

AUTOFAGIA E CONTEÚDO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS DEFICIENTES EM XPD TRATADAS COM DOXORRUBICINA



Caroline Gonçalves Vieira¹, Guido Lenz¹

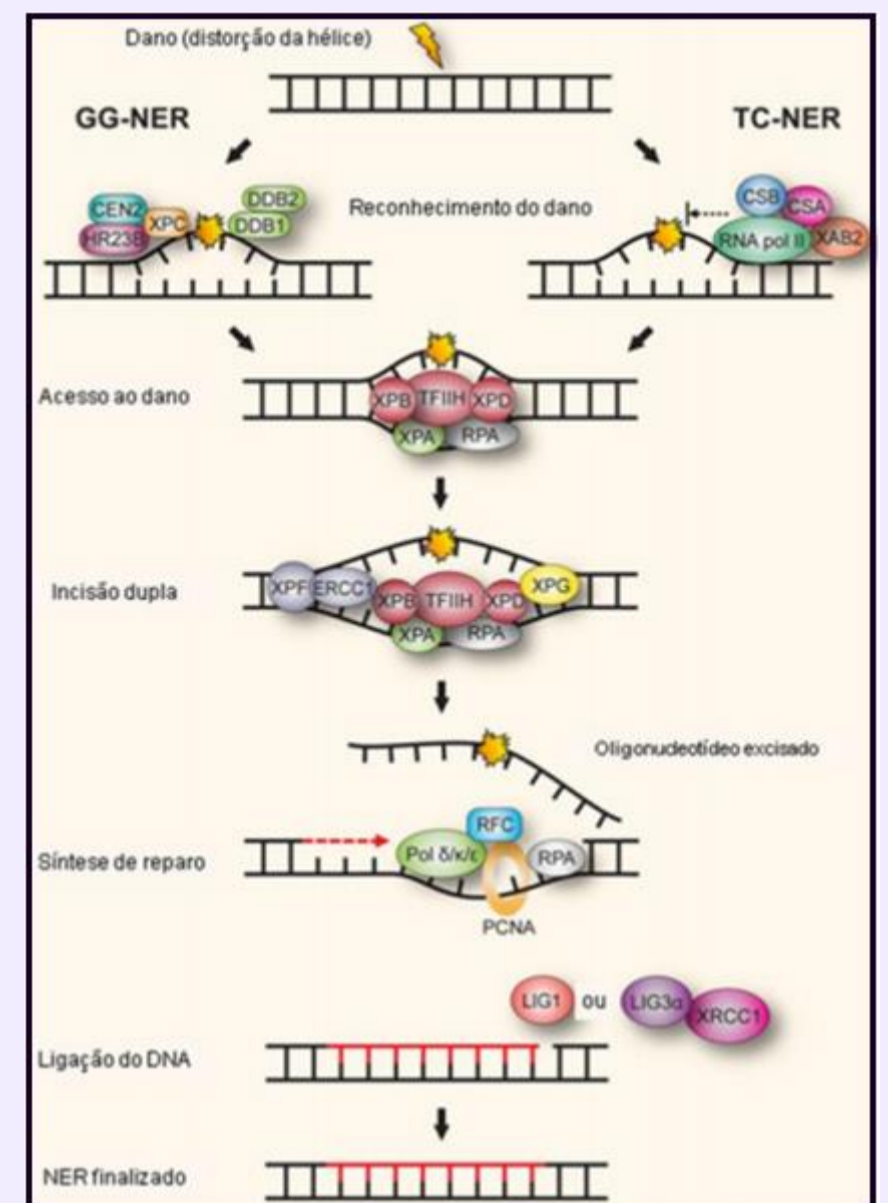
¹Departamento de Biofísica, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

