

Avaliação do papel da autofagia em células de adenocarcinoma pancreático durante o tratamento com gemcitabina.

Paula Colonetti Ferst^{1,3}; Patrícia Luciana da Costa Lopez^{1,2}

1 Grupo de pesquisa em Biologia Celular e Molecular do Centro de pesquisa Experimental, HCPA; 2 PPG Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia – UFRGS; 3 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Introdução

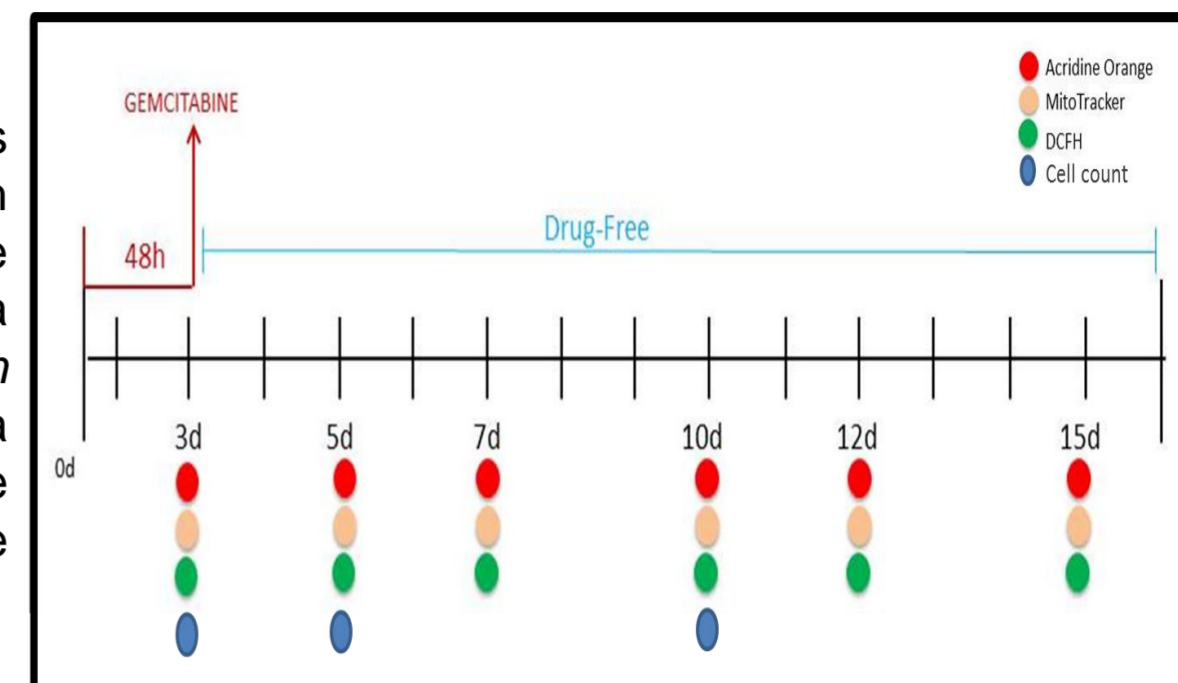
O adenocarcinoma (ADP) é o câncer de pâncreas mais comum, correspondendo a 90% dos casos. A difícil detecção e o comportamento agressivo levam a altas taxas de mortalidade. A Gemcitabina (GEM) é o quimioterápico clássico de primeira escolha, usualmente combinado a outros quimioterápicos como o Paclitaxel (PAC), mas ainda sem trazer boas perspectivas aos pacientes. Assim, o estudo de eventos celulares, como autofagia, podem trazer novas perspectivas para terapia de ADP.

Objetivo

Avaliar a resposta das células de ADP a múltiplos ciclos de tratamento com GEM e PAC, em perfil de tratamento semelhante ao regime clínico, com foco em medidas de autofagia, morte celular e estresse oxidativo.

