

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia
Grupo de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Avaliação da Resposta de Células de Adenocarcinoma Ductal
Pancreático PANC-1 à Gemcitabina em Perfil de Tratamento
Semelhante ao Protocolo Clínico: Foco no Papel da Autofagia

RONIZE ZENI DA SILVA

Orientadora: Dr^a Patricia Luciana da Costa Lopez
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Porto Alegre, 2019.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Grupo de Pesquisa em Biologia Celular e Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Avaliação da Resposta de Células de Adenocarcinoma Ductal
Pancreático PANC-1 à Gemcitabina em Perfil de Tratamento
Semelhante ao Protocolo Clínico: Foco no Papel da Autofagia

Dissertação de mestrado apresentada
no Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia da Faculdade de Medicina
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul em Julho de 2019, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Ciências em Gastroenterologia e
Hepatologia.

RONIZE ZENI DA SILVA

Orientadora: Dr^a Patricia Luciana da Costa Lopez
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela

Porto Alegre, 2019.

CIP - Catalogação na Publicação

Zeni da Silva, Ronize
Avaliação da Resposta de Células de Adenocarcinoma Ductal Pancreático PANC-1 à Gemcitabina em Perfil de Tratamento Semelhante ao Protocolo Clínico: Foco no Papel da Autofagia / Ronize Zeni da Silva. -- 2019. 47 f.
Orientadora: Patricia Luciana da Costa Lopez.

Coorientadora: Eduardo Cremonese Filippi Chiela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Adenocarcinoma Ductal Pancreático. 2. Gemcitabina. 3. Autofagia. 4. Resistência. 5. Longo Prazo. I. Luciana da Costa Lopez, Patricia, orient. II. Cremonese Filippi Chiela, Eduardo, coorient. III. Título.

Dedicatória

“Escolhi o branco, porque quero transmitir a paz.

Escolhi estar presente na dor, porque já estive muito perto do sofrimento.

Escolhi servir ao próximo, porque sei que todos nós um dia precisaremos de ajuda.

Escolhi me dedicar a saúde, porque respeito a vida.”

Adaptado de Florence Nightingale

Agradecimentos

À Deus, por tudo.

Aos professores e orientadores Patricia Luciana da Costa Lopez e Eduardo Cremonese Filippi Chiela, dos quais tive a honra de conhecer e conviver, agradeço pela orientação, aprendizado e paciência. Obrigado pela compreensão em momentos difíceis.

Aos colegas do laboratório que também participaram da execução do projeto: Lia, Solon, Stéfano, Mariana, Paula e Vivi. Agradeço pelas incontáveis vezes que vocês me auxiliaram.

A professora Rúbia, que gentilmente abriu espaço para que eu pudesse realizar o estágio docência.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.

Agradeço aos grandes amigos que a vida me deu dentro e fora da biomedicina e que foram fundamentais durante esses anos de mestrado: Gaby, minha irmã de coração que está sempre presente, que me incentiva, acredita em mim e nunca me deixa desistir de nenhum propósito; Igor que foi fundamental no início e durante grande parte desse processo; Cleandra que esteve comigo bem no início dessa caminhada e muito me incentivou; Natan que perto ou distante nunca mediu esforços para me ouvir e me auxiliar; Juliana, Guilherme e Morgane, presentes que a graduação me deu, gratidão pela amizade desde o início, obrigada por estarem sempre próximos e dispostos a me ajudar; Vanessa, Tamara e Babi, amigas que se preocupam e ficam felizes comigo. Gratidão imensa pela amizade, carinho, preocupação e apoio de todos vocês.

Agradeço a toda minha família que está sempre comigo, que acreditam em mim e apoiam todas minhas escolhas. Vocês são incríveis.

Ao meu tio Nereu, que durante toda minha vida me orientou da melhor forma possível, que sempre quando eu me desviava do foco, me trazia de volta de forma gentil e que carinhosamente sempre me fez entender o lado bom de todas as coisas e pessoas, me incentivando sempre a dar o melhor de mim. Á você tio, minha eterna gratidão.

Por fim, ao meu pai Gelson (que infelizmente não esta mais aqui no final desta caminhada, agradeço em oração) e a minha mãe Elaine, sem vocês nada seria possível ou teria sentido, obrigada por sempre estarem comigo, obrigada pelo zelo, amor, paciência, cuidado, carinho, pela vida e pelos princípios. Gratidão e amor à vocês!

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Adenocarcinoma Ductal Pancreático.....	14
1.2. Células PANC-1 como Modelo de Estudo do ADP.....	15
1.3. Características Tumorais, Prognóstico e Terapia do ADP.....	16
1.4. Gemcitabina como Alternativa Terapêutica em ADP.....	16
1.5. Autofagia.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. QUESTÃO DE PESQUISA.....	24
4. HIPÓTESE.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1. OBJETIVO GERAL.....	26
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	265
6 MATERIAIS E METODOS.....	276
6.1. Desenho Experimental.....	27
6.2. Cultura De Células.....	28
6.3. Avaliação Da Morfometria Celular.....	28
6.4. Marcação Com Laranja De Acridina.....	28
6.5. Marcação Com Iodeto De Propídeo (IP).....	29
6.6. Ensaio Clonogênico.....	29
6.7. Análise Estatística.....	29
7. RESULTADOS.....	29
7.1. Gemcitabina Induz Alterações Morfológicas Agudas e a Longo Prazo em Células de ADP.....	29
7.2. GEM Reduz o Número de Células com Fenótipo Viável a Longo Prazo.....	32
7.3. GEM Reduz a Clonogenicidade de Células PANC-1.....	33
7.4. GEM Aumenta Marcadores Celulares de Autofagia a Longo Prazo.....	33
7.5. Autofagia Parece Ser Citoprotetora na Resposta à GEM.....	35

8. DISCUSSÃO	36
9. CONCLUSÃO.....	40
10. FIGURAS SUPLEMENTARES.....	40
11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	42
12. PERSPECTIVAS	42
13. REFERÊNCIAS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenocarcinoma Ductal Pancreático

ATG – *Autophagy-related Genes*

ATCC – *American Type Culture Collection*

AO – *Acridine Orange*

CDA – Citidina Deominase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

FSC – *Forward Scatter*

GEM – Gemcitabina

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IP – Iodeto de Propídeo

MLD – Meio Livre de Droga

OMS – Organização Mundial da Saúde

SSC – *Side Scatter*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas do processo de autofagia.

Figura 2 – Desenho experimental.

Figura 3 – Morfologia das células PANC-1 tratadas com GEM após 48h e a longo prazo.

Figura 4 – Viabilidade do fenótipo de células PANC-1 tratadas com GEM ao longo do tempo.

Figura 5 – Ensaio clonogênico para células PANC-1 tratadas com GEM.

Figura 6 – Porcentagem de células positivas para AO na linhagem celular PANC-1 tratada com GEM.

Figura 7 – Relação entre intensidade de marcação com AO e o desfecho de células PANC-1 em resposta à GEM.

Figura 8 – Esquema representativo dos mecanismos celulares envolvidos na resposta de células PANC-1 à gemcitabina.

Figura Suplementar 1 - Porcentagem de marcação com Iodeto de Propídeo após tratamento das células PANC-1 com GEM.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Predisposição hereditária em ADP.

Tabela 2 – Perfil molecular de oncogenes e genes supressores tumorais na linhagem PANC-1.

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta de uma **Introdução** com revisão bibliográfica dos principais tópicos abordados, que incluem o desfecho de interesse (Adenocarcinoma Ductal Pancreático, ADP), características do quimioterápico utilizado (Gemcitabina, GEM) e conceitos importantes acerca de mecanismos de proliferação celular e autofagia. Após serão descritas as **Justificativas**, as **Hipóteses**, os **Objetivos** (gerais e específicos), os **Materiais e Métodos** utilizados, os **Resultados** encontrados. Finalmente, é apresentada uma **Discussão** seguida da **Conclusão**, **Perspectivas** e **Referências** utilizadas.

RESUMO

O câncer de pâncreas é a terceira causa de morte por câncer nos Estados Unidos e a sétima no Brasil. Menos de 10% dos pacientes sobrevivem 2 anos livres de doença. Dentre os diversos subtipos o mais comum é o Adenocarcinoma Ductal de Pâncreas (ADP). Apesar dos avanços observados na terapia antitumoral nas últimas décadas, quimioterápicos clássicos como a gemcitabina (GEM) continuam sendo uma alternativa primária para terapia do ADP. Porém, a resistência e recorrência tumorais são frequentes, e são escassos os trabalhos que avaliam a resposta das células de ADP à GEM a longo prazo. Sendo assim, nós utilizamos um racional experimental de tratamento agudo (48h) seguido do crescimento das células tumorais em Meio Livre de Droga por 10 dias (período de recuperação), para mimetizar o período de recuperação dos pacientes. A partir deste modelo nós avaliamos o efeito da GEM na viabilidade fenotípica celular, na clonogenicidade das células tumorais e nos níveis de marcadores de autofagia tanto após o tratamento agudo (48h) quanto após 5 e 10 dias do tratamento. Por fim, avaliamos a relação entre níveis de autofagia e sobrevivência celular durante o período de recuperação. Nós observamos que o tratamento com GEM 10 e 30 μM por 48h causou uma redução do número de células com fenótipo viável a longo prazo. Para o tratamento com a dose GEM 1 μM observamos redução desta população celular 5 dias após o tratamento, porém esta redução não se acentuou 10 dias após o tratamento. O tratamento com GEM também reduziu a clonogenicidade das células e aumentou indicadores de autofagia a longo prazo (medido pela marcação com laranja de acridina e complexidade intracelular, ambos por citometria de fluxo). Finalmente, observamos que células com fenótipo viável após 5 e 10 dias apresentaram níveis mais intensos de marcação com laranja de acridina, sugerindo que a autofagia atue favorecendo a sobrevivência das células de ADP em resposta à GEM. Concluimos, assim, que as células de ADP ativam autofagia possivelmente como mecanismo de citoproteção à GEM, e que o desenho experimental utilizado possui características que podem mimetizar, ao menos parcialmente, o comportamento de recorrência tumoral observado clinicamente. A modulação racional da autofagia induzida por este quimioterápico poderia, assim, sensibilizar as células de ADP resistentes à GEM.

Palavras-chave: Adenocarcinoma Ductal Pancreático, Gemcitabina, Autofagia, Resistência, Longo Prazo.

