

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

Eloisa Dalsin

**ESTUDO DA RESPOSTA *IN VITRO* A TRATAMENTOS QUIMIOTERÁPICOS EM
LINHAGENS TUMORAIS A PARTIR DE COLÔNIAS ORIGINADAS DE CÉLULAS
ÚNICAS**

Porto Alegre

2016

Eloisa Dalsin

**ESTUDO DA RESPOSTA *IN VITRO* A TRATAMENTOS QUIMIOTERÁPICOS EM
LINHAGENS TUMORAIS A PARTIR DE COLÔNIAS ORIGINADAS DE CÉLULAS
ÚNICAS**

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

Área de habilitação: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Dalsin, Eloisa

ESTUDO DA RESPOSTA IN VITRO A TRATAMENTOS
QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS TUMORAIS A PARTIR DE
COLÔNIAS ORIGINADAS DE CÉLULAS ÚNICAS / Eloisa Dalsin.

-- 2016.

63 f.

Orientador: Guido Lenz.

Coorientador: Andrew Oliveira Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Câncer. 2. Glioma. 3. Resistência a
quimioterápicos. 4. Colônias originadas de células
únicas. 5. Temozolomida. I. Lenz, Guido, orient. II.
Silva, Andrew Oliveira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Eloisa Dalsin

**ESTUDO DA RESPOSTA *IN VITRO* A TRATAMENTOS QUIMIOTERÁPICOS EM
LINHAGENS TUMORAIS A PARTIR DE COLÔNIAS ORIGINADAS DE CÉLULAS
ÚNICAS**

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

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma – UFRGS

Prof.^a Dra. Karina Mariante Monteiro - UFRGS

Prof. Dr. Guido Lenz – UFRGS

RESUMO

A sensibilidade *in vitro* a terapias antineoplásicas correlaciona-se pouco com a eficácia clínica em pacientes oncológicos, devido à sobrevivência de uma parcela ínfima de células tumorais resistentes que, eventualmente, levam a recorrência. Análises de célula-única, portanto, podem ser determinantes para a compreensão da resistência. Não é conhecido se as subpopulações resistentes são provenientes da seleção de uma única população clonal da massa tumoral ou se são compostas por variadas subpopulações, que compartilham uma ancestralidade, mas apresentam diferentes graus de resistência. Assim, o objetivo do trabalho é analisar o perfil de resposta clonal *in vitro* a quimioterápicos em linhagens tumorais, avaliando a heterogeneidade do efeito destes a partir de colônias originadas de células únicas. Células das linhagens U343 e U251 foram fotografadas diariamente até a formação de colônias compostas por 1 a 16 células ou, mantidas em cultura pelo tempo médio correspondente à formação de colônias de 50 células, calculado a partir de dados de Population Doubling (PD). Colônias formadas foram fotografadas e, em seguida, tratadas por 3 e 5 dias com Temozolomina (TMZ) e drogas adjuvantes (Mebendazol – MBZ, Vimblastina – VBL, Paclitaxel – PTX, Lomustina – CCNU e Cisplatina – CPT) nas suas doses plasmáticas. Após os tratamentos, as colônias foram fotografadas regularmente até o limite máximo do campo de captação da imagem. Dados morfométricos das colônias foram obtidos pelo programa ImageProPlus para a análise da área, do número de células e da densidade das colônias ao longo do tempo. Foi registrado a seleção de sub-regiões celulares resistentes, com taxas de crescimento distintas, dentro de colônias originadas de células únicas, principalmente após tratamento com VBL e MBZ: esse evento foi denominado de resistência subclonal. Todas as drogas testadas em U251 apresentaram a ocorrência de resistência subclonal, exceto PTX, que desencadeou morte celular em todas colônias monitoradas. Em U343, a maioria das colônias proliferativas eram homogeneamente resistentes, embora tenham sido observados dois casos de resistência subclonal dentre seis colônias resistentes a VBL. Como conclusão, acreditava-se que uma colônia gerada a partir de célula única seria composta por células fenotípica e genotipicamente idênticas entre si e assim, responderia de forma homogênea aos quimioterápicos. No entanto, foi observado que, dentro de uma mesma colônia, a resposta à quimioterápicos também pode ser heterogênea. Os dados reforçam que, mesmo dentre clones, a resposta de células-únicas pode ser o ponto decisivo para o reestabelecimento do tumor. Como perspectiva, pretende-se automatizar a contagem das células, por meio de marcadores fluorescentes, para uma análise mais detalhada da origem dos eventos de resistência subclonal.