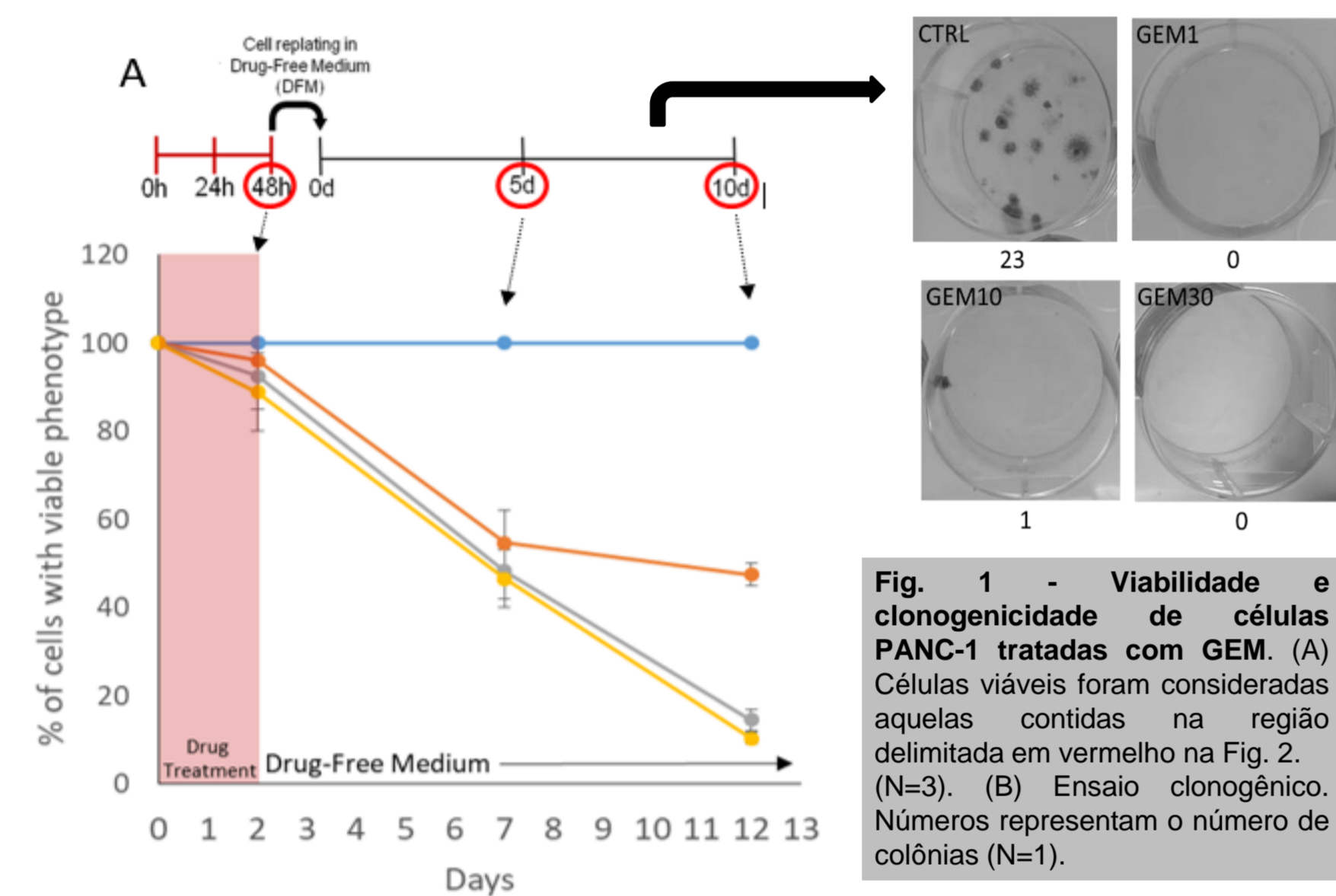
Metodologia

Linhagens de Células de ADP PANC-1 tratadas com GEM (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M e 10 μ M) por 48h seguido de replaqueamento em meio livre de droga. Ao longo de 15 dias foram avaliados a proliferação celular (*Cumulative Population Doubling* e ensaio clonogênico), autofagia (laranja de acridina - AO), a quantidade de mitocôndrias (Mitotracker) e a quantidade de espécies reativas de oxigênio (DCFH).



Resultados

1. GEM afeta a viabilidade de ADP: Observamos na curva de dose uma redução dose-dependente da proliferação celular ao longo dos 10 dias pós tratamento (Fig. 1) e também que a GEM reduz o Número de Células com Fenótipo Viável e a Clonogenicidade a Longo Prazo



2. Alterações Morfológicas após tratamento com GEM : Gemcitabina Induz Alterações Morfológicas Agudas e a Longo Prazo em Células de ADP.