ABSTRACT

Pancreatic cancer is the third leading cause of cancer death in the United States and the seventh in Brazil. Less than 10% of patients survive 2 years free of disease. Among the various subtypes of pancreatic cancer, the most common is Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (ADP). Despite the advances observed in antitumor therapy in the last decades, classic chemotherapeutics such as gemcitabine (GEM) remain a primary alternative for ADP therapy. However, tumor resistance and recurrence are frequent, and there are few studies evaluating ADP cell response to GEM in the long term. Thus, we used an experimental rationale for acute treatment (48h) followed by the growth of tumor cells in a drug-free medium for 10 days (recovery period) to mimic the recovery period of the patients. From this model we evaluated the effect of GEM on cell phenotypic viability, tumor cell clonogenicity and autophagy markers levels both after acute treatment (48h) and after 5 and 10 days of treatment. Finally, we evaluated the relationship between levels of autophagy and cell survival during the recovery period. We observed that treatment with GEM for 48 h resulted in a reduction in the number of cells with a viable phenotype in the long term, especially at doses of 10 and 30 μM . For treatment with 1 μM GEM, we observed a reduction of this cell population 5d after treatment, but this reduction did not accentuate 10d after treatment. GEM treatment also reduced cell clonogenicity and increased long-term autophagy indicators (measured by acridine orange labeling and intracellular complexity, both assessed by flow cytometry). Finally, we observed that cells with a viable phenotype after 5d and 10d showed increased acridine orange staining in comparison to apoptotic cells, suggesting that autophagy contributes to cell survival. In the present study, we concluded that the experimental design used has characteristics that approximate the behavior of tumor recurrence clinically observed and that the cells of ADP activate autophagy possibly as a mechanism of cytoprotection to GEM. Rational modulation of autophagy induced by this chemotherapeutic could thus sensitize GEM-resistant ADP cells.

Keywords: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Gemcitabine, Autophagy, Long Term.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Adenocarcinoma Ductal Pancreático (ADP)

Em 2017 a OMS relatou que o câncer é responsável por uma em cada seis mortes no mundo (<https://nacoesunidas.org/oms/2018>). O ranqueamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA) informa que os tumores mais frequentes no Brasil são de próstata, mama, colón e reto, pulmão e estômago. Embora o câncer de pâncreas ocupe a 13ª posição e não esteja entre os tipos tumorais mais frequentes, o diagnóstico geralmente ocorre em fase avançada ou metastática da doença, culminando com um dos piores prognósticos entre os cânceres humanos (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018>). No Brasil, o câncer de pâncreas é responsável por 2% de todos os tipos de câncer e 4% do total de mortes (INCA).

Dentre os diversos subtipos de câncer de pâncreas o mais comum é o Adenocarcinoma Ductal de Pâncreas (ou apenas Adenocarcinoma de Pâncreas, ADP). O ADP se origina principalmente nas células ductais do componente glandular exócrino do pâncreas, e é responsável por aproximadamente 95% de todos os cânceres pancreáticos. Aproximadamente 80% dos pacientes acometidos por ADP possuem entre 60 e 80 anos e a incidência do mesmo é aproximadamente 50% maior em homens do que em mulheres (INCA). A frequência é maior em pacientes de origem africana e outros fatores de risco são tabagismo, pancreatite crônica, cirrose, obesidade, sedentarismo, dieta rica em gordura e colesterol, diabetes *mellitus* e exposição a agentes carcinógenos. Algumas síndromes hereditárias familiares também estão relacionadas ao ADP, tais como pancreatite hereditária, câncer colorretal não polipoide hereditário, câncer de mama e ovário hereditários, melanoma múltiplo atípico familiar e ataxia-telangectasia (www.grupocoi.com.br/cancer-de-pancreas) (Tabela 1).

Tabela 1 - Predisposição hereditária em ADP. São descritos o distúrbio causado, o gene mutado, o aumento do risco de ADP quantificado em vezes. Adaptada de Robbins & Cotran, 3ªEd.

Distúrbio	Gene	Aumento do Risco de ADP (em vezes)
Síndrome de Peutz-Jeghers	STK11	130
Pancreatite Hereditária	PRSS1, SPINK1	50-80
Síndrome do melanoma múltiplo atípico familiar	CDKN2A	20-35
Histórico familiar (3 ou mais familiares com ADP)	Desconhecido	14-32
Câncer de Mama e de ovário hereditário	Múltiplos, incluindo BRCA1, BRCA2	4-10
Câncer colorretal hereditário	Múltiplos, incluindo MH1, MSH2	8-10

1.2. Células PANC-1 como Modelo de Estudo do ADP

Entre as linhagens celulares de ADP estudadas, PANC-1 representa o modelo mais bem caracterizado. A linhagem PANC-1 apresenta mutação nos genes supressores tumorais TP53 e CDKN2A/p16, e nos oncogenes KRAS e BRAF, alterações diretamente ligadas à malignidade do ADP (Tate e col, 2019). TP53 é um gene conhecido por ser supressor de tumor que dirige as células que sofrem dano ao DNA para parada no ciclo celular e/ou morte celular, estando mutada em 50% dos cânceres humanos (Yang e col, 2011). KRAS na sua forma original desempenha papel importante na sinalização de proliferação celular a partir de receptores tirosina-cinase. Em funcionamento normal esta proteína tem capacidade de auto-inativação, característica que é perdida quando ocorre mutação oncogênica (New M. e col, 2017).

CDK2A/P16 codifica duas proteínas que estão ligadas a supressão de tumor e regulação do ciclo celular em condições de danos intracelulares, especialmente ao DNA (Filippi-Chiela e col, 2015).

1.3. Características Tumorais, Prognóstico e Terapia do ADP

O pâncreas é uma glândula mista do sistema digestivo, atuando tanto como glândula endócrina quanto exócrina. Anatomicamente, o pâncreas é composto por três regiões principais: cabeça, que está em contato com o duodeno, o corpo e a cauda. Como função endócrina, exercida pelas Ilhotas de Langerhans, o pâncreas é responsável pela produção de hormônios envolvidos no controle da glicemia e outras características metabólicas. Entre estes hormônios destacam-se insulina e glucagon (Kierzbaum e col, 2016). Considerando a função exócrina, o pâncreas é responsável pela síntese e excreção de precursores de enzimas digestivas a partir de ácinos serosos. Estas células produzem enzimas que fracionam as proteínas, açúcares e gorduras para permitir a absorção dos nutrientes no intestino delgado.

O ADP é originado principalmente nas células que compõem os ductos pancreáticos por onde o suco pancreático é conduzido até ser secretado no duodeno. Origina-se, portanto, na porção exócrina que constitui de 80 à 85% do órgão (Wray e col, 2005). Geralmente a doença permanece silenciosa até que ocorra a invasão de estruturas adjacentes, apresentando assim diagnóstico geralmente tardio e alta taxa de mortalidade. Em grande parte dos casos, a dor é o primeiro sintoma, mas geralmente quando o paciente apresenta este quadro a doença já está em estágio avançado (Katz col 2009).

1.4. Gemcitabina como Alternativa Terapêutica em ADP

Cerca de 80 a 85% dos pacientes apresentam ADP não ressecáveis cirurgicamente e/ou metástases que contraindicam a ressecção (Neuzillet e col, 2011; Vincent e col, 2011). Nestes casos, a quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante é indicada. A gemcitabina (GEM) é um dos quimioterápicos clássicos para o tratamento de ADP, porém a taxa de resposta em 5 anos é baixa permanecendo em torno de 5 a

7%, com sobrevivência de um ano inferior a 20% dos casos (Zhou e col, 2018; Adamska e col, 2018).

A quimioterapia para ADP pode ser administrada em combinações de dois ou mais medicamentos. Entre os quimioterápicos clássicos mais utilizados estão a GEM, docetaxol, cisplatina e capecitabina, sendo estes 3 últimos normalmente utilizados em combinação com GEM. Mais recentemente, o erlotinib (inibidor de EGFR), temsirolimus (inibidor da cinase mTOR) e bevacizumab (anticorpo monoclonal anti-VEGF) foram aprovados para terapia do ADP. Entretanto o custo/benefício de quimioterápicos clássicos continua sendo maior (Hajatdoost e col, 2018).

A GEM é um análogo de nucleosídeo que inibe a enzima timidilato sintase, suprimindo a produção de timidina nas células. Além disso, a GEM pode ser incorporada no DNA em lugar da citosina durante a replicação do DNA. Todas estas alterações acabam bloqueando a replicação do material genético e impedindo a proliferação celular (Cavalcante e col, 2014; Plunkett e col, 1995). Devido à natureza hidrofílica, este fármaco não atravessa diretamente na membrana plasmática por difusão, sendo transportado para o meio intracelular por transportadores de nucleosídeos na membrana. Quando GEM atinge a célula tumoral, a molécula sofre uma fosforilação inicial pela desoxicitidinaquinase (dCK) e, em menor grau, pelo sistema extramitocondrial timidina quinase 2, seguida de uma série de etapas de fosforilação, a fim de serem incorporadas em ambos DNA e RNA como sua forma ativa fosforilada, GEM trifosfato. A depuração de GEM é principalmente dirigida por inativação rápida pela enzima hepática citidina deaminase (CDA) em seu metabolito 2, 2 – difluoro-deoxiuridina. O perfil tóxico de GEM é considerado leve quando comparada com outras drogas citotóxicas (Ciccolini e col 2016).

Considerando os mecanismos celulares disparados pela GEM em células de ADP, em baixas concentrações GEM induz parada no ciclo celular na fase S devido ao retardo na replicação do DNA. Em concentrações mais altas, por outro lado, GEM induz parada em todas as fases do ciclo celular seguido de apoptose (Yumna e col, 2013). Finalmente, Song e col., observaram um aumento em marcadores de senescência celular após 48h de tratamento com GEM (Song e col, 2016); entretanto, os autores não avaliaram o comportamento das células tratadas com GEM a longo prazo, aspecto importante em estudos de farmacologia celular envolvendo senescência.

Apesar de as células de ADP se mostrarem sensíveis à GEM, são muito frequentes os casos de resistência e recorrência tumorais. Essa resistência pode resultar de alterações no metabolismo do fármaco, redução da incorporação no DNA

ou, ainda, do abrandamento da apoptose ou da parada no ciclo celular induzida pela GEM devido à mutações genéticas ou alterações epigenéticas em moduladores da via da apoptose e de pontos de checagem no ciclo celular (Binenbaum e col, 2015). De fato, entre as vias de sinalização mais frequentemente alteradas no ADP estão, conforme citado acima, controladores centrais da apoptose e pontos de checagem no ciclo celular, tais como p53, CDKN2A e KRAS.

Entretanto, apesar do conhecimento molecular do ADP são escassos os trabalhos na literatura que descrevam possíveis mecanismos celulares envolvidos na resistência do ADP à GEM, tanto considerando análises agudas quanto crônicas. Na última década tem ganho força o papel do mecanismo de autofagia na resistência tumoral à quimioterápicos clássicos em diferentes tipos tumorais (Galluzzi e col, 2015). Este aspecto, entretanto, é pouco conhecido considerando a resposta de células de ADP à GEM, especialmente considerando a resposta a longo prazo.