Palavras-chave: Glioma, Resistência, Colônias Originadas de Células Únicas, Temozolomida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	7
1.1 Resistência a quimioterápicos.....	7
1.2 Heterogeneidade intratumoral: a importância de estudos de resistência de células únicas.....	9
1.3 Análise de colônias originadas de células únicas como estratégia para estudos de resistência a quimioterápicos.....	10
1.4 Hipóteses de origem da resistência subclonal.....	12
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	15
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELL PROLIFERATION	58

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

1.1 Resistência aos quimioterápicos

Para muitos cânceres, a sensibilidade *in vitro* das células tumorais a terapias antineoplásicas ainda correlaciona-se pouco com a eficácia clínica dos mesmos tratamentos em pacientes oncológicos (Fay *et al.*, 2014; Volm e Efferth, 2015). A quimioterapia é um dos principais métodos empregados no tratamento de cânceres; entretanto, independente do potencial citotóxico inerente à droga, observado pela redução no tumor residual, esta estratégia terapêutica pode apresentar eficácia clínica limitada, devido à sobrevivência de poucas células resistentes que, eventualmente, levam a recorrência da doença (Furnari *et al.*, 2007; Holohan *et al.*, 2013). Assim, o desenvolvimento de resistência é um dos maiores desafios no estudo de terapias contra cânceres e, apesar dos avanços científicos e tecnológicos das últimas décadas, pouco foi acrescido na sobrevida média dos pacientes para alguns tipos de tumores, como os de pâncreas e glioblastoma. Isso ressalva a importância da avaliação de propostas terapêuticas *in vitro* a partir de dados de resistência, que pode representar um melhor preditor do desfecho clínico que valores baseados em sensibilidade (Volm e Efferth, 2015).

Glioblastoma multiforme é o tumor mais comum do sistema nervoso central, com incidência mundial de 5-8 casos/100 000 indivíduos (Friedman *et al.*, 2000). É classificado pela WHO, com base no grau histológico de malignidade, como de grau IV, sendo considerado o mais agressivo dentre os tumores cerebrais malignos (Urbanska *et al.*, 2014). Apesar do emprego de um regime terapêutico altamente agressivo - composto por ressecção cirúrgica, radio e quimioterapia -, relatos clínicos registram uma sobrevida média após diagnóstico de apenas cerca de um ano, que está fortemente associada ao elevado índice de recorrência da doença (cerca de 70% dos casos) (Mannas *et al.*, 2014). O quimioterápico de escolha na clínica para tratamento de glioblastoma é o agente alquilante Temozolomida (TMZ); no entanto, esse tipo tumoral também é refratário a terapia convencional com TMZ, que é capaz de elevar a sobrevida média dos pacientes de 12 para apenas 14 meses (Fine, 2005).

Dados prévios de ensaios crônicos de proliferação celular do nosso grupo mostraram que linhagens de glioma tratadas com TMZ na sua dose plasmática (50 μ M) comportam-se de maneira semelhante aos relatos clínicos, quando aplicado um desenho experimental baseado no regime terapêutico aplicado na clínica (5 dias de tratamento, seguido por 23 dias em meio

livre de droga, totalizando 23 dias de análise) (Silva A.O. *et al.*, - dados submetidos para Experimental Cell Research, 2016). Inicialmente, todas as linhagens demonstram uma sensibilidade satisfatória até o 12º dia, seguida de um crescimento progressivo da população celular sobrevivente. Independente da sensibilidade inicial, houve a manutenção de subpopulações com capacidade proliferativa após a terapia com TMZ, corroborando com dados da clínica que mostram uma redução inicial do volume tumoral acompanhado de uma posterior progressão do tumor (Van Meir *et al.*, 2010).

São documentados inúmeras alterações celulares e moleculares envolvidas no processo de resistência a quimioterápicos, como o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas (Shi *et al.*, 2010), e de proteínas relacionadas ao mecanismo de efluxo de drogas (Gottesman *et al.*, 2002), além da modulação dos sistemas de reparo de danos ao DNA (Perazzoli *et al.*, 2015; Kitange *et al.*, 2016). Evidências revelam que essas alterações podem ser produto de translocações ou mutações genéticas estáveis, transmitidas de forma íntegra às gerações seguintes (Holohan *et al.*, 2013). Dentre os mecanismos de resistência à TMZ, o mais efetivo na reversão dos efeitos danosos induzidos pelo fármaco é a superexpressão da enzima de reparo *O*⁶-metilguanina metil transferase (MGMT) em células tumorais, que é responsável pela remoção do grupamento alquil adicionado à posição *O*⁶ dos resíduos de guanina pela TMZ, prevenindo o mal pareamento com resíduos de timina durante a replicação do DNA (Fan *et al.*, 2013). Além disso, o mal funcionamento do sistema de reparo de pareamento errado (MMR) e a superativação dos demais sistemas de reparo de DNA, também são relacionados com a aquisição de resistência à TMZ em gliomas (Mcfaline-Figueroa *et al.*, 2015). Entretanto, terapias molecularmente direcionadas para estes alvos apresentam pouco impacto terapêutico, como documentado para inibidores de proteínas de efluxo (Binkhathlan e Lavasanifar, 2013) ou para inibidores da enzima de reparo MGMT em gliomas resistentes a TMZ (Watson *et al.*, 2010).