INTRODUÇÃO

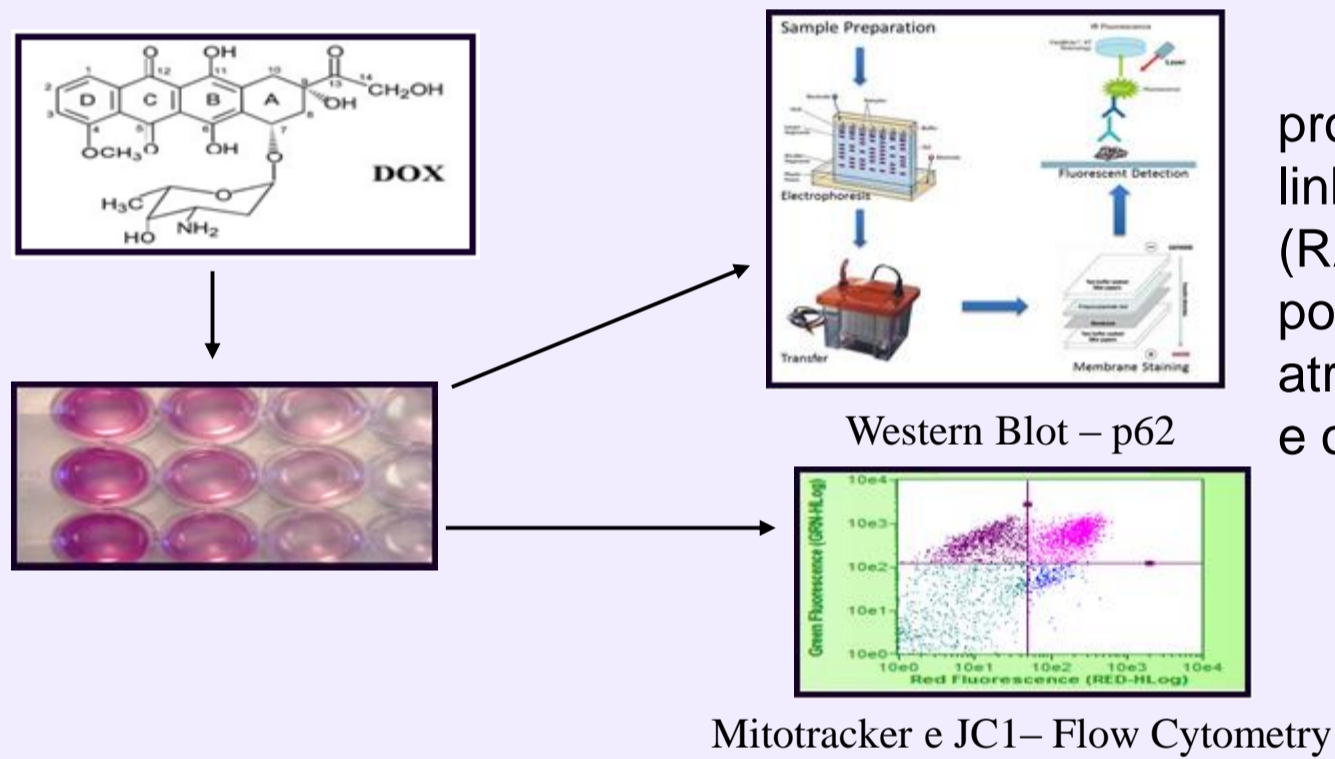
O reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é uma das vias mais versáteis de reparo, conhecido pela sua capacidade em remover lesões que levam a deformações estruturais importantes no DNA. Células deficientes nesta via de reparo são mais sensíveis as antraciclinas, sugerindo a ação de proteínas desta via no reparo de lesões induzidas por estas drogas. Dentre elas, a doxorubicina (DOX), que tem como mecanismo de ação a interação com a enzima Topoisomerase II, alquilações e induções de pontes no DNA, bem como formação de radicais livres dentro da célula, é capaz de induzir autofagia em células tumorais. Assim como, o reparo de DNA, pode ser considerado uma resposta citoprotetora ao estresse refletindo os esforços da célula de evadir a morte celular e gerar resistência tumoral. Recentemente foi relatado o envolvimento de alterações mitocondriais nas síndromes relacionados com a reparação de DNA, e também a localização mitocondrial de algumas proteínas do NER.

OBJETIVO

Avaliar as alterações mitocondriais através de citometria de fluxo e o processo autofágico por western blot em linhagens de fibroblastos humanos proficientes (MRC5) e deficientes em NER (XPD) após 72h de tratamento com DOX.



METODOLOGIA



Foram utilizadas linhagens de fibroblastos humanos uma proficiente (MRC5) e outra deficiente (XPD) em NER. Essas linhagens foram tratadas por 72h com DOX ou Rapamicina (RAPA). Após esse período foram analisados o conteúdo e o potencial de membrana mitocondrial (Mitotracker Green e JC1), através de citometria de fluxo de acordo com o esquema abaixo, e o processo autofágico, por western blot.

RESULTADOS

Células deficientes em XPD apresentaram aumento na massa mitocondrial quando tratadas com DOX, mas isso não foi observado em MRC5. Em células complementadas com XPD funcional, a análise da massa mitocondrial foi semelhante à MRC5.