1.5. Autofagia

Autofagia é um processo pelo qual ocorre a degradação e a reciclagem dos componentes intracelulares como mitocôndrias, organelas e complexos proteicos danificados na célula através da via lisossomal (Mizushima e col, 2008). De acordo com Boya e col. autofagia é um mecanismo fisiológico citoprotetor, que contribui para manutenção da qualidade dos componentes celulares (Boya e col 2013). De fato, a autofagia atua como um mecanismo quimiopreventivo, de modo que o desligamento da autofagia, por mecanismos ainda pouco esclarecidos, pode alterar a homeostase celular e, assim, favorecer a iniciação do processo carcinogênico. Em tumores em desenvolvimento, por outro lado, a autofagia atua promovendo o crescimento e estabelecimento tumoral através do provimento de substratos energéticos às células tumorais expostas ao estresse metabólico típico do microambiente tumoral (Galluzzi e col, 2015).

O processo de autofagia (Figura 1) inicia com o recrutamento e destacamento de pequenas porções do retículo endoplasmático. Estas vesículas membranosas são chamadas de fagofóro, primeira estrutura do processo autofágico. O fagofóro então alonga-se em torno do conteúdo celular a ser autofagocitado, até o fechamento em uma organela de dupla membrana chamada autofagossomo. O autofagossomo, por sua vez, entrega seu conteúdo para os lisossomos, formando o autolisossomo. Neste, as

enzimas hidrolíticas lisossomais atuam degradando proteínas, lípidos, açúcares e ácidos nucleicos, gerando produtos que são transportados do autolisossomo para o citoplasma celular por proteínas permeases presentes na membrana do mesmo. Assim, a célula recicla seus componentes celulares e utiliza os produtos de degradação de acordo com a demanda celular prioritária. Em células normais presentes em um ambiente celular saudável estes produtos são utilizados para reconstrução de novos componentes celulares degradados. Por outro lado, em células expostas a um ambiente de estresse metabólico (como as células de tumores sólidos em que a vascularização ainda é insuficiente), estes produtos são utilizados principalmente para transformação em substratos energéticos, permitindo assim a sobrevivência celular até que ocorra o aporte de nutrientes pela via exógena (Boya e col, Mizushima e col, 2008).

As etapas iniciais da autofagia são controladas pelas proteínas codificadas por genes *ATG* (*Autophagy-related Genes*). Estas proteínas atuam diretamente sobre as estruturas celulares envolvidas na iniciação do processo, atuando desde o recrutamento do fagóforo (a partir de uma porção do Retículo Endoplasmático Rugoso) até o alongamento da membrana e fechamento do autofagossomo. Estas proteínas também estão envolvidas no carregamento de componentes para dentro do autofagossomo. Neste processo participam também proteínas adaptadoras como a proteína p62 (Sequestosome-1 ou SQSTM1), que marca componentes que devem ser degradados pelo autofagossomo. A p62 interage com uma proteína Atg presente na membrana do autofagossomo em formação, a proteína Atg8 (ou LC3), permitindo o carregamento específico de componentes para dentro do autofagossomo. A proteína LC3 é também a responsável pelo fechamento do autofagossomo, processo que encerra a chamada etapa inicial da autofagia. A etapa tardia, subsequente, envolve a fusão do autofagossomo com o lisossomo formando o autolisossomo, a qual não envolve proteínas Atg, mas sim outras proteínas de fusão presentes na membrana tanto do autofagossomo quanto do lisossomo (**Figura 1**) (Heand e col, 2009; Kimmelman e col, 2011).

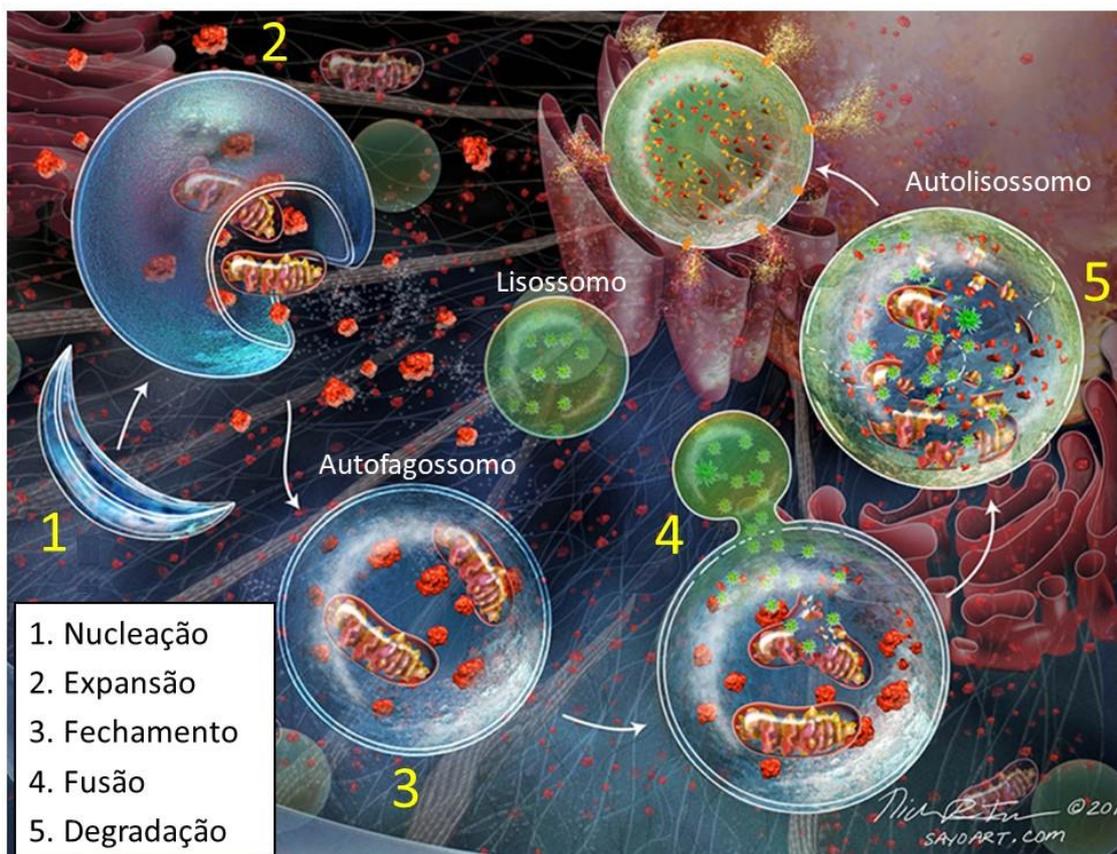


Figura 1 – Etapas do processo de autofagia. A autofagia inicia-se com a formação do fagoforo a partir da membrana do retículo endoplasmático (Etapa 1 - Iniciação). O fagoforo alonga-se envolvendo componentes celulares a serem degradados (Etapa 2 – Alongamento). O fechamento do fagoforo origina o autofagossomo (Etapa 3 – Fechamento), que funde-se com lisossomos (Etapa 4 – Fusão), formando o autofagolisossomo, onde hidrolases ácidas lisossomais atuam degradando os componentes celulares englobados (Etapa 5 – Degradação). Finalmente, os produtos da degradação são devolvidos ao citoplasma celular por meio de permeases presentes na membrana do autolisossomo, sendo utilizados para a síntese de novos componentes celulares funcionais (modificado de *Nicolle Fuller, SciencePhoto Library*).

Considerando o papel da autofagia no câncer é importante entender a diferença desta função entre etapa inicial da carcinogênese (quando ocorre a transformação da celular normal em uma célula pré tumoral) e a etapa de progressão tumoral conforme revisado por Galuzzi e col (2015). A autofagia é um mecanismo central na manutenção da homeostase das células normais, contribuindo para a manutenção metabólica, genômica, e eliminação de componentes celulares potencialmente oncogênicos, incluindo proteínas e organelas alteradas. Assim a perda da autofagia favoreceria a transformação celular. Porém, nas células transformadas a reativação do processos de autofagia de conferir as células tumorais a capacidade de se adaptar ao estresse do microambiente tumoral, Nesse contexto, a autofagia exerce papel

protumoral por permitir a sobrevivência e progressão tumorais, bem como a resistência à quimioterapia.

Shenghong e col, sugerem que a inibição da autofagia em modelo celular e modelo animal leva à regressão tumoral de câncer pancreático. Estes resultados sugerem que a autofagia é necessária para o crescimento de cânceres pancreáticos, de modo que compostos que inativam esse processo poderiam ser úteis no tratamento destes tumores (*Shenghong e col*, 2011). Este aspecto foi posteriormente reforçado por *New M. e col*, sugerindo que a autofagia atua como mecanismo que mantém as células pancreáticas normais em estado homeostático, e que a perda deste mecanismo desbalança as células energética e estruturalmente favorecendo a carcinogênese. Por outro lado, os autores sugerem que nas células pancreáticas cancerígenas a reativação da autofagia favoreceria o crescimento e sobrevivência das células de ADP (*New M. e col*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A autofagia atua como mecanismo de resistência à terapia em inúmeros tipos tumorais (Galluzzi e col, 2015). Após praticamente uma década de evidências em modelos pré-clínicos, em 2017 o grupo do prof. Andrew Thorburn demonstrou pela primeira vez clinicamente que a inibição da autofagia pode reduzir a resistência tumoral e melhorar o prognóstico de pacientes acometidos por glioblastoma tratados com inibidores de BRAF (Levy e col, 2017). Mais recentemente, efeito semelhante foi observado exatamente em ADP. Em um paciente acometido por ADP metastático, múltiplas tentativas de combinações de quimioterápicos foram tentadas como terapias neoadjuvantes (pré-cirúrgicas, com o objetivo de reduzir o tumor e permitir a ressecção cirúrgica), incluindo Gemcitabina + Capecitabina e Gemcitabina + Abraxane + Cisplatina. Mesmo com estes tratamentos, o ADP seguiu aumentando de volume. Após estas múltiplas tentativas, o paciente foi tratado com um inibidor da via da Ras-Raf-MEK-Erk, seguido do tratamento com um inibidor de autofagia. Finalmente, através da modulação da autofagia o tumor regrediu bruscamente e se manteve estável pelos 6 meses seguintes avaliados (Kinsey e col, 2019).

Se, por um lado, diversos avanços terapêuticos têm sido observados nas últimas décadas para os mais incidentes e agressivos tipos tumorais, por outro lado para o ADP pouco ou nenhum avanço ocorreu. Neste sentido, quimioterápicos clássicos como a GEM continuam sendo utilizados como alternativas de primeira escolha na clínica oncológica. Apesar disso, são escassos os estudos que investigaram os mecanismos celulares envolvidos na resposta e resistência de células de ADP à GEM. Entender esta resposta a partir de desenhos experimentais que se assemelhem ao protocolo clínico (considerando doses e tempos de tratamento e recuperação) pode fornecer informações clinicamente relevantes para co-tratamentos de GEM com moduladores de mecanismos celulares.

Entre os mecanismos que emergiram nos últimos anos como estando envolvidos na resistência do ADP está a autofagia (New M. e col, 2017; Yang e col, 2018). Estas evidências culminaram, recentemente, com a demonstração de que a modulação racional da autofagia aumenta a sensibilidade de células de ADP à inibidores da via RAF/MEK/ERK clinicamente (Kinsey e col, 2019), conforme citado acima.

