diego, por me aceitar como seu aluno de iniciação científica, pelos ensinamentos diários e, sobretudo, por ter acreditado no meu potencial ao longo desses cinco anos.

Agradeço a Lari, o Kendi, o Bruno, a Joice, a Bia e a Raquel, por tudo. Vocês são pessoas incríveis, excelentes alunos de pós-graduação e, certamente, serão grandes pesquisadores no futuro próximo.

Agradeço o Henrique, o Marcelo, o Gabriel e o Itamar, por tudo também. Vocês são brilhantes e, certamente, os melhores colegas de iniciação científica que eu poderia ter tido.

Agradeço o Eduardo, o Andrew e a Mardja, que em incontáveis momentos deixaram suas obrigações de lado para me ensinar sobre biologia celular. Sem vocês, este trabalho não existiria.

Agradeço o Marcos, a Alexandra, e a Michele por serem solícitos e atenciosos comigo, oferecendo ajuda diariamente com as técnicas que já dominam, nos últimos meses.

Agradeço os meus amigos da biologia, que contribuíram indiretamente para esse trabalho, e me proporcionaram uma graduação incrível... Repleta de amizade e saídas de campo inesquecíveis.

Por fim, agradeço os meus amigos do ensino médio, que seguem presentes e também contribuíram de forma indireta para esse trabalho, me apoiando e me incentivando.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMO.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 CÂNCER GÁSTRICO.....	9
1.2 QUIMIOTERAPIA DO CÂNCER GÁSTRICO.....	9
1.3 AUTOFAGIA.....	10
1.4 MECANISMO AUTOFÁGICO.....	11
1.5 MODULAÇÃO AUTOFÁGICA NA TERAPIA ANTICÂNCER.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO.....	21
6. PERSPECTIVAS.....	23
7. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	24
8. REFERÊNCIAS.....	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU - 5-fluoracil (*5-fluoracil*)

5-FdUTP - 5-fluorodeoxiuridina (*5-fluorodeoxyuridine*)

ACP02 - linhagem de adenocarcinoma gástrico primário (*Primary Gastric Adenocarcinoma Cell Line 02*)

ATGs - proteínas expressas pelos genes associados a autofagia (*Autophagy-related proteins*)

Bcl-2 - proteína 2 de linfoma de células B (*B-Cell Lymphoma 2*)

Bec-1 - proteína beclina-1 (*Beclin-1*)

Caspase-3 - proteína caspase-3

Caspase-8 - proteína caspase-8

CG - câncer gástrico (*Gastric Cancer*)

CGDH - câncer gástrico difuso hereditário (*Hereditary Diffuse Gastric Cancer*)

DMSO - dimetilsulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

INCA - instituto nacional do câncer (*National Institute of Cancer*)

IP - iodeto de propídio (*Propidium Iodide*)

LA - laranja de acridina (*Acridine Orange*)

LC3II - proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (*Light Chain 3 of microtubule-associated protein 2*)

LC3-GFP – proteína LC3 fusionada à proteína verde fluorescente (GFP) (*LC3 protein fused to Green Fluorescent Protein*)

MNP01- linhagem de mucosa gástrica normal (*Normal Gastric Mucosa Cell Line 01*)

mTOR - proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin*)

mTORC1- complexo 1 da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*)

p62 - proteína sequestosma 1 (*Sequestosome 1/p62*)

PARP - proteína poli-ADP-ribose polimerase (*Poly-ADP-ribose polymerase*)

PE - fosfatidiletanolamina (*Phosphatidylethanolamine*)

SFB - soro fetal bovino (*Bovine Fetal Serum*)

SMER28 - pequenas moléculas reforçadoras da rapamicina (*Small Molecules Enhancer of Rapamycin 28*)

TTP - timina trifosfato (*Thymidine triphosphate*)

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS PRINCIPAIS

Figura 1 – Representação esquemática da autofagia mostrando as fases de nucleação vesicular, alongamento vesicular, fechamento vesicular, fusão e degradação..... 12

Figura 2 – Gráfico mostrando os níveis autofágicos apresentado por células das linhagens MNP01 e ACP02 após 5 dias de tratamento com 5-FU, SMER28 e 5-FU + SMER28..... 18

Figura 3 – Gráfico mostrando a porcentagem de células autofágicas apresentado por células das linhagens MNP01 e ACP02 após 5 dias de tratamento com 5-FU, SMER28 e 5-FU + SMER28..... 19

Figura 4 – Gráficos mostrando as porcentagens de morte celular apoptótica apresentado por células das linhagens MNP01 e ACP02 após 5 dias de tratamento com 5-FU, SMER28 e 5-FU + SMER28..... 19

Figura 5 – Gráficos mostrando as porcentagens de morte celular por necrose apresentado por células das linhagens MNP01 e ACP02 após 5 dias de tratamento com 5-FU, SMER28 e 5-FU + SMER28..... 20

FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura complementar 1 - Amostragem das citometrias mostrando as médias da porcentagem de células das linhagens MNP01 e ACP02 positivamente marcadas com LA e da intensidade de fluorescência vermelha oriunda da marcação com LA..... 24

Figura complementar 2 - Amostragem das citometrias mostrando a porcentagem de células das linhagens MNP01 e ACP02 marcadas positivamente com anexina e iodeto de propídio..... 25

RESUMO

O CG está entre os tipos de câncer mais comuns e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade ao redor do mundo. Na tentativa de contornar a resistência e minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia, trabalhos recentes baseados na combinação entre quimioterápicos e moduladores autofágicos surgem como alternativa terapêutica. A autofagia é um processo catabólico estresse-induzido baseado no sequestro e no transporte de componentes celulares para a degradação lisossômica. Dessa forma, a autofagia participa da proliferação de neoplasias, atuando ora como mecanismo supressor ora como mecanismo promotor tumoral. Por isso, este trabalho teve como objetivo analisar a combinação do SMER28 com o 5-FU em células da linhagem epitelial gástrica MNP01 e da linhagem tumoral gástrica ACP02. Os níveis autofágicos foram avaliados por meio da marcação com laranja de acridina, enquanto as mortes apoptótica e necrótica foram avaliadas pela marcação com anexina e iodeto de propídio, respectivamente. Este trabalho mostrou que o SMER28 aumenta a autofagia, sem aumentar o número de células autofágicas, induzida pelo 5-FU em células da linhagem ACP02. Além disso, o SMER28 aumentou a morte apoptótica e não alterou a morte necrótica induzida pelo 5-FU em células da linhagem ACP02. Considerando a ascensão dos níveis autofágicos observados neste trabalho, é possível que o SMER28 tenha intensificado a formação de autofagossomos induzida pelo 5-FU nas células da linhagem ACP02. Ainda, considerando o aumento da morte por apoptose observada neste trabalho, é possível que o reforço autofágico promovido pelo SMER28 também possa intensificar a apoptose induzida pelo 5-FU nas células da linhagem ACP02. Por fim, como o SMER28 não fortalece a nocividade natural do 5-FU em células da linhagem MNP01, é possível que essa combinação apresente efeitos colaterais menos severos que a terapia combinando quimioterápicos em pacientes com malignidades gástricas. Em síntese, este trabalho mostrou que o SMER28 potencializa o efeito antitumoral do 5-FU ao reforçar a morte por apoptose em células tumorais gástricas. Estes resultados, inicialmente, demonstraram o potencial do SMER28 como agente terapêutico.