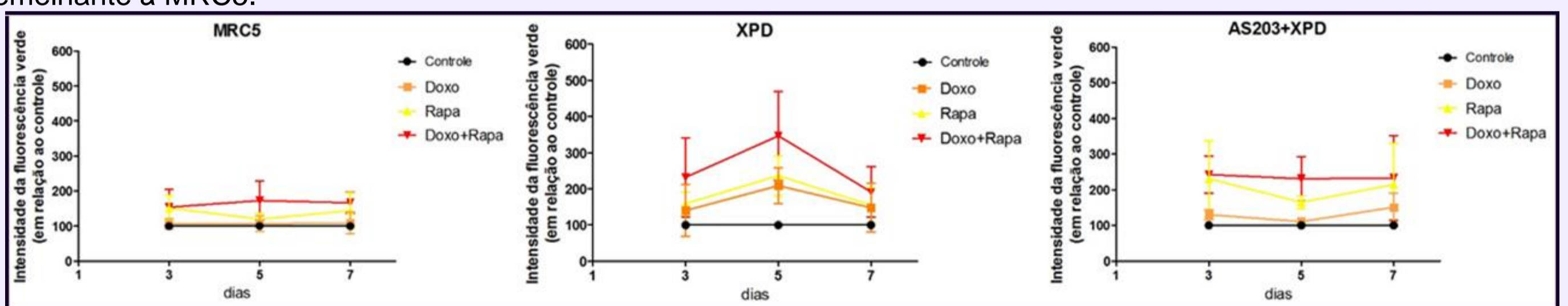


Figure 1. Análise do conteúdo mitocondrial por Mitotracker Green. Células foram tratadas por 72h, e analisadas por citometria de fluxo, conforme esquema apresentado na metodologia.

Também foi observada uma redução acentuada do potencial de membrana nas células deficientes em reparo (Figura 2). Quanto ao processo autofágico, houve um aumento na expressão da proteína p62 nas células deficientes em XPD, indicando um bloqueio deste processo.

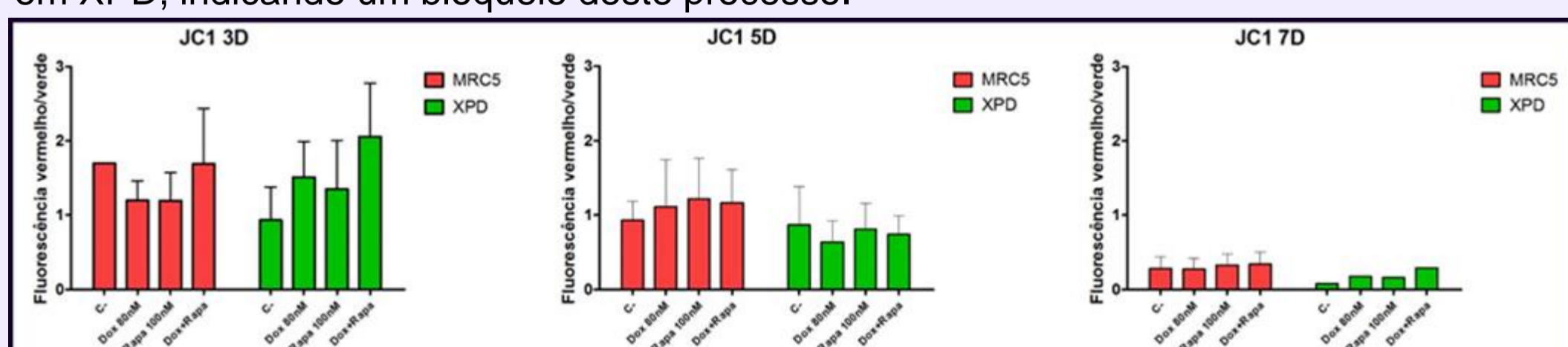


Figura 2. Análise de JC1 por citometria de fluxo. Células foram tratadas por 72h, e analisadas para o potencial de membrana mitcondrial de acordo com o esquema apresentado na metodologia.

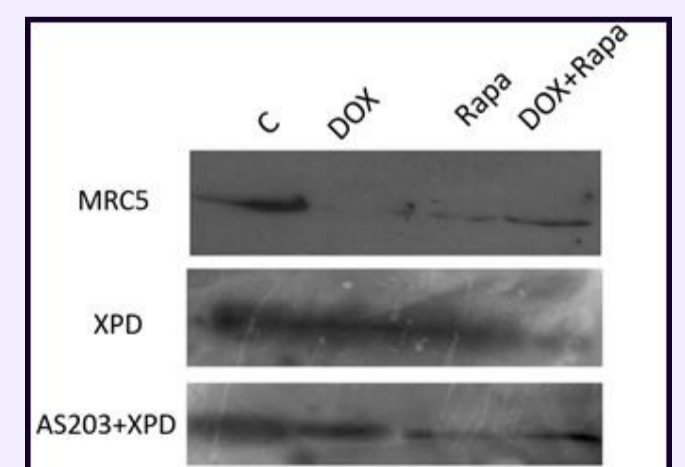


Figura 3. Expressão da proteína p62 por western blot.

CONCLUSÃO

Estes resultados parciais sugerem um possível envolvimento da proteína XPD na autofagia, especificamente no processo de mitofagia pelo aumento da massa mitocondrial observado nestas células. Além disso, podemos inferir que o NER eficiente ativado após o tratamento com DOX é essencial para a sobrevivência celular, uma vez que sua deficiência impede o processo autofágico induzindo provavelmente um mecanismo de morte celular. Desta forma, esta via de reparo possivelmente estaria envolvida no mecanismo de resistência encontrado na terapia clínica do câncer.