Entretanto, o papel da autofagia na resposta à GEM, especialmente considerando esta resposta a longo prazo, não é conhecido. Neste contexto, é importante destacar que o planejamento adequado do desenho experimental *in vitro* é

fundamental para nos permitir acessar nosso objetivo. De fato, nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos in vitro de longo prazo, em desenhos experimentais que mimetizam o tratamento clínico. Para o ADP, os pacientes são tratados com GEM por 2 dias, seguido de um período de recuperação para o paciente de 15 dias até o início da próxima seção. Entender o que ocorre com as células tumorais durante este período de recuperação do paciente é um aspecto historicamente negligenciado pela literatura, apesar da importância translacional.

Nosso grupo já observou um aumento transitório da autofagia em células de glioblastoma, carcinoma de mama e adenocarcinoma coloretal durante o período pós-tratamento com quimioterápicos de diferentes classes, como temozolomida, doxorubicina, 5-fluoruracila e oxaliplatina (Filippi-Chiela e col, 2015; Baldasso-Zanon e col, em preparação). Entender o papel da autofagia nas células de ADP em resposta à GEM tanto a curto prazo (após as 48h do tratamento) quanto cronicamente (no período pós-tratamento) pode embasar a modulação racional deste mecanismo com o objetivo de sensibilizar as células de ADP ao quimioterápico.

3. QUESTÃO DE PESQUISA

Qual a cinética dos mecanismos de proliferação, morte e adaptação celular (especialmente autofagia) envolvidos na resposta de células de Adenocarcinoma Ductal Pancreático à Gemcitabina em desenho experimental semelhante ao protocolo clínico?

4. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que células de ADP aumentam os níveis de autofagia em resposta a GEM, especialmente ao longo do período de recuperação após a retirada do tratamento, e que esta autofagia atua protegendo as células tumorais da toxicidade exercida pela GEM.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar mecanismos de proliferação, morte e adaptação celular em células da linhagem de Adenocarcinoma de Pâncreas PANC-1 expostas ao tratamento com gemcitabina em desenho experimental semelhante ao protocolo de tratamento clínico.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando o protocolo de 48h de tratamento com o quimioterápico, seguido de 10 dias de recuperação para as células, objetivamos:

- i. Avaliar o efeito da GEM na viabilidade e morfologia celular;
- ii. Avaliar o efeito da GEM na clonogenicidade das células tumorais;
- iii. Avaliar os níveis de marcadores de autofagia no período de tratamento e durante a recuperação pós-tratamento das células;
- iv. Inferir a relação entre níveis de autofagia e sobrevivência celular a longo prazo.

6. MATERIAIS E METODOS

6.1. Desenho Experimental

O desenho experimental foi planejado baseado no protocolo de tratamento clínico, conforme mostrado na **Figura 2**. Três dias após o plaqueamento, as células foram tratadas com GEM nas doses de 1 μM , 10 μM e 30 μM . Estas doses foram baseadas na concentração plasmática máxima atingida pela GEM, que varia de aproximadamente 500 nM a 24 μM (Khare e col, 2016). A região indicada em vermelho na linha do tempo indica o período em que as células ficaram em contato com a GEM, por 24h ou 48h. Após, a droga foi retirada e as células replaqueadas e crescidas em Meio de cultura completo Livre de Droga (MLD).

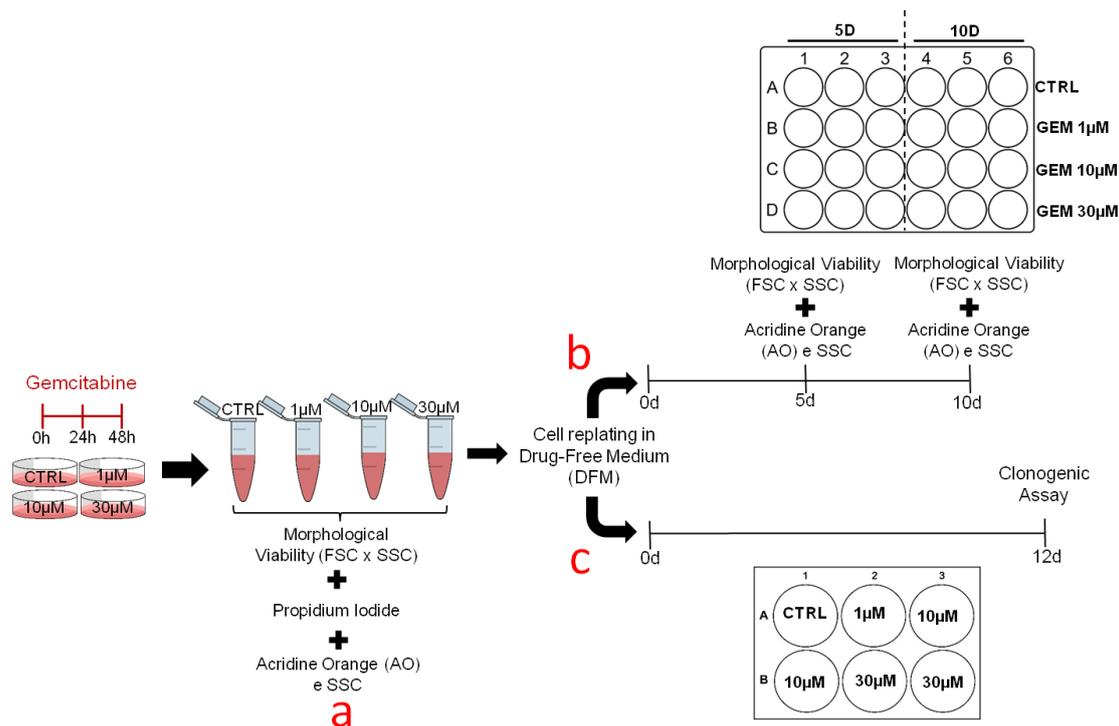


Figura 2 – Desenho experimental. As células PANC-1 foram tratadas com GEM por 48h nas doses de 1 μM , 10 μM e 30 μM . **(a)** Após as 48h, a morfologia, a permeabilização da membrana plasmática e a intensidade de marcação com Laranja de Acridina (AO) foram avaliadas através de citometria de fluxo. As células foram também fotografadas para avaliação fenotípica. Considerando as análises de longo prazo, **(b)** uma alíquota de células tratadas em cada condição foi lavada com PBS 1x e replaqueadas em Meio Livre de Droga (MLD). Após 5d e 10d em MLD as células foram avaliadas para a viabilidade morfológica (FSC e SSC) e marcação com AO. **(c)** Finalmente, também após as 48h de tratamento as células tratadas em todas as condições foram replaqueadas para ensaio clonogênico e crescidas por 12 dias.

6.2. Cultura De Células

Nós utilizamos a linhagem de câncer de pâncreas humano PANC-1 oriunda do Banco de Células do Rio de Janeiro e gentilmente cedida pela Prof^a Dra Patrícia Ashton-Prolla. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ com atmosfera umidificada, em meio DMEM Low Glucose e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. O perfil de mutações nos principais oncogenes e genes supressores tumorais das células PANC-1 é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Perfil molecular de oncogenes e genes supressores tumorais na linhagem PANC-1 (Tate e col, 2019).

<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>SMAD4/DPC4</i>	<i>CDKN2A/p16</i>	<i>BRAF</i>	<i>APC</i>	<i>PTEN</i>
<i>mut</i>	<i>mut</i>	<i>wt</i>	<i>mut</i>	<i>mut</i>	<i>wt</i>	<i>wt</i>

wt – *wild type*; *mut* – mutado.

6.3. Avaliação Da Morfometria Celular

A morfometria celular foi avaliada tanto através de aquisição de imagens por microscopia óptica quanto por citometria de fluxo. Para tal, as células controle e tratadas com GEM foram fotografadas utilizando um microscópio Zeiss Axiovision. Para avaliação da morfometria celular e complexidade intracelular as células foram lidas em citômetro de fluxo e os parâmetros de *Forward Scatter* (FSC) e *Side Scatter* (SSC) foram lidos tanto após 24h e 48h do tratamento quanto 5 dias e 15 dias após o tratamento.

6.4. Marcação Com Laranja De Acridina

As células foram marcadas com laranja de acridina (*Acridine Orange* – AO) para análise de organelas vacuolares ácidas características da autofagia (Thomé e col, 2016). O AO cora toda a célula (núcleo e citoplasma) em verde e, quando difunde para organelas vacuolares ácidas como os autolisossomos, é protonado e fica retido nestas

organelas, passando a emitir fluorescência vermelha. As células foram tripsinizadas e, uma vez em suspensão, foram incubadas com 1,6 μM de AO em meio de cultura DMEM por 15min, em temperatura ambiente no escuro. Após, as células foram analisadas por citometria de fluxo (Attune Acoustic Focusing Cytometer Applied Biosystem).

6.5. Avaliação de Viabilidade Celular por Iodeto de Propídeo

As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspendidas em solução contendo 3 μM de **Iodeto de Propídeo (IP)** em PBS 1x por 15min à temperatura ambiente no escuro, para avaliação da viabilidade da membrana plasmática. Após a marcação, as células foram analisadas por citometria de fluxo (Attune Acoustic Focusing Cytometer Applied Biosystem).

6.6. Ensaio Clonogênico

Foram plaqueadas 100 células por poço em placa de 6 poços e replaqueadas após 48h do tratamento com GEM. Após 15 dias as células foram fixadas com paraformaldeído gelado, e coradas com cristal violeta 0,4%. As placas foram fotografadas e quantificadas quanto ao número de colônias.

6.7. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa PASW18.0. Foram realizados Anova seguido de pós-teste de SNK para comparação direta entre 2 grupos. Valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

7. RESULTADOS

7.1. Gemcitabina Induz Alterações Morfológicas Agudas e a Longo Prazo em Células de ADP.

Inicialmente nós avaliamos a morfologia das células PANC-1 tratadas com GEM tanto por microscopia quanto por citometria de fluxo. Nós observamos um aumento do tamanho celular após tratamento com GEM 1 μM , 10 μM ou 30 μM por 48h (**Figura 3A**). Este aumento do tamanho, entretanto, não alterou a viabilidade da membrana plasmática, sinal típico de necrose celular, conforme mostrado pela ausência de marcação com IP (**Figura Suplementar 1**). Além disso, observamos a presença de vacúolos intracelulares (**Figura 3A – setas pretas**).

Para analisar objetivamente as alterações fenotípicas observadas através da microscopia as células foram analisadas em citômetro de fluxo. Após 48h, nós observamos um aumento no *Forward Scatter (FSC)*, parâmetro utilizado como medida de tamanho celular (**Figura 3**). Para avaliar o efeito da GEM a longo prazo nas células PANC-1, após o tratamento por 48h as células foram replaqueadas em MLD (ver Figura 2). Após 5 e 10 dias a morfologia celular foi avaliada por citometria de fluxo. Através desta estratégia nós observamos uma redução do FSC (tamanho celular) típica do processo de apoptose já em 5 dias (**Figura 3B – área azul**), acompanhada pelo aumento do *debrise* celular (**Figura 3B – área vermelha**). Em paralelo, observamos uma redução do número de células com fenótipo celular saudável ao longo dos dias, especialmente para as doses de 10 e 30 μM (**Figura 3B – área pontilhada**).