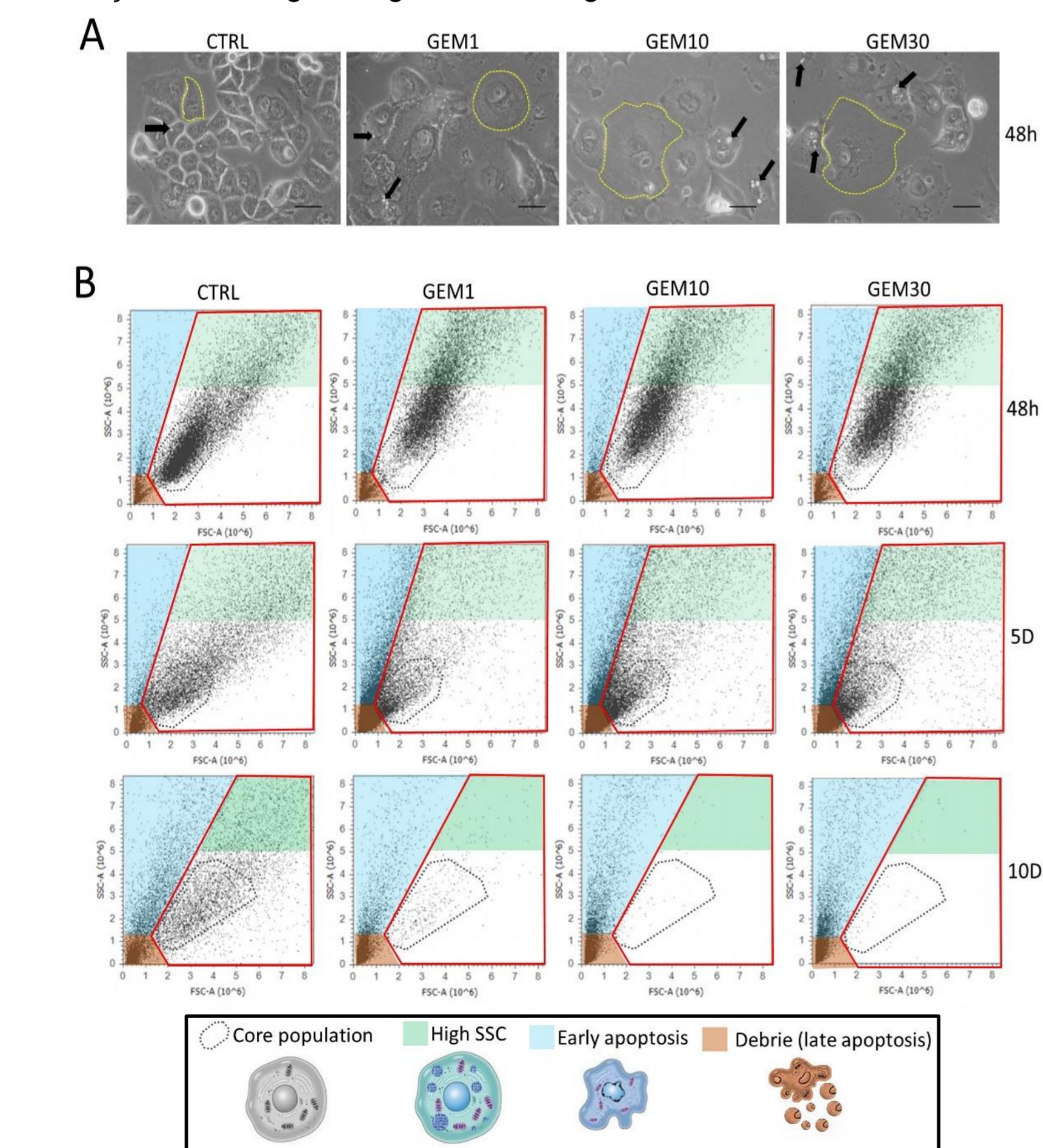