1. Introdução

1.1 Câncer gástrico

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 576 mil novos casos de câncer no Brasil para o período de 2014/2015 e cerca de 20 mil desses novos casos correspondem a malignidades gástricas (Facina 2014). O câncer gástrico (CG) é uma doença agressiva diagnosticada principalmente em homens idosos (Patru et al. 2013). Atualmente, o CG é a quarta malignidade mais frequente e, também, a segunda causa de morte relacionada com câncer mais comum na população mundial (Durães et al. 2014). O principal tratamento de neoplasias gástricas consiste em intervenções cirúrgicas, geralmente associadas a terapias adjuvantes ou neoadjuvantes, como a quimioterapia e a radioterapia (James et al. 2014). As ressecções endoscópicas e as gastrectomias parciais ou totais são drásticas, mas quando bem sucedidas podem erradicar o tumor gástrico, curando a doença (Costa et al. 2004). Por sua vez, os tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, cujos efeitos colaterais são severos, contribuem cada vez mais para o combate a malignidades gástricas. Embora avanços terapêuticos representativos no tratamento do CG tenham acontecido nas últimas décadas, a taxa de sobrevivência dos pacientes diagnosticados com essa doença ainda é inferior aos 25% (Durães et al. 2014).

Visando compreender a origem do CG, estudos epidemiológicos apontam os principais fatores de risco relacionados com o desenvolvimento dessa doença. Os maus hábitos alimentares, como o consumo exacerbado de sal na dieta, podem facilitar o desenvolvimento do CG (Gaddy et al. 2013). As infecções causadas pela bactéria *Helicobacter pylori*, que coloniza a mucosa gástrica humana, podem atingir estágios avançados e provocar diversas doenças gástricas, inclusive o CG (Barry 1984; Correa & Miller 1995). A associação do tabagismo com o alcoolismo também contribui para o surgimento do CG (Han et al. 2013). Ainda, a mutação no gene E-caderina (CDH1) pode favorecer o desenvolvimento de uma síndrome autossômica dominante conhecida como câncer gástrico difuso hereditário (CGDH) (Graziano 2003). Neste sentido, em virtude da letalidade e do diversificado conjunto de fatores de risco associados ao desenvolvimento do CG, é importante investigar diferentes maneiras de combater as malignidades gástricas.

1.2 Quimioterapia do câncer gástrico

Durante o tratamento quimioterápico, uma infinidade de compostos químicos podem ser utilizados, individualmente ou combinados, objetivando a eliminação de

malignidades (Lacerda 2001). Exemplo disso é o 5-fluoracil (5-FU), um agente antimetabolito, análogo pirimídico, eficaz no combate de tumores sólidos e usado no tratamento de adenocarcinomas gástricos (Malet-Martino 2002; Souza et al. 2011). Esse quimioterápico é capaz de inibir a atividade da timidilato sintase, impedindo a síntese de pirimidinas e comprometendo o *pool* de TTP intracelular (Rosen et al. 2011). Outro efeito citotóxico do 5-FU está associado a incorporação genômica do seu metabólito, a 5-fluorodeoxiuridina (5-FdUTP). Eventuais falhas dos mecanismos de reparo, como o de excisão de bases ou o de mal-pareamento de bases, na remoção genômica da 5-FdUTP, provocam quebras simples e duplas na fita de DNA, induzindo mutagênese (SenGupta et al. 2013; De Angelis et al. 2006). Entretanto, a citotoxicidade do 5-FU está relacionada principalmente com sua incorporação ao RNA, que inibe a biogênese de ribossomos (Svaasand et al. 2011; Burger et al. 2010).

As células tumorais gástricas sofrem mutações durante a quimioterapia, desenvolvendo resistência ao tratamento (Yi et al. 2012). Nas últimas décadas, foram estabelecidos tratamentos combinando o 5-FU com outros quimioterápicos, tais como a cisplatina, o paclitaxel, a oxaliplatina e o leucovorin, na terapia combativa a tumores gástricos. Os tratamentos combinatórios aumentam insatisfatoriamente a sobrevida dos pacientes com CG e apresentam efeitos colaterais severos (Kang et al. 2008; Kim 2003). Na tentativa de contornar a quimiorresistência e minimizar os efeitos colaterais, trabalhos recentes apostam na combinação de quimioterápicos e moduladores autofágicos como alternativa terapêutica anticâncer (Zarzynska 2014; Choi 2012).

1.2 Autofagia

Evolutivamente conservada em eucariotos, a autofagia é um processo catabólico induzido pelo estresse, baseado no sequestro e no transporte de componentes celulares para a degradação lisossômica (Vessoni et al. 2013). A autofagia é responsável pela eliminação de organelas envelhecidas e pela complementação da reciclagem de proteínas promovida pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Korolchuk et al. 2010). O processo autofágico apresenta níveis constitutivamente basais que contribuem para a manutenção da homeostase celular. Os níveis autofágicos aumentam em resposta a diferentes estímulos estressantes como a privação de nutrientes, a hipóxia, a produção de espécies reativas de oxigênio, as infecções patogênicas e os tratamentos com xenobióticos (Zarzynska 2014). No contexto adverso, a indução da

autofagia favorece a sobrevivência, mas se induzida insuficientemente ou excessivamente, provoca a morte celular (Frankel & Lund 2012; Eskelinen 2011). Dessa forma, o processo autofágico está relacionado com o desenvolvimento embrionário, o envelhecimento, o câncer, o diabetes, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, infecções bacterianas e infecções virais (Niedźwiedzka-Rystwej et al. 2013).

Inicialmente, a autofagia pode ser categorizada nos seguintes grupos principais: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas e microautofagia (Lapaquette & Guzzo 2015). Essas vias diferem entre si quanto a maneira de entregar uma carga citoplasmática ao lisossomo (Mizushima 2007). A macroautofagia é pouco seletiva e responsável pela maior parte da autofagia na célula. Durante a fase inicial da macroautofagia, os constituintes citoplasmáticos são compartimentalizados em vesículas de dupla membrana chamadas de autofagossomos (Chen et al. 2013). Essas vesículas se fundem com os lisossomos formando os autolisossomos, que catalisam a quebra dos substratos via ação das hidrolases durante a fase tardia/final da macroautofagia (Mizushima et al. 2008). Por meio dessa reciclagem de organelas defeituosas, proteínas mal estruturadas, agregados proteicos e microrganismos infectantes são gerados os precursores da biossíntese de macromoléculas e da síntese de ATP (Levine 2008).

Na autofagia mediada por chaperonas, os complexos de chaperonas presentes na membrana lisossomal funcionam como canal de entrada para as proteínas citoplasmáticas solúveis, que são degradadas no lúmen dessa organela (Majeski & Dice 2004). Na microautofagia, a membrana lisossomal pode sofrer invaginações tubulares para engolfar ou protrusões para capturar proteínas e organelas específicas. Tanto as invaginações quanto as protrusões de membrana originam vesículas que são liberadas no interior do lisossomo para degradação (Li et al. 2012). Finalmente, a alta seletividade da autofagia possibilita sua categorização conforme o seu substrato de degradação como: o núcleo (nucleofagia), as mitocôndrias (mitofagia), os peroxissomos (pexofagia) e os lipídios (lipofagia) (Mijaljica & Devenish 2013; Liu & Czaja 2013; Ding & Yin 2012; Sakai et al. 2006).