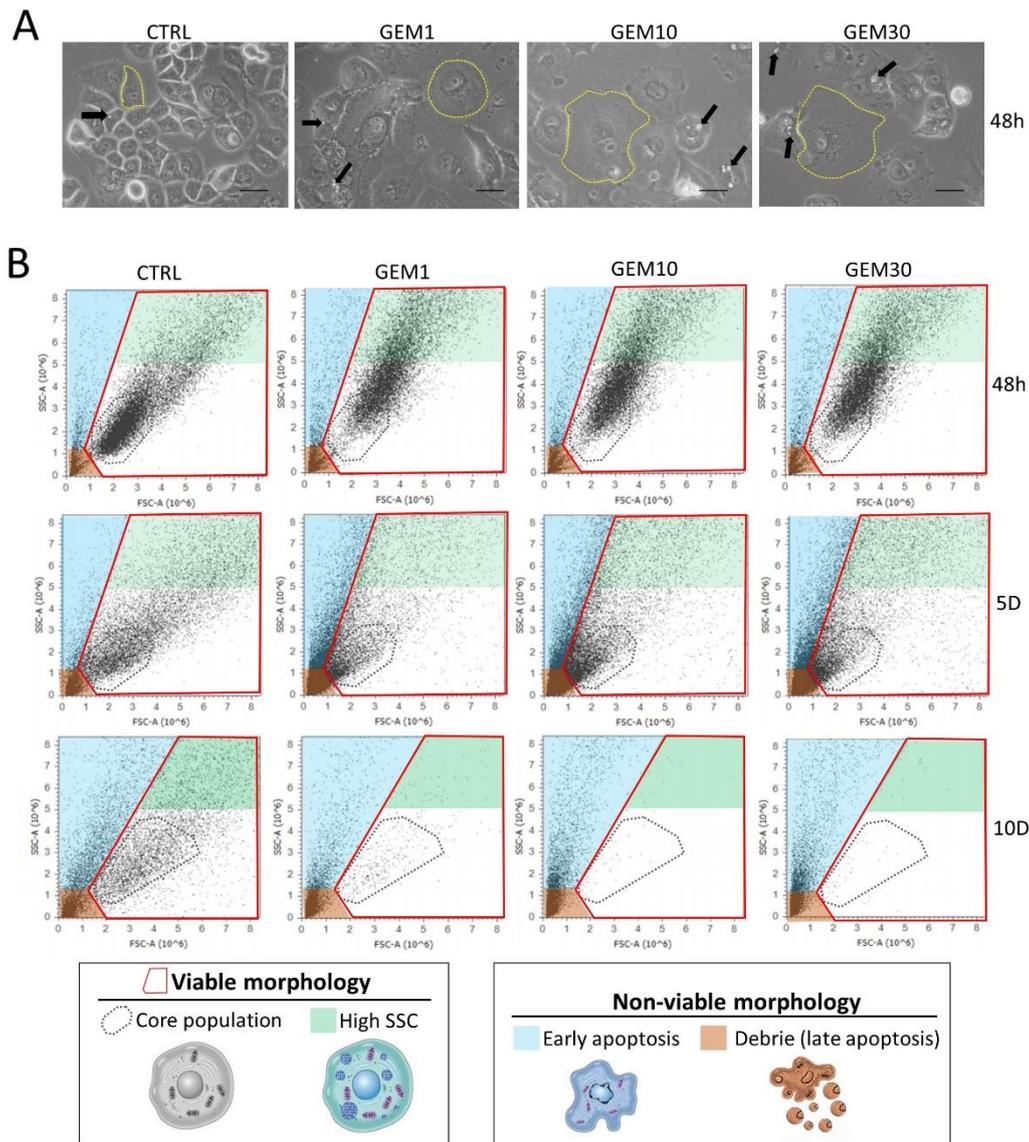


FIGURA 3 - Morfologia das células PANC-1 tratadas com GEM após 48h e a longo prazo
(A) Imagens representativas da morfologia de células PANC-1 após 48h do tratamento com GEM. Escala: 20 μ m. CTRL – controle; GEM1 – Gemcitabina 1 μ M; GEM10 – Gemcitabina 10 μ M; GEM30 – Gemcitabina 30 μ M. **(B)** Tamanho (FSC – eixo x) e complexidade intracelular (SSC – eixo y) de células PANC-1 avaliados por citometria de fluxo. Os gráficos representam, na primeira linha, a análise após as 48h de tratamento; na segunda e na terceira linha de gráficos são mostrados os resultados após 5 dias (5D) e 10 dias (10D) do replaqueamento em Meio Livre de Droga (MLD). Nos gráficos, a população celular demarcada em vermelho representa células com viabilidade normal (não-apoptótica). A região demarcada com linha pontilhada representa a subpopulação principal de células do controle. Entre as regiões coloridas, a região verde representa a subpopulação de células com aumento da complexidade intracelular (células High SSC), enquanto a região azul representa a subpopulação celular com fenótipo de apoptose inicial (redução do tamanho celular representado pelo FSC e aumento da complexidade intracelular representada pelo SSC). Finalmente, a região laranja representa o *debris* celular resultante da apoptose tardia (corpos apoptóticos).

7.2. GEM Reduz o Número de Células com Fenótipo Viável a Longo Prazo

A porcentagem de células apresentando fenótipo viável foi avaliada com base no gráfico de FSC x SSC por citometria de fluxo. Conforme mostrado na **Figura 4**, durante as 48h em que o quimioterápico esteve em contato com as células, não houve perda de viabilidade celular. Após 5 dias da retirada da GEM, observamos que todos os tratamentos reduziram a viabilidade para aproximadamente 50%. Após 10 dias, entretanto, as células tratadas com GEM1 mantiveram a viabilidade em torno de 50%, enquanto GEM10 e GEM30 reduziram a viabilidade celular para aproximadamente 10% (**Figura 4**).

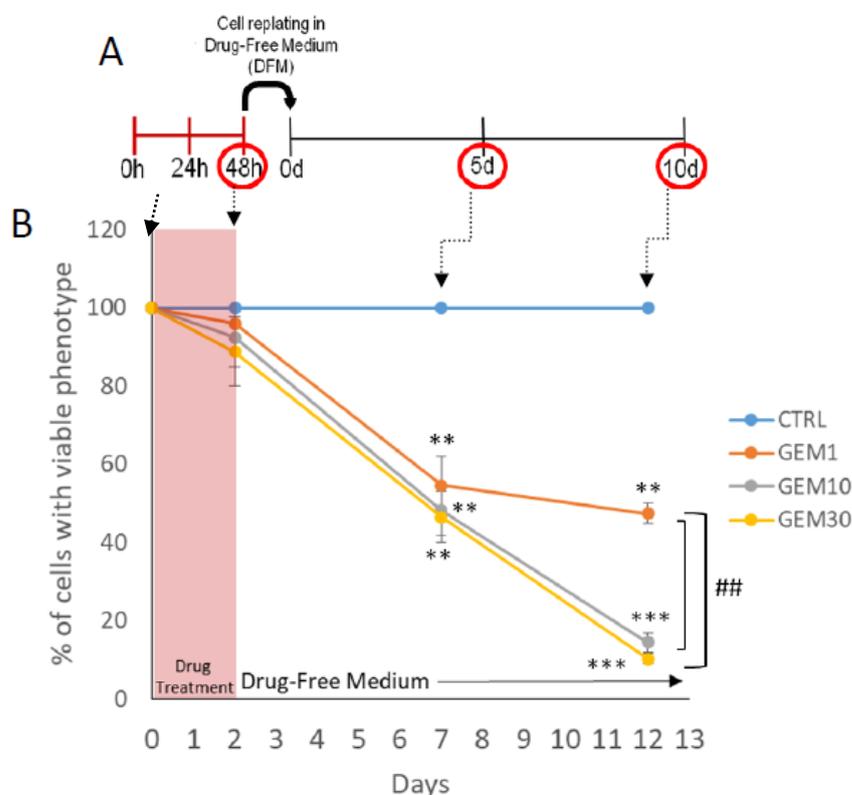


Figura 4 - Viabilidade do fenótipo de células PANC-1 tratadas com GEM ao longo do tempo. (A) Desenho Experimental. (B) Células viáveis foram consideradas aquelas contidas na região delimitada em vermelho na Figura 3. No gráfico, é mostrada a porcentagem de células com morfologia viável ao longo dos dias.

7.3. GEM Reduz a Clonogenicidade de Células PANC-1

A partir dos dados da viabilidade morfológica, nós então realizamos ensaio clonogênico replaqueando 100 células por poço em placa de 6 poços após as 48h de tratamento (**Figura 5A – esquerda**). Após 10 dias, nós observamos a formação de múltiplas colônias controle, enquanto todos os tratamentos reduziram a clonogenicidade das células PANC-1, havendo a formação de apenas 1 colônia para o tratamento com GEM 10 μ M. (**Figura 5A - direita**). É importante notar que entre as colônias do controle há uma ampla heterogeneidade de forma, tamanho e densidade das colônias, sugerindo heterogeneidade intratumoral (**Figura 5B**).

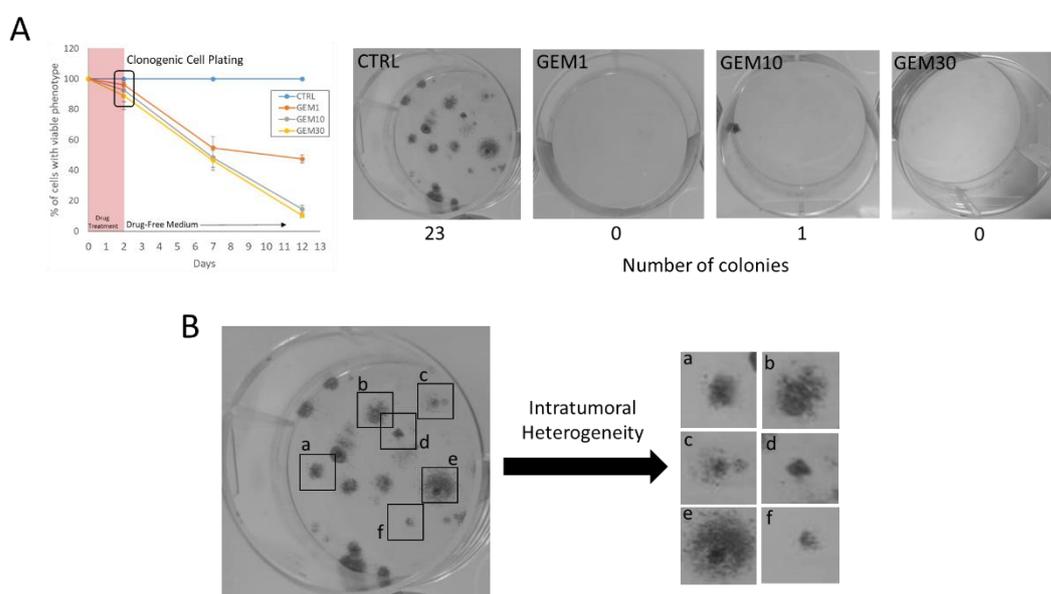


FIGURA 5 - Ensaio clonogênico para células PANC-1 tratadas com GEM. (A) À esquerda é mostrado o gráfico de viabilidade morfológica apontando o momento da curva experimental em que as células foram replaqueadas para ensaio clonogênico. À direita são mostradas imagens representativas dos poços após 12 dias de crescimento. Abaixo das imagens é mostrado o número de colônias observado em cada condição. (B) Representação da heterogeneidade de forma, tamanho e densidade de colônias no controle.