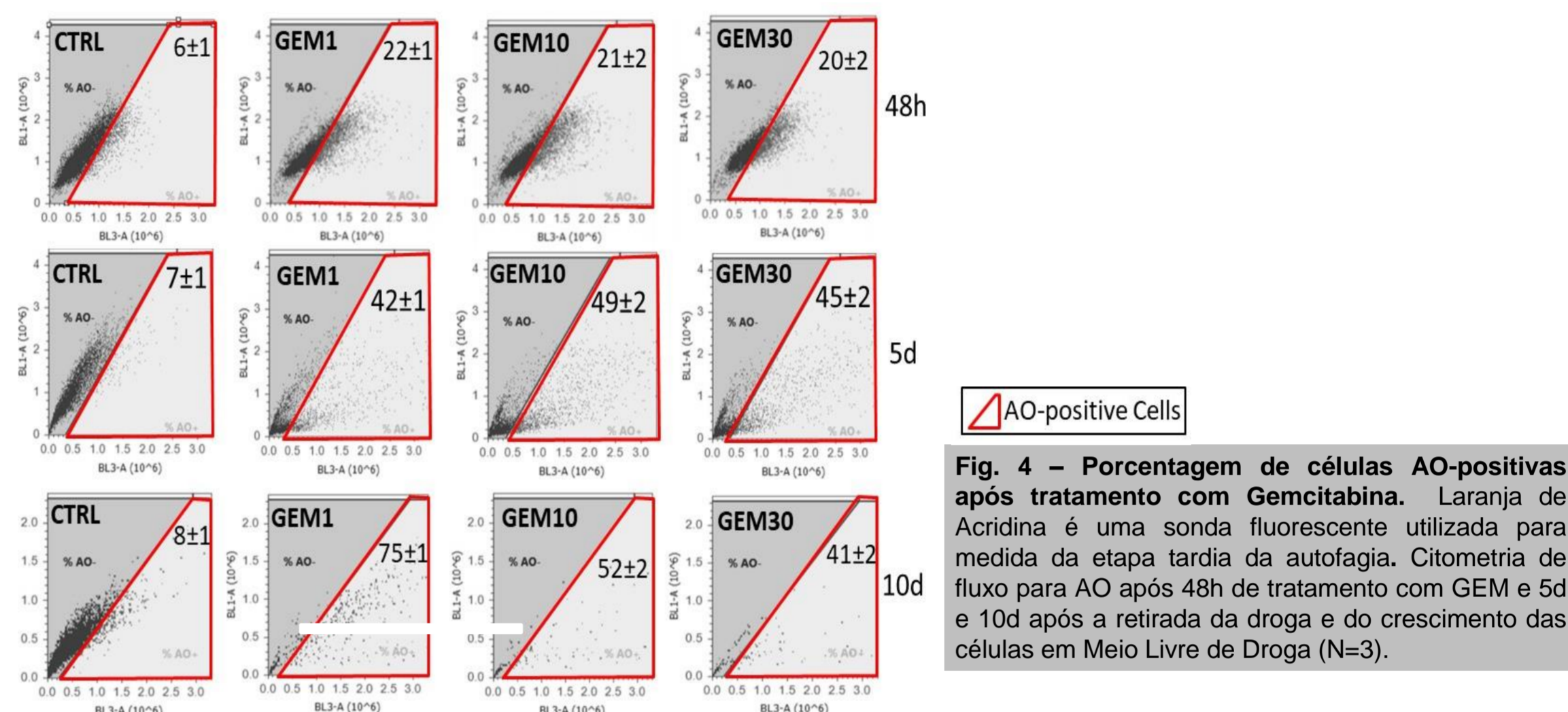