1.3 Mecanismo autofágico

A proteína mTOR é chave na regulação molecular do controle autofágico devido a sua sensibilidade aos níveis celulares de ATP e de aminoácidos. Essa proteína integra o complexo mTORC1, que é responsável pela regulação do balanço entre crescimento celular e

autofagia em resposta ao estresse (Gitto & Altomare 2015). Por exemplo, a disponibilidade de nutrientes ativa a mTOR, inibindo a autofagia e estimulando a proliferação celular. Entretanto, a ausência de nutrientes impede a ativação da mTOR, acarretando na degradação de componentes citoplasmáticos irrelevantes para célula via indução do processo autofágico (Chen et al. 2014).

No contexto estressante como a ausência de nutrientes, com a indução da via autofágica e a inativação da *mTOR*, as proteínas *ATGs* passam a regular a biogênese de autofagossomos (Figura 1). Inicialmente, o processo autofágico é dividido nas etapas de nucleação vesicular, alongamento vesicular e fechamento vesicular (Chen et al. 2014). Na nucleação, é formado um fragmento de membrana dupla que originará a vesícula autofágica (Frankel & Lund 2012). Esse fragmento de dupla membrana é isolado de diferentes fontes como o retículo endoplasmático, mitocôndrias, complexo de golgi, endossomos, membrana plasmática e membrana nuclear (Mizushima et al. 2011).

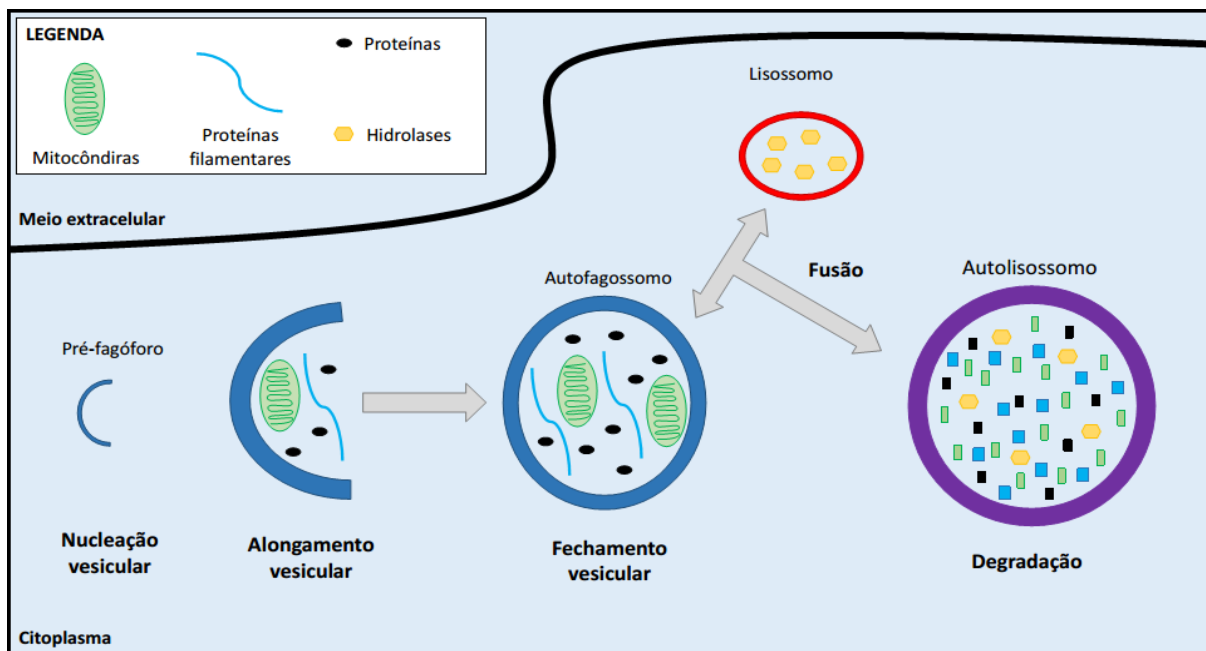


Figura 1 – Representação esquemática da autofagia mostrando as fases de nucleação vesicular, alongamento vesicular, fechamento vesicular, fusão e degradação.

No alongamento, a membrana de isolamento/pré-fagóforo inicia sua expansão ao redor de componentes necessários para a célula. Nessa etapa, as proteínas LC3, conjugadas ao lipídio fosfatidiletanolamina (PE), são incorporadas tanto a membrana externa quanto a

membrana interna do pré-fagóforo para o reconhecimento e o sequestro de cargas citosólicas dispensáveis (Wild et al. 2014; Bejarano et al. 2014). Os substratos citoplasmáticos ubiquitinados associados a proteína *p62*, através dessa proteína, interagem com a LC3 presente na membrana interna do pré-fagóforo em expansão (Shvets & Elazar 2014).

No fechamento, as extremidades do fragmento de dupla membrana se encontram/fusionam, compartimentalizando o material citosólico supérfluo dentro de um fagóforo, o autofagossomo (Noda et al. 2009). Tardiamente, o processo autofágico é marcado pela fusão dos autofagossomos com os lisossomos, formando os autolisossomos (Hundeshagen et al. 2011). Essas vesículas de pH ácido degradam o conteúdo citoplasmático, previamente compartimentalizado, pela ação das proteases lisossomais (Zarzynska 2014). Via permeases de membrana, os produtos de degradação são lançados no citoplasma e disponibilizados para os processos anabólicos celulares (Takei & Nawa 2014; Yang & Klionsky 2014).

1.4 Modulação autofágica na terapia anticâncer

No início da tumorigênese, a autofagia promove a eliminação de organelas e de proteínas que funcionam como substrato estrutural e energético para a proliferação das células tumorais (Xu et al. 2015). Ao longo da tumorigênese, o processo autofágico garante a sobrevivência das células tumorais porque fornece nutrientes e ATP enquanto a vascularização tumoral ainda não está completamente formada. Após o estabelecimento do tumor, é possível que a indução da autofagia favoreça a degradação excessiva de substratos citoplasmáticos e provoque a morte das células cancerosas (Yang et al. 2015). Ou seja, o processo autofágico pode funcionar ora como mecanismo supressor tumoral ora como mecanismo promotor tumoral.

A indução autofágica apresenta potencial terapêutico contra diversos tipos tumorais, inclusive malignidades gástricas. Por um lado, o composto isolado da *Rhizoma zedoariae* chamado β -elemeno, que apresenta efetividade antitumoral, induz autofagia protetora, antagonizando a morte apoptótica e contribuindo para sobrevivência de células tumorais gástricas (Liu et al. 2011). Por outro lado, o composto isolado do *Trypterigium wilfordii* chamado celastrol induz autofagia citotóxica, favorecendo a morte apoptótica e inibindo a proliferação de células neoplásicas gástricas (Lee et al. 2014). Ainda que a sensibilidade das células tumorais gástricas a indução autofágica permaneça controversa,

estudos clínicos de fase I são realizados em pacientes com tumores gástricos. Recentemente, um trabalho mostrou que pacientes com câncer de estômago toleraram bem a combinação do Imatinib, um indutor autofágico, com os quimioterápicos cisplatina, 5-FU ou capecitabina (Mayr et al. 2012; Ertmer et al. 2007). Portanto, investigar o efeito *in vitro* de novas combinações entre quimioterápicos e indutores autofágicos em células tumorais gástricas pode apresentar potencialidade terapêutica.