7.4. GEM Aumenta Marcadores Celulares de Autofagia a Longo Prazo

Conforme mostrado na Figura 3, nós observamos um aumento na porcentagem de células com aumento da complexidade intracelular (SSC) a longo prazo (**Figura 3B – região verde**). Entre os mecanismos que causam esta alteração fenotípica destaca-se a autofagia. Dessa forma, nós realizamos ensaio de marcação com Laranja de

Acridina (AO) para quantificação de organelas vacuolares ácidas, entre as quais destacam-se os autolisossomos (Thomé MP e col.).

O marcador AO cora toda a célula (citoplasma e núcleo) com fluorescência verde, e acumula-se em ambientes ácidos passando a emitir fluorescência vermelha (**Figura 6A**). A intensidade de AO foi medida em citômetro de fluxo 48h após o tratamento e 5 e 10 dias após a retirada da GEM. Nós observamos que após as 48h de tratamento, GEM induziu aumento da porcentagem de células positivas para AO em níveis semelhantes entre as doses testadas. Após 5 dias, observamos um aumento da porcentagem de células AO-positivas em comparação com as 48h, sendo este aumento semelhante para todas as doses testadas. Finalmente, após 10 dias, nós observamos níveis inversamente proporcionais entre a dose de GEM e a porcentagem de células positivas para AO (**Figura 6B**).

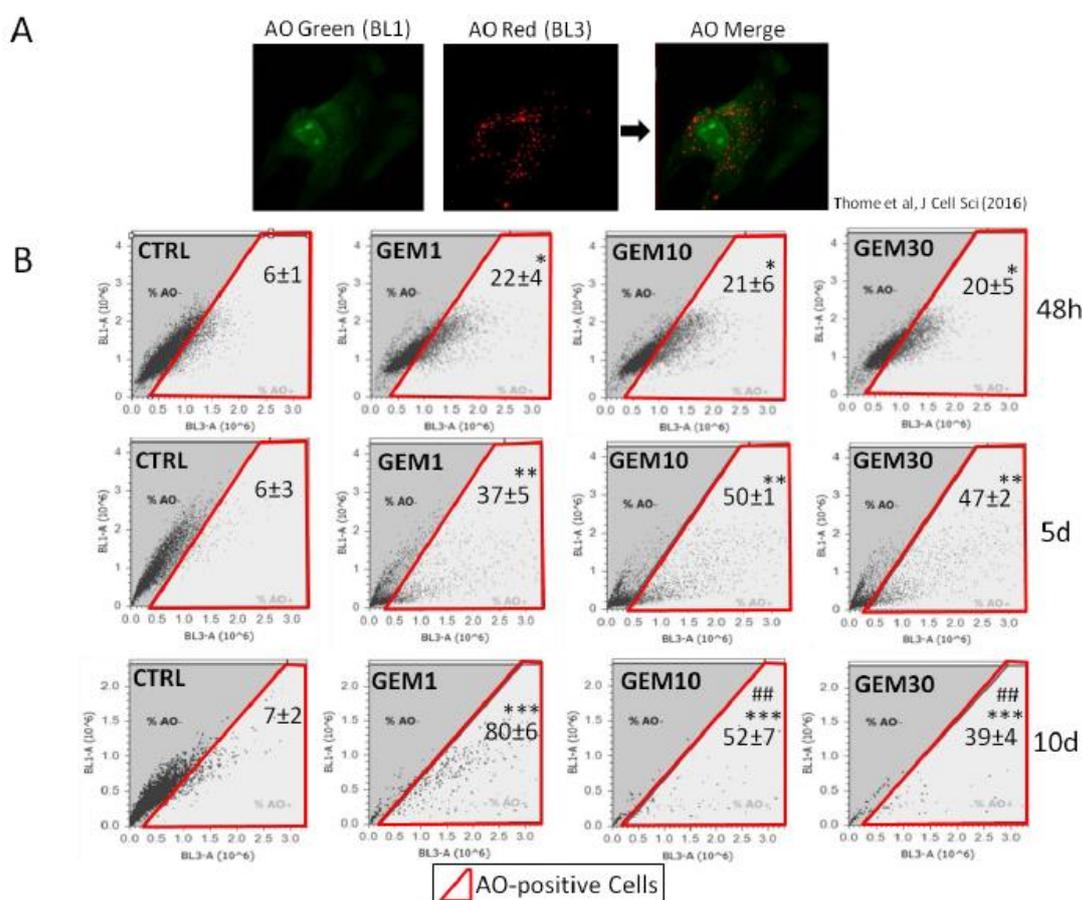


FIGURA 6 - Porcentagem de células positivas para AO na linhagem celular PANC-1 tratada com GEM. (A) Imagem representativa da marcação com AO (Ref.: Thomé e col, 2016). (B) Citometria de fluxo para AO após 48h de tratamento com GEM e 5d e 10d após a retirada da droga e do crescimento das células em Meio Livre de Droga.

7.5. Autofagia Parece Ser Citoprotetora na Resposta à GEM

Finalmente, nós avaliamos a intensidade de marcação com AO em células com fenótipo viável em comparação com células com fenótipo de apoptose inicial após 5 e 10 dias. Nós observamos que células com fenótipo viável apresentaram níveis maiores de marcação com AO do que células com fenótipo de apoptose inicial para todas as doses testadas após 5 e 10 dias de tratamento (**Figura 7**).

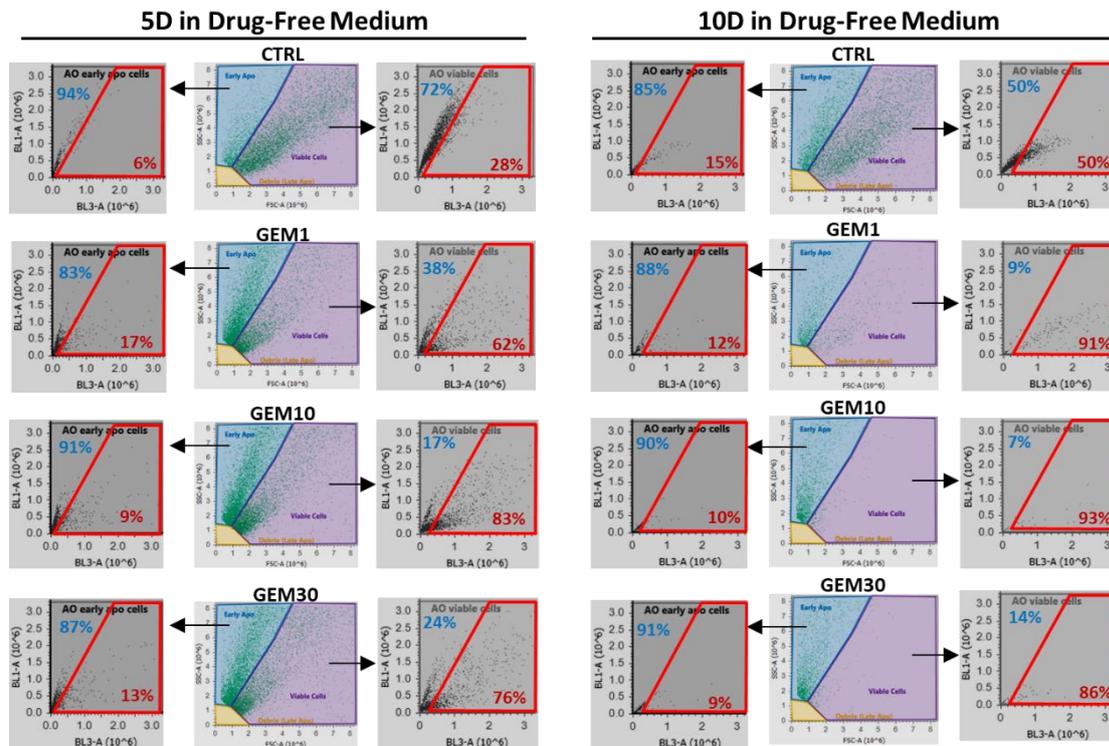


FIGURA 7 - Relação entre intensidade (ou níveis) de AO e o desfecho de células PANC-1 em resposta à GEM. A citometria de fluxo para AO foi realizada após 5d e 10d do crescimento das células tratadas com GEM em Meio Livre de Droga. As porcentagens se referem à quantidade de células negativas (azul) ou positivas (vermelho) para a marcação com AO.

8. DISCUSSÃO

O ADP segue sendo um dos tipos de câncer mais mortíferos em seres humanos. Apesar de décadas de estudo, quimioterápicos clássicos como a gemcitabina continuam sendo utilizados como alternativas de primeira escolha na clínica. Quimioterápicos clássicos usualmente são eficazes em reduzir o tamanho tumoral, porém subpopulações celulares resistem a esta toxicidade e causam a recorrência do câncer. Assim, entender os mecanismos envolvidos na resposta e resistência das células de ADP à GEM, especialmente a longo prazo, pode fornecer informações clinicamente relevantes. Aqui, nós observamos que o tratamento com GEM por 48h: (1) causou uma redução a longo prazo do número de células com fenótipo viável, especialmente para as doses de 10 e 30 μM ; (2) reduziu a clonogenicidade das células; e (3) aumentou indicadores de autofagia (AO e SSC) a longo prazo, os quais parecem estar associados à sobrevivência das células tumorais tratadas com GEM.