FIGURA 3 - Morfologia das células PANC-1 tratadas com GEM após 48h e a longo prazo. (A) Imagens representativas após 48h do tratamento com GEM. Escala: 20 μ m. (B) Gráfico de FSC (tamanho – eixo x) versus SSC (complexidade – eixo y) (N=3).

3. Aumento de células em autofagia após tratamento com GEM: O tratamento com GEM aumentou a porcentagem de células AO+ a longo prazo, o que poderia auxiliar na adaptação das células ao estresse e sobrevivência a longo prazo (Fig. 4).



4. Massa mitocondrial e formação de ROS: Observamos uma redução da quantidade de mitocôndrias nas células tratadas, especialmente após as 48h do tratamento (Fig. 5). Uma vez que observamos aumento da marcação com AO, é possível que a GEM induza mitofagia nas células de ADP. Já quanto a espécies reativas de oxigênio (ROS), observamos uma redução na quantidade de espécies reativas celulares para todas as doses (Fig. 5). Esta redução poderia estar associada à redução da quantidade de mitocôndrias que observamos.

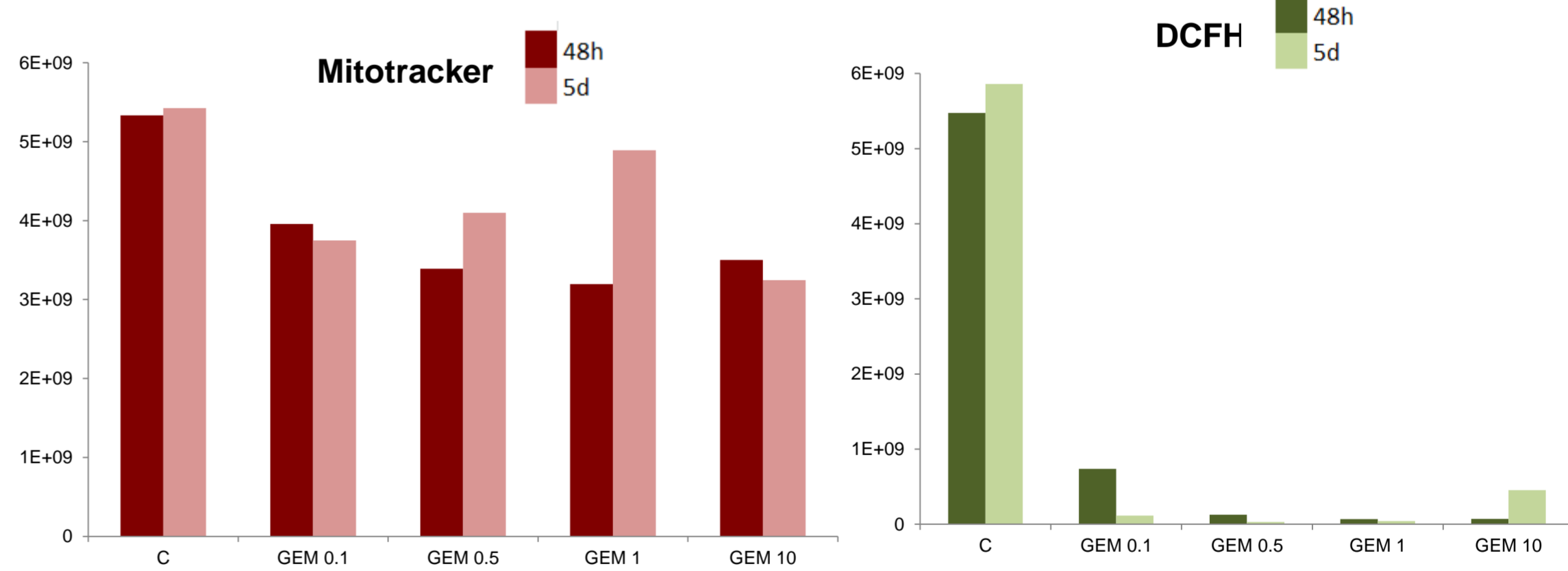


Fig. 5 – Massa mitocondrial medida por marcação com Mitotracker Red e Quantidade de espécies reativas de oxigênio medidas por marcação com DCFH - Gemcitabina (0.1 – 10 μ M) (N=1).

Conclusão

- Observamos um aumento da porcentagem de células com características de autofagia concomitante com a redução da massa mitocondrial e redução da quantidade de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que o dano causado pela GEM, direta ou indiretamente, induz a redução da massa mitocondrial e ativação de autofagia.
- A GEM parece induzir mitofagia nas células de ADP, e os níveis de mitofagia podem estar associados à sensibilidade ao tratamento. Entretanto, a partir de 5d a população de células de ADP tratadas com GEM voltou a crescer, sugerindo uma recuperação do dano causado pela GEM.

Perspectivas

- Realizar o experimento completo para a curva de tempo proposta, incluindo o tratamento com Paclitaxel.
- Avaliar marcadores específicos de autofagia e mitofagia, bem como modular a autofagia a fim de sensibilizar as células de ADP à GEM e ao PAC.