A pequena molécula reforçadora da rapamicina 28 (SMER28) é um indutor autofágico capaz de reduzir os níveis do peptídeo β -amiloide e reforçar a remoção das proteínas *huntintina* mutante e alfa-sinucleína^{A53T} *A53T α -sinuclein* em culturas celulares neuronais, mostrando potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas (Tian et al. 2011; Sarkar et al. 2009). Entretanto, permanece pouco conhecido o efeito *in vitro* da indução autofágica promovida pelo SMER28, isolado ou combinado com quimioterápicos, como o 5-FU, em células tumorais gástricas.

2.Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Analisar a combinação do 5-FU com SMER28 em células humanas da linhagem epitelial gástrica MNP01 e da linhagem tumoral gástrica ACP02.

2.2 – Objetivos Específicos

1. Elucidar o papel da autofagia na toxicidade do 5-FU em células linhagem epitelial gástrica MNP01 e da linhagem tumoral gástrica ACP02;
2. Avaliar os níveis autofágicos induzidos pelo co-tratamento de 5-FU e SMER28 em células linhagem epitelial gástrica MNP01 e da linhagem tumoral gástrica ACP02;
3. Avaliar a morte celular induzida pelo co-tratamento de 5-FU e SMER28, como apoptose e necrose em linhagem epitelial gástrica MNP01 e da linhagem tumoral gástrica ACP02.

3. Materiais e Métodos

3.1 – Reagentes

Os compostos 5-FU e SMER28, bem como o *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O marcador fluorescente laranja de acridina foi cedido pelo Laboratório de Sinalização Celular (UFRGS). O laranja de acridina foi dissolvido em água, enquanto o 5-FU e o SMER28 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (DMSO, Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO, USA).

3.2 – Cultivo celular e tratamentos

As células das linhagens ACP02 e MNP01 foram obtidas do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB, Belém, PA). Todos os materiais de cultura foram comprados da KASVI (Curitiba, PR). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI com baixa concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina em incubadoras umidificadas à 37°C e 5% de CO₂. O quimioterápico 5-FU (IC₅₀ = 1,2 µM) e o indutor autofágico SMER28 (15 µM) foram adicionados um dia após o plaqueamento das células. O DMSO adicionado ao controle não excede 0,5%. Os cinco dias de tratamento *in vitro* simulam o período de um ciclo da quimioterapia contra CG, utilizando 5-FU combinado a outras drogas.

3.3 – Marcação com LA

A marcação com LA faz células inteiras emitirem fluorescência verde (525 nm), exceto em compartimentos ácidos (autofagossomos tardios e lisossomos) que emitem fluorescência vermelha (650 nm). Foram plaqueadas 10⁴ células por poço em placas de 12 poços, seguido do tratamento com 5-FU, SMER28 e 5-FU + SMER28 durante cinco dias. Posteriormente, essas células foram removidas da placa, usando tripsina, transferidas para microtubos e incubadas com LA (1 mg/ml) por 15 minutos à temperatura ambiente. Para quantificação de compartimentos ácidos, as células marcadas com LA foram analisadas por citometria de fluxo (488 nm).

3.4 – Marcação com *Annexin V-FITC*

A indução da apoptose e da necrose foi quantificada pelo *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich, USA). Foram plaqueadas 10^4 células por poço em placas de 12 poços, seguido do tratamento com 5-FU, SMER28 e 5-FU + SMER28 durante cinco dias. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram removidas da placa, usando tripsina, incubadas em solução tampão de ligação contendo IP (100 $\mu\text{g/ml}$), que emite fluorescência vermelha (605 nm) e anexina (50 $\mu\text{g/ml}$), que emite fluorescência verde (520 nm), por 10 minutos à temperatura ambiente e analisadas por citometria de fluxo (488 nm).

3.5 – Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados três vezes independentemente, cada um em triplicata. A intensidade relativa de autofagia foi analisada por uma ANOVA Fatorial 2x4 com blocos, sendo fatores o tipo de célula e o tratamento, seguida por testes de Tukey para comparações múltiplas entre médias. Por outro lado, as porcentagens de células marcadas positivamente para LA, morte celular apoptótica e morte celular necrótica foram analisadas em separado por tipo de célula, usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido por testes de Mann-Whitney com correção de Bonferroni para o valor de P nas comparações entre os tratamentos e o controle. Em todos os testes foi usado nível de significância de 0,05.

4. Resultados

4.1. O SMER28 aumenta a autofagia induzida por 5-FU

Os dados obtidos por meio da marcação com LA mostram que a linhagem MNP01 apresentou maior sensibilidade a indução autofágica via tratamento combinado 5-FU + SMER28 que via tratamento isolado com SMER28 (Figura 2A). Da mesma forma, a linhagem MNP01 apresentou sensibilidade a indução autofágica via tratamento isolado com 5-FU semelhante à submetida ao tratamento combinado 5-FU + SMER28 (Figura 2A). Por outro lado, a linhagem ACP02 é mais sensível a indução autofágica via tratamento combinado 5-FU + SMER28 que via tratamentos isolados com 5-FU ou SMER28 (Figura 2B).

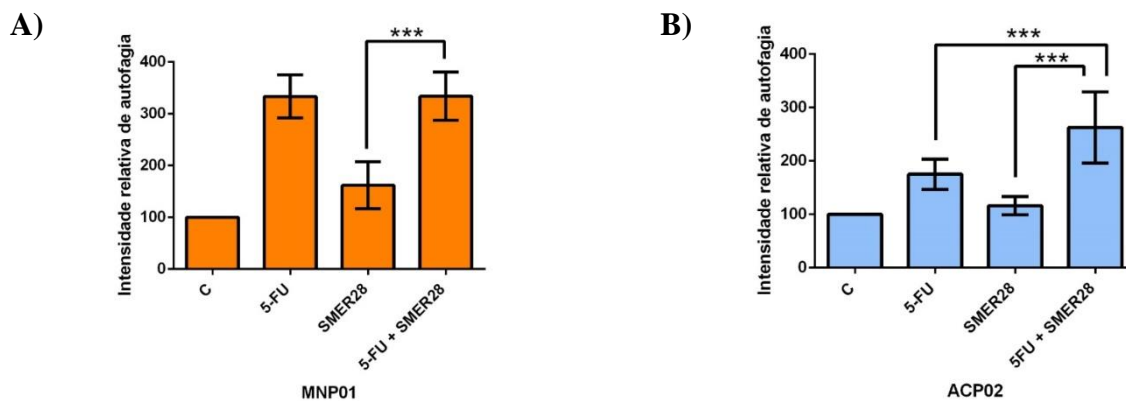


Figura 2 – As células das linhagens MNP01 e ACP02 foram tratadas isoladamente com 5-FU (1,2 μ M), SMER28 (15 μ M) e combinando 5-FU (1,2 μ M) + SMER28 (15 μ M) por 5 dias seguido da quantificação de fluorescência vermelha emitida por LA via citometria de fluxo; $p < 0,001$ em relação A) às células MNP01 tratadas com SMER28 (15 μ M); $p < 0,001$ em relação B) às células ACP02 tratadas com 5-FU (1,2 μ M) e SMER28 (15 μ M).