Nós não observamos um aumento de células com fenótipo apoptótico durante as 48h em que GEM foi mantida no meio de cultura. Este dado corrobora outros trabalhos da literatura utilizando células PANC-1 tratadas com GEM em condições experimentais semelhantes (Chandler e col 2004; Mao e col, 2016). Outras linhagens de ADP, entretanto, já se mostraram mais sensíveis à apoptose induzida por GEM do que a linhagem PANC-1, tais como MIAPaca1 e BxPC3 (Li e col, 2017). De fato, para tratamentos de 48h o IC50 para GEM foi de 11 μM para BxPC3, 48 μM para MIAPaca1 e surpreendentes 270 μM para PANC-1 (Ma e col, 2018). Os mecanismos por trás desta menor sensibilidade à GEM pelas células PANC-1 envolvem mutações em importantes oncogenes e genes supressores tumorais, como TP53, KRAS e BRAF, além de alterações epigenéticas complexas (Song e col, 2016) e expressão de outras proteínas como a peptidase ubiquitina-específica USP9X (Ma e col, 2018). Por outro lado, nós observamos que as células tratadas com GEM por 48h apresentaram aumento do tamanho celular. Esta alteração de fenótipo sugere um processo de parada no ciclo celular uma vez que a GEM atua produzindo dano ao DNA, o que já foi demonstrado na literatura (Miao e col, 2016; Pauwels e col, 2003; Gao e col, 2019). A longo prazo, estas células com tamanho aumentado poderiam adquirir um fenótipo de senescência (Song e col, 2016), processo de parada irreversível na proliferação celular. De fato, após 48h de tratamento com GEM, células Miapaca-2 e PANC-1 apresentam aumento de marcadores de senescência já para a dose de 1 μM , ao mesmo tempo que não se observou apoptose nestas mesmas condições de tratamento (Song e col, 2016).

Por outro lado, considerando o efeito pró-apoptótico da GEM, outros estudos mostraram indução de apoptose a partir de 72h de tratamento em células PANC-1 (Zhao

e col, 2011; Xian e col, 2016), sugerindo um efeito tempo-dependente. De fato, aqui nós observamos um aumento do número de células com fenótipo apoptótico após 5 e 10 dias da retirada da GEM do meio de cultura. Importante observar que este efeito ocorreu para todas as doses testadas. Além disso, observamos também que o dano causado pela GEM após 48h de tratamento continua disparando apoptose nas células tumorais mesmo após 10 dias, de modo que não é necessário que a droga esteja presente para que ocorra a apoptose.

Todas estas observações são clinicamente relevantes uma vez que utilizamos, aqui, um desenho experimental que se aproxima do protocolo de tratamento clínico (ou seja, 2 dias de tratamento seguido de 10 dias de recuperação). Neste sentido, é importante observar que na população de células tratadas com GEM 1 μM , mesmo 10 dias após o tratamento observamos células com fenótipo viável, conforme mostrado pela citometria de fluxo. Possivelmente, estas células estejam relacionadas com a resistência e recorrência tumorais. De fato, para as doses maiores de GEM a população de células com fenótipo viável reduziu significativamente, predominando a população de células com fenótipo apoptótico. Por outro lado, para o tratamento com GEM 1 μM nós observamos uma estabilização do número de células com fenótipo viável a partir de 5 dias após o tratamento, com presença de uma população bem definida de células fenotipicamente viáveis 10 dias após o tratamento.

Recentemente, Kinsey e colaboradores demonstraram que a autofagia protege células de ADP do tratamento com trametinib, inibidor da via da Raf/MEK/ERK. Este efeito foi demonstrado tanto em células, quanto modelos animais e, finalmente, em um caso clínico, no qual a inibição racional da autofagia reduziu de maneira extremamente eficaz tanto o tumor primário quanto metástases hepáticas do ADP (Kinsey e col, 2019). De fato, um dos mecanismos que parecem estar envolvidos na resistência do ADP à terapia é a autofagia (Yang e col, 2011). Além disso, GEM induz autofagia citoprotetora em células de câncer de mama, de modo que a inibição do processo disparou apoptose nas células tumorais (Chen e col, 2014). Em células de ADP, a autofagia exerce efeito citoprotetor na resposta tanto à GEM quanto à 5-Fluoruracila in vitro e em modelo animal (Zhou e col, 2019; Ma e col, 2018). Entretanto, é importante observar que estes trabalhos avaliam a autofagia somente de maneira aguda (24h ou 48h de tratamento), o que reduz a translacionalidade dos estudos.

Este resultado do papel clínico da autofagia na resposta terapêutica do ADP reforça a importância de entendermos a cinética de ativação da autofagia a longo prazo nas células tumorais a partir do estresse agudo (48h) causado pela presença da GEM. Entender o perfil de ativação da autofagia após a terapia é fundamental para permitir a modulação racional do mecanismo e uma sensibilização das células tumorais à morte

celular (Filippi-Chiela e col, 2015). Aqui, nós observamos um aumento na porcentagem de células positivamente marcadas para AO, assim como um aumento no número de células com elevada complexidade intracelular (SSC), já após as 48h do tratamento. Este aumento foi ainda mais pronunciado 5 dias após a retirada da GEM. Para a dose de 1 μ M, observamos um aumento ainda maior da porcentagem de células AO-positivas após 10d de tratamento. Por outro lado, para GEM 10 μ M e 30 μ M não observamos este aumento, provavelmente pela ocorrência de dano mais intenso (não reparável pela autofagia) e apoptose de grande parte das células. De fato, as células com fenótipo viável após 5 e 10 dias do tratamento apresentaram níveis mais elevados de marcação com AO do que as células com fenótipo de apoptose inicial, sugerindo que a autofagia induzida por GEM atua citoprotendendo as células de ADP. Este resultado corrobora diversos estudos que mostram que a autofagia atua protegendo células de ADP tanto em condições basais (New e col, 2017) quanto em resposta à terapia (Chen e col, 2013; Ma e col, 2018; Yang e col, 2018; Kinsey e col, 2019). Entretanto, é importante destacar que nenhum destes trabalhos realizou um desenho experimental in vitro que se assemelhe ao protocolo clínico de tratamento, o que tem se mostrado fundamental para aumentar a translacionalidade de um estudo in vitro (Augustine e col, 2009; Silva e col, 2016).

O mecanismo de citoproteção exercido pela autofagia em resposta à GEM não está claro. A autofagia disparada por indutores de dano ao DNA como a GEM parece proteger as células tumorais da morte celular através de diversos mecanismos, tais como modulação do reparo de DNA e provimento de ATP para este reparo, entre outros (Filippi-Chiela e col, 2013). Outros mecanismos, entretanto, também podem estar por trás da citoproteção exercida pela autofagia. Entre estes possíveis mecanismos estão a degradação por mitofagia das mitocôndrias permeabilizadas (Drake e col, 2017), uma vez que a apoptose induzida por GEM envolve a permeabilização mitocondrial (via intrínseca da apoptose) (Schniewind e col, 2003). Outro possível mecanismo de citoproteção pela autofagia é a redução da formação de espécies reativas de oxigênio que medeiam o efeito citotóxico de alguns quimioterápicos (Donadelli e col, 2011; Park e col, 2014). Neste sentido, considerando o efeito pró-senescente da GEM citado anteriormente, o tratamento de células PANC-1 com um antioxidante reduziu os marcadores de senescência induzidos por GEM, sugerindo que de fato um aumento do estresse oxidativo possa estar envolvido na resposta à GEM (Song e col, 2016). A modulação do crosstalk entre autofagia, senescência, apoptose e espécies reativas possui, portanto, potencial terapêutico relevante no ADP considerando o protocolo de tratamento com GEM.

Se, por um lado, estudos de populações celulares nos fornecem informações relevantes quanto aos mecanismos principais de resposta a um dado quimioterápico, estudos genômicos e de respostas em células individuais tem mostrado que o aspecto da heterogeneidade intratumoral é central na resposta à terapia. Em células individuais (single cells) de glioblastoma, mostramos que quanto maiores os níveis de autofagia em resposta à temozolomida, menor o risco de apoptose e maior a probabilidade das células tumorais sobreviverem (Filippi-Chiela e col, 2015). Este aspecto é bastante relevante no ADP uma vez que observamos, no ensaio clonogênico, que a linhagem PANC-1 apresenta ampla heterogeneidade intratumoral, conforme evidenciado pela variação de formas e tamanhos de colônias na condição controle. Esta heterogeneidade pode ser responsável, também, pela ocorrência de subpopulações resistentes, como sugerido pela presença de células com fenótipo viável 10 dias após o tratamento de GEM1. Entretanto, é importante destacar que talvez o ensaio clonogênico, por utilizar somente 100 células para cada condição, não tenha sido capaz de representar a amplitude total da heterogeneidade da linhagem PANC-1. Assim, experimentos de longo prazo com populações celulares maiores são importantes para superar esta questão clinicamente relevante.

9. CONCLUSÃO

Concluimos que a GEM exerce efeito citotóxico a longo prazo em células de ADP, e que esta toxicidade parece ser atenuada pelo disparo de autofagia (**Figura 8**). Após Levy e col terem demonstrado pioneiramente, em 2017, que a inibição de autofagia aumenta a eficácia terapêutica em glioblastoma (Levy e col, 2017), recentemente este efeito foi demonstrado também em ADP, com redução tanto do tumor primário quanto metástases hepáticas (Kinsey e col, 2019). Assim, acreditamos que entender a cinética a longo prazo da ativação da autofagia em resposta à GEM poderá permitir a combinação racional deste quimioterápico com inibidores deste mecanismo como estratégia para sensibilizar as células de ADP resistentes à morte celular.

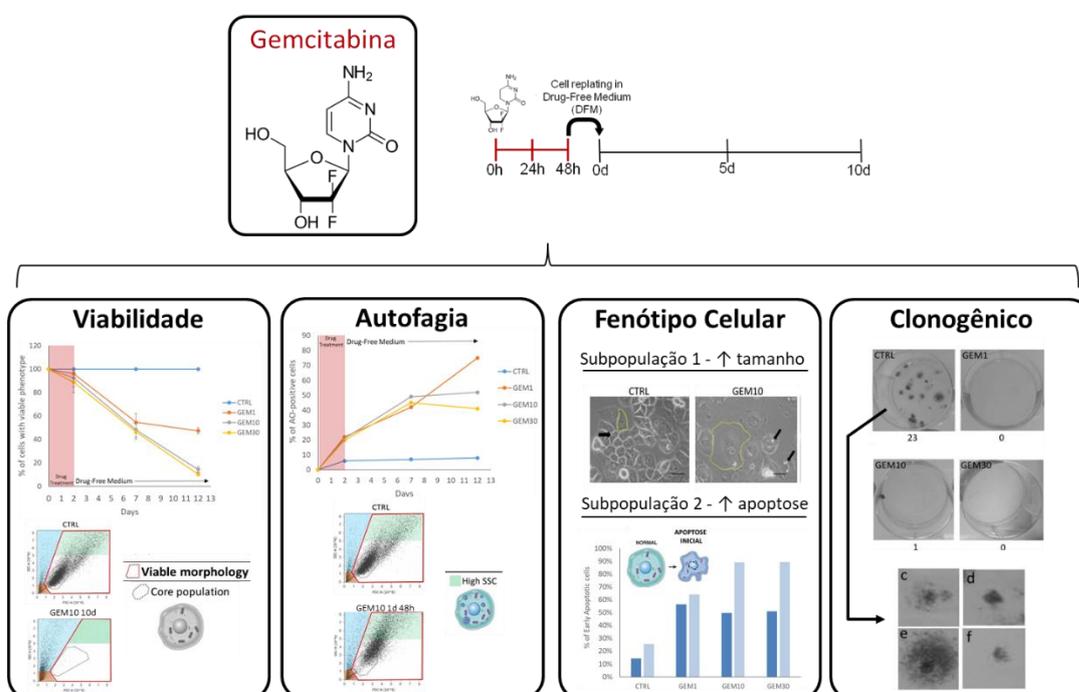


Figura 8 - Esquema representativo dos mecanismos celulares envolvidos na resposta de células PANC-1 à gemcitabina.