4.2. O SMER28 não aumenta o número de células autofágicas induzidas pelo 5-FU

Os dados obtidos por meio da marcação com LA mostram que o tratamento combinado 5-FU + SMER28 aumentou representativamente o número de células autofágicas na linhagem MNP01 comparado ao tratamento isolado com SMER28. Porém, esse tratamento combinado 5-FU + SMER28 induziu aproximadamente o mesmo número de células autofágicas que o tratamento isolado com 5-FU em MNP01 (Figura 3A). Da mesma forma, o tratamento combinado 5-FU + SMER28 aumentou representativamente o número de células autofágicas na linhagem ACP02 comparado ao tratamento isolado com SMER28. No entanto,

o tratamento combinado 5-FU + SMER28 induziu aproximadamente o mesmo número de células autofágicas que o tratamento isolado com 5-FU em ACP02 (Figura 3B).

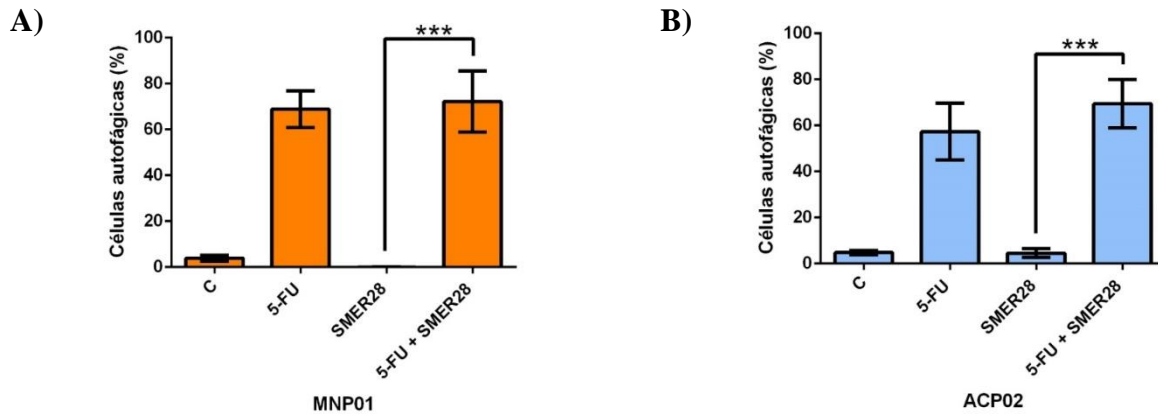


Figura 3 – Células das linhagens MNP01 e ACP02 foram tratadas com 5-FU (1,2 μ M) e SMER28 (15 μ M) por 5 dias seguido da quantificação de células autofágicas via citometria de fluxo; $p < 0,001$ em relação A) às células MNP01 tratadas com SMER28 (15 μ M); $p < 0,001$ em relação B) às células ACP02 tratadas com SMER28 (15 μ M).

4.3. O SMER28 aumenta a apoptose induzida pelo 5-FU na linhagem ACP02

Os dados obtidos por meio da marcação com anexina mostram que o tratamento combinando 5-FU + SMER28 induziu a mesma porcentagem de morte celular apoptótica que o tratamento isolado com 5-FU nas células da linhagem MNP01 (Figura 4A). Contudo, a marcação com anexina mostra também que o tratamento com 5-FU + SMER28 aumentou representativamente a porcentagem de morte celular apoptótica nas células da linhagem ACP02 comparado ao controle (Figura 4B).

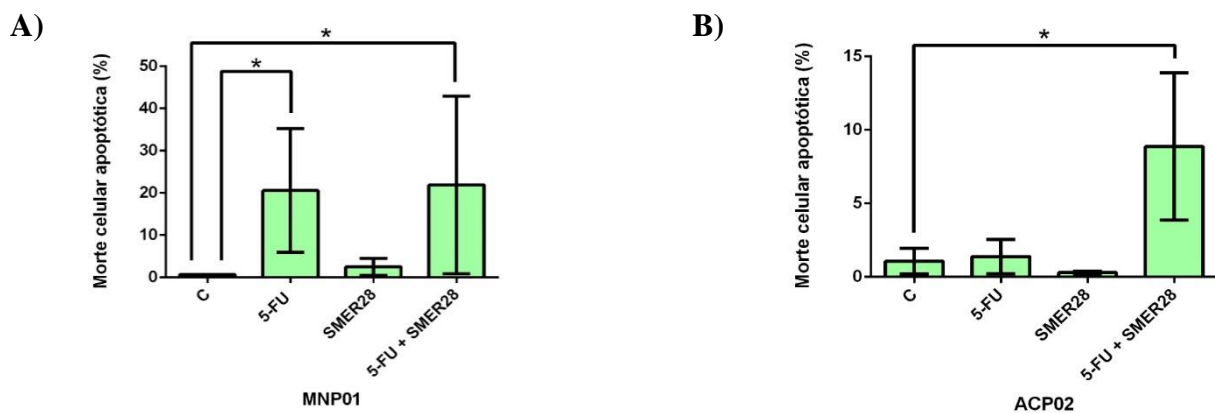


Figura 4 - As células das linhagens MNP01 e ACP02 foram tratadas isoladamente com 5-FU (1,2 μ M), SMER28 (15 μ M) e combinando 5-FU (1,2 μ M) + SMER28 (15 μ M) por 5 dias seguido da avaliação da

marcação com anexina via citometria de fluxo; $p < 0,05$ em relação A) às células MNP01 do controle; $p < 0,05$ em relação B) às células ACP02 do controle. Os valores são médias ± 2 erros padrão de três experimentos independentes.

4.4 O SMER28 não aumenta a necrose induzida pelo 5-FU na linhagem ACP02

Os dados obtidos por meio da marcação com iodeto de propídeo mostram que nenhum dos tratamentos aumenta a porcentagem de morte celular necrótica comparados ao controle nas células da linhagem MNP01 (Figura 5A). Entretanto, a marcação com iodeto de propídeo mostra também que o tratamento com 5-FU + SMER28 aumentou a porcentagem de morte celular necrótica na linhagem ACP02 comparado ao controle (Figura 5B).

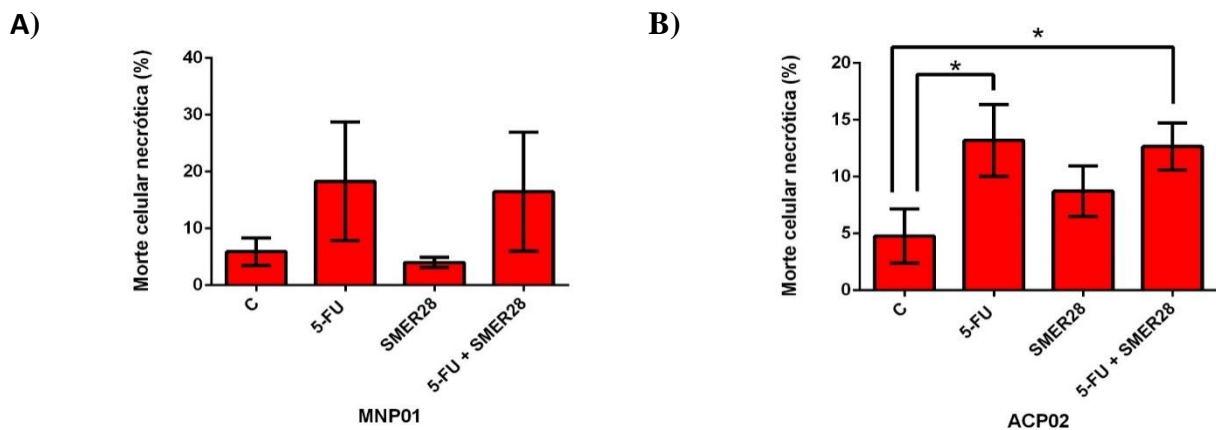


Figura 5 - As células das linhagens MNP01 e ACP02 foram tratadas isoladamente com 5-FU (1,2 μ M), SMER28 (15 μ M) e combinando 5-FU (1,2 μ M) + SMER28 (15 μ M) por 5 dias seguido da avaliação da marcação com iodeto de propídeo via citometria de fluxo; $p < 0,05$ em relação A) às células MNP01 do controle; $p < 0,05$ em relação B) às células ACP02 do controle. Os valores são médias ± 2 erros padrão de três experimentos independentes.

5. Discussão

Neste trabalho, o experimento *in vitro* envolvendo a marcação com LA mostrou que o SMER28, a 15 μM , reforça a autofagia induzida pelo 5-FU, a 1,2 μM , em células da linhagem ACP02 (Figura 2B). A marcação com LA também mostrou que o tratamento combinando SMER28, a 15 μM , e 5-FU, a 1,2 μM , induz a mesma porcentagem de células autofágicas que o tratamento isolado com 5-FU, a 1,2 μM (Figura 3B). De maneira semelhante, a oxaliplatina aumentou a formação de pontos LC3-GFP e a expressão da proteína LC3-II, induzindo autofagia, *in vitro*, em células neoplásicas gástrica (Xu 2011). Porém, o inibidor autofágico cloroquina reduziu a formação de pontos LC3-GFP e a expressão de LC3-II, induzidas pela oxaliplatina (Xu 2011). Analogamente, a cisplatina aumentou a expressão das proteínas Beclina-1 e LC3-II, induzindo autofagia, *in vitro*, em células tumorais gástricas. No entanto, a cloroquina reduziu a expressão de Beclina-1 e LC3-II, induzidas pela cisplatina (Zhang et al. 2013). Nesses casos, a elevação dos níveis autofágicos foi confirmada pelo aumento da expressão de LC3-II, que sugere a acentuação da formação de autofagossomos. Dessa forma, considerando a ascensão dos níveis autofágicos observados neste trabalho, é possível que o SMER28 tenha intensificado a formação de autofagossomos induzida pelo 5-FU nas células da linhagem ACP02.

Embora o SMER28, a 15 μM , não tenha induzido a apoptose, ele reforçou estatisticamente a morte por apoptose induzida pelo 5-FU, a 1,2 μM , *in vitro*, em células da linhagem ACP02 (Figura 4B). De maneira parecida, a oxaliplatina aumentou levemente a expressão das proteínas Caspase 3, Caspase 8 e PARP clivadas, induzindo apoptose, *in vitro*, em células tumorais gástricas. Entretanto, a cloroquina aumentou representativamente a expressão das proteínas Caspase 3, Caspase 8 e PARP clivadas, estimulando a apoptose induzida pela oxaliplatina (Xu 2011). Comparativamente, a cisplatina aumenta pouco a expressão da proteína Caspase 3 clivada e diminui pouco a expressão da proteína Bcl-2, induzindo apoptose, *in vitro*, em células neoplásicas gástricas. Contudo, significativamente, a cloroquina aumenta a expressão da Caspase 3 clivada e diminui a expressão da Bcl-2, favorecendo a apoptose induzida pela cisplatina (Zhang et al. 2013). Neste sentido, considerando que a inibição da autofagia acentua a apoptose induzida pelos quimioterápicos utilizados no tratamento do CG, controversamente, é possível que o reforço autofágico promovido pelo SMER28 também possa intensificar a apoptose induzida pelo 5-FU nas células da linhagem ACP02.

Além disso, o SMER28, a 15 μM , não reforçou a autofagia (Figura 2A) e não acentuou a morte apoptótica (Figura 4A) induzidas pelo 5-FU, a 1,2 μM , *in vitro*, nas células da linhagem MNP01. Tanto na terapia baseada exclusivamente no 5-FU quanto na terapia combinatória, inevitavelmente, a toxicidade farmacológica afeta as células não tumorais da mucosa gástrica (Wöhrer et al. 2004). A combinação do 5-FU com paclitaxel, cisplatina, oxaliplatina, e leucovorin aumentou a sobrevida dos pacientes com CG, porém, agravou os efeitos colaterais atrelados ao tratamento (Kang et al. 2008; Kim 2003). Desse modo, como o SMER28 não fortalece a nocividade natural do 5-FU em células da linhagem MNP01, é possível que essa combinação apresente efeitos colaterais menos severos que a terapia combinando quimioterápicos em pacientes com malignidades gástricas.

Em síntese, este trabalho mostrou que o SMER28 potencializa o efeito antitumoral do 5-FU ao reforçar a morte por apoptose em células tumorais gástricas. Estes resultados, preliminarmente, demonstraram o potencial do SMER28 como agente terapêutico. Os próximos experimentos focarão no refinamento dos dados obtidos através da avaliação da expressão de proteínas relacionadas com autofagia e apoptose.

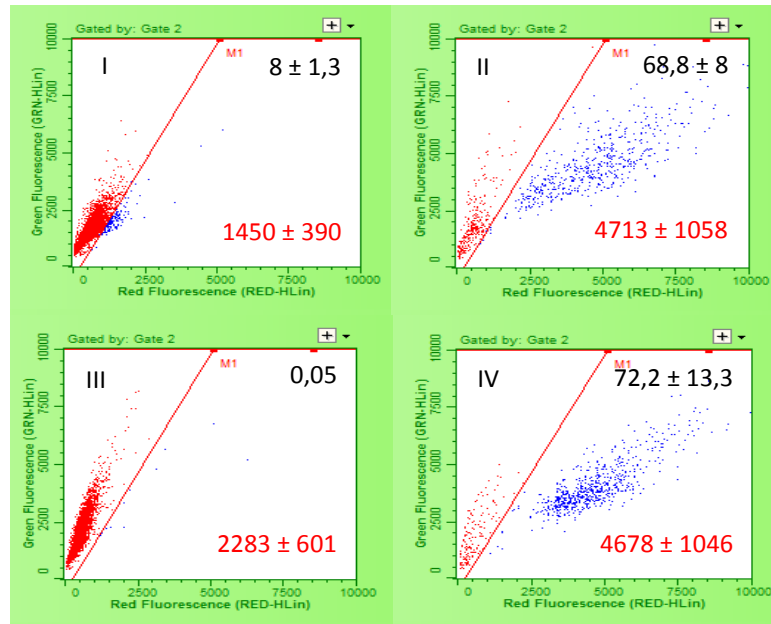
6. Perspectivas

Como principais perspectivas desse trabalho temos:

1. Repetir a avaliação da morte apoptótica e necrótica induzidas pelo tratamento isolado com o 5-FU e pelo tratamento combinando o 5-FU e SMER28, nas células das linhagens MNP01 e ACP02, através da marcação com anexina e iodeto de propídio;
2. Avaliar a autofagia induzida pelo tratamento isolado com o 5-FU e pelo tratamento combinando o 5-FU e SMER28 nas células das linhagens MNP01 e ACP02, a partir da expressão de LC3-II e p62;
3. Avaliar a apoptose induzida pelo tratamento isolado com o 5-FU e pelo tratamento combinando o 5-FU e SMER28 nas células das linhagens MNP01 e ACP02, com base na expressão de Caspase 3 clivada e Bcl-2.