10. FIGURAS SUPLEMENTARES

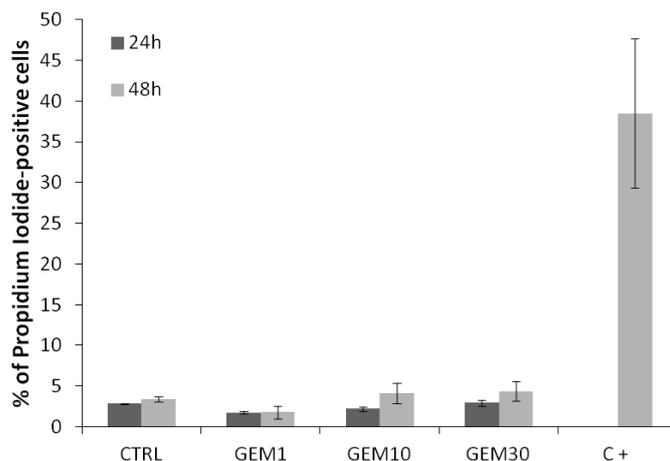


Figura Suplementar 1 – Porcentagem de marcação com Iodeto de Propídeo após tratamento das células PANC-1 com GEM. As células PANC-1 foram tratadas com GEM 1, 10 e 30 μM por 48h, seguido da marcação com Iodeto de Propídeo e leitura em citômetro de fluxo.

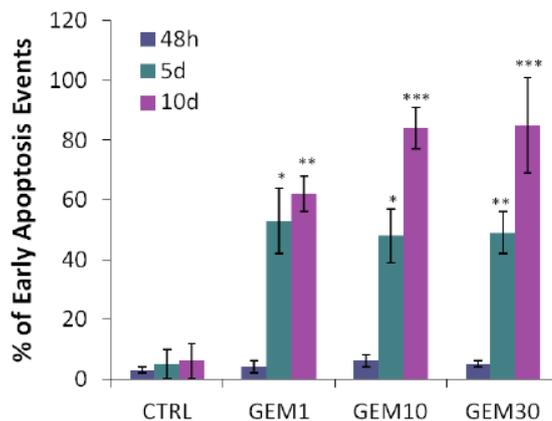


Figura Suplementar 2 – Porcentagem de células com morfologia de apoptose inicial. Os dados foram obtidos a partir da citometria para FSC x SSC, mostrada de maneira representativa na Figura 3. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 em relação ao controle para cada dia de análise.

11. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Consideramos importante tornar claro que o estudo está em andamento e que existem limitações inerentes ao modelo ou às metodologias utilizadas. São elas:

- A utilização de uma única linhagem celular
- A falta de ensaios para complementar as análises de autofagia e embasar conclusões mais assertivas
- Ausência de ensaios específicos de morte celular (especialmente apoptose)
- Ausência de ensaios de modulação da autofagia combinadas à GEM para, de fato, poder tirarmos conclusões objetivas acerca do papel da autofagia no modelo.

12. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos e tendo em mente as limitações do presente estudo, temos como perspectivas de curto-médio prazo:

- Confirmar a ativação da autofagia através de Western blot para as proteínas LC3 e SQSTM1 na resposta a longo prazo.
- Observar a resposta das células PANC-1 após retratamento com GEM.
- Confirmar os resultados obtidos nas células PANC-1 na linhagem Capan2
- Avaliar os níveis de senescência induzidos por GEM em células PANC-1 a longo prazo
- Avaliar o papel da autofagia na resposta das células PANC-1 à GEM através da inibição racional do mecanismo utilizando 3-metiladenina (inibidor da fase inicial) e Cloroquina (inibidor da etapa tardia).

13. REFERÊNCIAS

- Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Current and Evolving Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.18(7); 1-43.
- Augustine CK, Yoo JS, Potti A, e col. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009. 15;15(2):502-10.
- Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*. 2014. 20(32):11182-98.
- Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resistance Updates*. 2015. 23; 55-68.
- Bordin DL, Lima M, Lenz G, e col. DNA alkylation damage and autophagy induction. *Mutat Res*. 2013. 753(2):91-9.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*. 2013. 15:713-720.
- Chandler N, Canete J, Callery MP. Caspase-3 Drives Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells After Treatment With Gemcitabine. *J Gastrointest Surg*. 2004. 8(8):1072-8.
- Chen M, He M, Song Y, e col. The cytoprotective role of gemcitabine-induced autophagy associated with apoptosis inhibition in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int J Mol Med*. 2014. 34(1):276-82.
- Ciccolini J, Serdjabi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016. 78:1–12.
- De Sousa Cavalcante L, Monteiro G. Gemcitabine: metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *Eur J Pharmacol*. 2014. 741:8-16.
- Donadelli M, Dando I, Zaniboni T, e col. Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell Death Dis*. 2011. 2:e152.
- Drake LE, Springer M, Poole L, e col. Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer. *Semin Cancer Biol*. *Semin Cancer Biol*. 2017. 47: 110–124.
- Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva MM, e col. 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.
- Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy*. 2015. 11(7):1099-113.
- Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, e col. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015. 34(7):856-80.

- Gao J, Wang G, Wu J, et al. Arsenic trioxide inhibits Skp2 expression to increase chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Am J Transl Res*. 2019. 11(2):991-997.
- Hajatdoost L, Sedaghat K, Walker EJ, et al. Chemotherapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review. *Medicina (Kaunas)*. 2018. 54(3).
- Hamed SS, Straubinger RM, Jusko WJ. Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013. 72(3):553-63
- Heand C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009. 43:67-93
- Katz MH, Wang H, Fleming JB, et al. Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma. *Eur J Pharm Sci*. 2016. 92:183-93.
- Khare V, Singh A, Mahajan G, et al. Long-circulatory nanoparticles for gemcitabine delivery: Design and investigation of pharmacokinetics and *in-vivo* anticancer efficacy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. *Eur J Pharm Sci*. 2016. 92:183-93
- Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev*. 2011. 25:1999-2010.
- Kinsey C, Camolotto S, Boespflug A, et al. Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med*. 2019. 25(4):620-627.
- Levy J, Zahedi S, Griesinger A, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *eLife*. 2017. 6: e19671.
- Li D, Wang J, Zhou J, Zhan S, et al. B7-H3 combats apoptosis induced by chemotherapy by delivering signals to pancreatic cancer cells. *Oncotarget*. 2017. 8(43):74856-74868
- Miao X, Koch G, Ait-Oudhia S, et al. Pharmacodynamic Modeling of Cell Cycle Effects for Gemcitabine and Trabectedin Combinations in Pancreatic Cancer Cells. *Front Pharmacol*. 2016. 7:421.
- Mao Y, Xi L, Li Q, et al. Regulation of cell apoptosis and proliferation in pancreatic cancer through PI3K/Akt pathway via Polo-like kinase 1. *Oncol Rep*. 2016. 36(1):49-56
- Mujumdar N and Saluja A. Autophagy in pancreatic cancer: an emerging mechanism of cell death. *Autophagy*. 2010. 6(7):997-8
- Mukubou H, Tsujimura T, Sasaki R, Ku Y. The role of autophagy in the treatment of pancreatic cancer with gemcitabine and ionizing radiation. *Int J Oncol*. 2010. 37(4):821-8.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008. 451:1069-1075.
- Ma T, Chen W, Zhi X, et al. USP9X inhibition improves gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by inhibiting autophagy. *Cancer Lett*. 2018. 436:129-138.

- Neuzillet C, Sauvanet A, Hammel P. Prognostic factors for resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Visc Surg*. 2011. 148(4):e232-43.
- New M, Van Acker T, Long j, e col. A. Tooze. Molecular Pathways Controlling Autophagy in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*. 2017. 7:28
- Pauwels B, Korst A, Pattyn G, e col. Cell Cycle Effect of Gemcitabine and Its Role in the Radiosensitizing Mechanism in Vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003. 57(4):1075-83.
- Plunkett W, Huang P, Xu YZ, e col. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol*. 1995. 22:3-10.
- Park SH, Sung JH, Kim EJ, Chung N. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines. *Braz J Med Biol Res*. 2015. 48(2): 111–119.
- Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer*. 2003. 2:15.
- Schniewind B, Christgen M, Kurdow R, e col. Resistance of pancreatic cancer to gemcitabine treatment is dependent on mitochondria-mediated apoptosis. *Int J Cancer*. 2004. 109(2):182-8.
- Silva AO, Dalsin E, Onzi GR, Filippi-Chiela EC, Lenz G. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res*. 2016. 348(2):177-183
- Song Y, Baba T, Mukaida N. Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Comm*. 2016. 477(3):515-9.
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, e col. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019. 47(D1):D941-D947.
- Thomé MP, Filippi-Chiela EC, Villodre ES, e col. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *J Cell Sci*. 2016. 129(24):4622-4632
- Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011. 378(9791):607-20.
- Yang S, Wang X, Contino G. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev*. 2011. 25(7):717-29
- Yang A, Herter-Sprie G, Zhang H, e col. Autophagy sustains pancreatic cancer growth through both cell autonomous and non-autonomous mechanisms. *Cancer Discov*. 2018. 8(3):276-287
- Yumna H. Shabaik, Melissa Millard, Nouri Neamati Mechanistic Evaluation of a Novel Small Molecule Targeting Mitochondria in Pancreatic Cancer Cells. *Plos One*. January 2013. Volume 8. Issue 1. | e54346
- Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM. Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology*. 2005. 128(6):1626-41

Yong-Xian G, Xiao-Huan L, Fan Z, Guo-Fang T. Gemcitabine inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *J Cancer Res Ther.* 2016. 12(Supplement):1-4.

Zhou Y, Liu H, Xue R, Tang W, Zhang S. BH3 Mimetic ABT-199 Enhances the Sensitivity of Gemcitabine in Pancreatic Cancer in vitro and in vivo. *Dig Dis Sci.* 2018. 63(12):3367-3375

Zhao B, Li L, Cui K, e col. Mechanisms of TRAIL and Gemcitabine Induction of Pancreatic Cancer Cell Apoptosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011. 12(10):2675-8.

LIVROS

Kierzembraum A and Tres L. *Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia.* 4ªEd. Elsevier. 2016.

WEBSITES

<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (acesso em 12.09.2018)

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018> (acesso em 03.08.2018)

<https://nacoesunidas.org/oms/2018> (acesso em 02/08/2018)