7. Figuras suplementares:

A)



B)

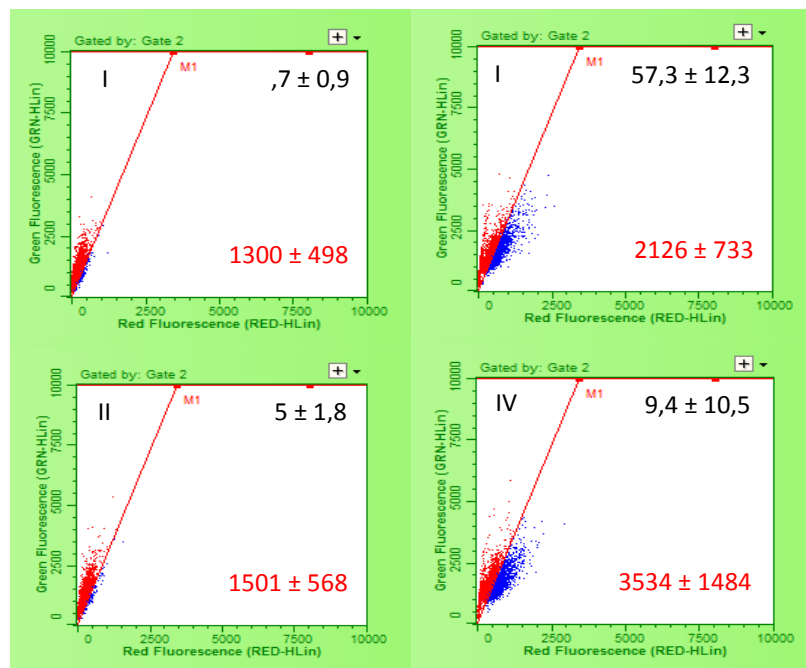
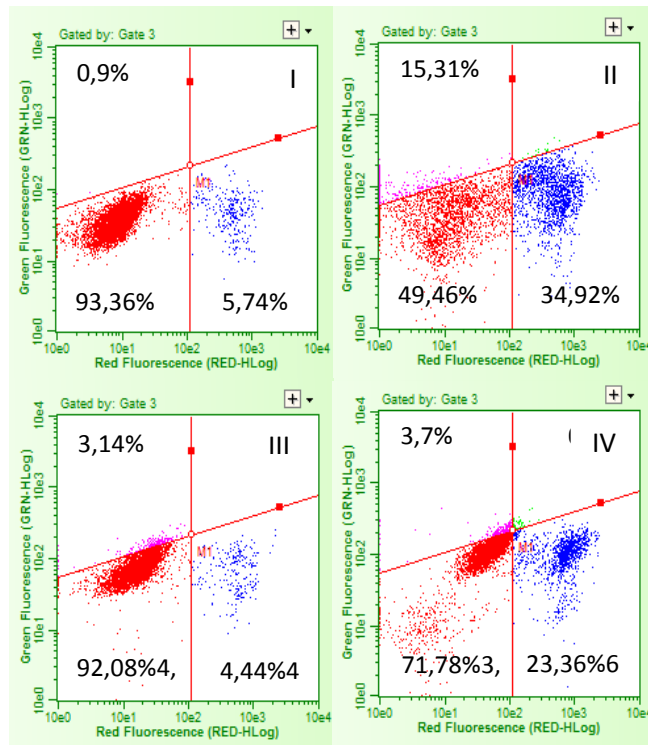


Figura suplementar 1 - Amostragem das citometrias mostrando as médias da porcentagem de células A) MNP01 e B) ACP02 positivamente marcadas com laranja de acridina (LA) (preto) \pm 2 erros padrão (2EP) e da intensidade de fluorescência vermelha oriunda da marcação com LA (vermelho) \pm 2EP de três experimentos independentes; Tratamentos: I (Controle), II (5-FU), III (SMER28) e IV (5-FU+SMER28).

A)



B)

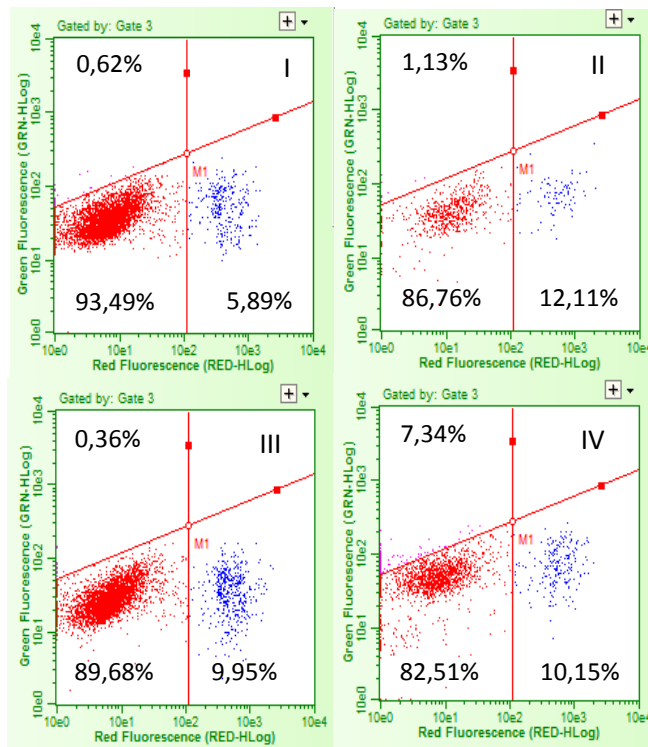


Figura suplementar 2 - Amostragem das citometrias mostrando a porcentagem de células A) MNP01 e B) ACP02 marcadas positivamente com anexina (quadrante superior esquerdo), anexina e iodeto de propídio (quadrante superior direito), iodeto de propídio (quadrante inferior direito) e não marcadas (quadrante inferior esquerdo). Tratamentos: I (Controle), II (5-FU), III (SMER28) e IV (5-FU+SMER28).

8. Referências

- De Angelis, P.M. et al., 2006. Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Molecular cancer*, 5, p.20.
- Barry, J., 1984. Saturday 16. , 1(June).
- Bejarano, E. et al., 2014. Connexins modulate autophagosome biogenesis. *Nature cell ...*, 16(5), pp.401–414.
- Burger, K. et al., 2010. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *The Journal of biological chemistry*, 285(16), pp.12416–25.
- Chen, J. et al., 2013. A sensitive and quantitative autolysosome probe for detecting autophagic activity in live and prestained fixed cells. , 9(6), pp.894–904.
- Chen, R. et al., 2014. The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *The Journal of cell biology*, 206(2), pp.173–82.
- Choi, K., 2012. Autophagy and cancer. *Experimental & molecular medicine*, 44(2), pp.109–120.
- Correa, P. & Miller, M.S., 1995. Helicobacter pylori and Gastric. , 87(23), pp.1731–1732.
- Costa, P.B. et al., 2004. Câncer gástrico em idosos Gastric cancer in the elderly. , 50(3), pp.211–217.
- Ding, W. & Yin, X., 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. , 393(7), pp.547–564.
- Durães, C. et al., 2014. Biomarkers for gastric cancer: prognostic, predictive or targets of therapy? *Virchows Archiv : an international journal of pathology*.
- Ertmer, a et al., 2007. The anticancer drug imatinib induces cellular autophagy. *Leukemia*, 6, pp.936–942.
- Eskelinen, E.-L., 2011. The dual role of autophagy in cancer. *Current opinion in pharmacology*, 11(4), pp.294–300.

- Facina, T., 2014. Estimativa 2014–Incidência de Câncer no Brasil. , 60(1), pp.63–64.
- Frankel, L.B. & Lund, A.H., 2012. MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis*, 33(11), pp.2018–25.
- Gaddy, J. a et al., 2013. High dietary salt intake exacerbates Helicobacter pylori-induced gastric carcinogenesis. *Infection and immunity*, 81(6), pp.2258–67.
- Gitto, S. & Altomare, D., 2015. Recent insights into the pathophysiology of mTOR pathway dysregulation. *Research & Reports in Biology*, pp.1–16.
- Graziano, F., 2003. The role of the E-cadherin gene (CDH1) in diffuse gastric cancer susceptibility: from the laboratory to clinical practice. *Annals of Oncology*, 14(12), pp.1705–1713.
- Han, M.A. et al., 2013. Association of smoking history with cancer recurrence and survival in stage III-IV male gastric cancer patients. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 22(10), pp.1805–12.
- Hundeshagen, P. et al., 2011. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. *BMC biology*, 9(1), p.38.
- James, L. et al., 2014. [Adjuvant chemoradiotherapy in gastric adenocarcinoma: about 34 cases and review of the literature]. *The Pan African medical journal*, 19, p.70.
- Kang, G., Kim, G. & Lee, H., 2008. A phase II trial of paclitaxel, 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin in patients with metastatic or recurrent gastric cancer. *Cancer research and ...*, 40(3), pp.106–110.
- Kim, D.Y., 2003. Phase II study of oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin in previously platinum-treated patients with advanced gastric cancer. *Annals of Oncology*, 14(3), pp.383–387.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M. & Rubinsztein, D.C., 2010. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS letters*, 584(7), pp.1393–8.
- Lacerda, M., 2001. Chemotherapy and anesthesia. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, pp.250–270.

- Lapaquette, P. & Guzzo, J., 2015. Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2015.
- Lee, H. et al., 2014. Celastrol inhibits gastric cancer growth by induction of apoptosis and autophagy. *Biochemistry and Molecular Biology*, 47(12), pp.697–702.
- Levine, B., 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), pp.27–42.
- Li, W., Li, J. & Bao, J., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69(7), pp.1125–36.
- Liu, J. et al., 2011. β -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. *BMC cancer*, 11(1), p.183.
- Liu, K. & Czaja, M.J., 2013. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy. *Cell death and differentiation*, 20(1), pp.3–11.
- Majeski, A.E. & Dice, J.F., 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), pp.2435–44.
- Malet-Martino, 2002. Oncologist Clinical Studies of Three Oral Prodrugs of 5-Fluorouracil. , pp.288–323.
- Mayr, M. et al., 2012. Phase I study of imatinib, cisplatin and 5-fluoruracil or capecitabine in advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. *BMC cancer*, 12, p.587.
- Mijaljica, D. & Devenish, R.J., 2013. Nucleophagy at a glance. *Journal of Cell Science*, 126(19), pp.4325–4330.
- Mizushima, N., 2007. Autophagy : process and function. *Genes & Development*, pp.2861–2873.
- Mizushima, N. et al., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069–1075.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp.107–32.

- Niedźwiedzka-Rystwej, P., Tokarz-Deptuła, B. & Deptuła, W., 2013. Autophagy in physiological and pathological processes – selected aspects. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(1), pp.173–180.
- Noda, T., Fujita, N. & Yoshimori, T., 2009. The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell death and differentiation*, 16(7), pp.984–90.
- Patru, C.L. et al., 2013. PREVENTIVE MEDICINE - LABORATORY. , 117(1), pp.199–204.
- Rosen, a et al., 2011. Severe encephalopathy, lactic acidosis, vegetative instability and neuropathy with 5-Fluorouracil treatment - pyrimidine degradation defect or beriberi? *Case reports in oncology*, 4(2), pp.371–6.
- Sakai, Y. et al., 2006. Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(12), pp.1767–75.
- Sarkar, S. et al., 2009. Europe PMC Funders Group Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington ' s disease models. , 3(6), pp.331–338.
- SenGupta, T. et al., 2013. Base excision repair AP endonucleases and mismatch repair act together to induce checkpoint-mediated autophagy. *Nature communications*, 4(May), p.2674.
- Shvets, E. & Elazar, Z., 2014. Autophagy-independent incorporation of GFP-LC3 into protein aggregates is dependent on its interaction with p62/SQSTM1. *Autophagy*, 4(8), pp.1054–1056.
- Souza, F.D.O. et al., 2011. Review Article Palliative treatment of gastric adenocarcinoma. , 24(1), pp.74–80.
- Svaasand, E.K. et al., 2011. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA , but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic acids research*, 39(19), pp.8430–8444.
- Takei, N. & Nawa, H., 2014. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Frontiers in molecular neuroscience*, 7(April), p.28.
- Tian, Y. et al., 2011. A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB*

- journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(6), pp.1934–42.
- Vessoni, a T. et al., 2013. Autophagy and genomic integrity. *Cell death and differentiation*, 20(11), pp.1444–54.
- Wild, P., McEwan, D.G. & Dikic, I., 2014. The LC3 interactome at a glance. *Journal of cell science*, 127(Pt 1), pp.3–9.
- Wöhrer, S.S., Raderer, M. & Hejna, M., 2004. Palliative chemotherapy for advanced gastric cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 15(11), pp.1585–95.
- Xu, D. et al., 2015. MINI-REVIEW Autophagy in Tumorigenesis and Cancer Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, pp.2167–2175.
- Xu, L., 2011. Protective autophagy antagonizes oxaliplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. *Chinese journal of ...*, pp.490–496.
- Yang, X. et al., 2015. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. *Cell & Bioscience*, 5(1), p.14.
- Yang, Z. & Klionsky, D.J., 2014. Permeases Recycle Amino Acids Resulting from Autophagy. *Autophagy*, 3(2), pp.149–150.
- Yi, H. et al., 2012. Effect of 5-FU and MTX on the expression of drug-resistance related cancer stem cell markers in non-small cell lung cancer cells. *The Korean Journal ...*, 16, pp.11–16.
- Zarzynska, J.M., 2014. The importance of autophagy regulation in breast cancer development and treatment. *BioMed research international*, 2014, p.710345.
- Zhang, H. et al., 2013. Autophagy inhibition sensitizes Cisplatin cytotoxicity in human gastric cancer cell line sgc7901. *Asian Pacific Journal ...*, 14, pp.4685–4688.