Em tumores sólidos mais comuns, como colón, cérebro, pâncreas ou mama, resistência genética é extensamente descrita: 95% das mutações somáticas com alteração do seu produto proteico correspondem a substituições de uma base (causadas por missenses, mutações sem sentido, alterações em sítios de splicing ou de regiões próximas a códons de início e de terminação), e o restante corresponde a deleções ou inserções de algumas bases. Ademais, muitos tumores sólidos apresentam aberrações cromossômicas, como variações no número de cromossomos (aneuploidias), inversões, translocações e, principalmente, deleções e duplicações que dificultam a detecção de alvos-terapêuticos ou alteram a expressão de genes

relacionados com toxicidade de fármacos, conferindo vantagens adaptativas à célula (Vogelstein *et al.*, 2013).

A resistência a quimioterápicos é geralmente classificada por resistência intrínseca ou resistência adquirida. A resistência intrínseca aponta a existência de fatores de resistência nas células tumorais previamente ao tratamento. Isso implica na seleção de uma minoria populacional resistente pré-existente no tumor original (Holohan *et al.*, 2013). Em contrapartida, na resistência adquirida, células inicialmente sensíveis, desenvolvem resistência a determinada droga durante a terapia (Goldie, 2001). Assim, a resistência adquirida é uma resposta adaptativa a quimio ou radioterapia, que pode ser decorrente de mutações ou de alterações epigenéticas geradoras de mecanismos como a diminuição da expressão do alvo terapêutico ou a ativação de uma via de sinalização compensatória à afetada pelo antineoplásico.

À nível molecular, evidências apontam que ambas classificações atuam, majoritariamente, nas mesmas vias - por exemplo, alta expressão de transportadores MDR está associada tanto à resistência intrínseca, quanto adaptativa (Tsuruo *et al.*, 2003). Além de redundantes, não se sabe quais os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de cada forma de resistência, nem se há distinção entre eles para cada uma das classificações (Haar *et al.*, 2012; Pisco e Huang, 2015).

1.2 Heterogeneidade intratumoral: a importância de estudos de resistência de células únicas

A tumorigênese é um processo raro e prolongado, pautado por sucessivas alterações genéticas que direcionam a conversão da célula normal em célula cancerosa. A geração dessas alterações genéticas ocorre de forma assimétrica entre as células que formarão o tumor, e podem acumular-se até produzir instabilidade genômica em meio às células mutadas. Assim, o tumor primário é composto por bilhões de células com diversos graus de sensibilidade a quimioterápicos: esta variabilidade é principalmente resultado da instabilidade genômica e de defeitos nos mecanismos de controle do ciclo celular (também associados com a proliferação descontrolada e aumento das alterações genéticas celulares) produzidos na tumorigênese (Hanahan e Weinberg, 2000). Ademais, fatores como a presença de zonas de nutrição e angiogênese diferenciadas dentro de um tumor, a infiltração de células normais e, a evolução clonal e a pressão seletiva positiva induzidas pela terapia, desempenham um importante papel

nessa heterogeneidade (Khoo *et al.*, 2016). Logo, a heterogeneidade tumoral é considerada um dos fatores relacionados com a resistência às terapias antineoplásicas e, recentes avanços tecnológicos começaram a revelar sua verdadeira extensão (Patel *et al.*, 2014). Variações tanto entre tumores como dentre um mesmo tumor já foram documentadas em diversos tipos tumorais, como de mama (Polyak, 2011), próstata (Brocks *et al.*, 2014), ovário (Lee *et al.*, 2015) e especialmente glioblastoma (Sottoriva *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014).

O elevado grau de heterogeneidade intratumoral, apresentado por esses tumores, pode explicar a presença de subpopulações celulares resistentes a quimioterápicos (Swanton, 2012). A heterogeneidade intratumoral é gerada pela expansão de subpopulações geneticamente distintas durante a progressão do tumor; no entanto, não é conhecido se as subpopulações resistentes são provenientes da expansão clonal de uma única subpopulação da massa tumoral ou se são derivadas de várias subpopulações diferentes (Kreso *et al.*, 2013). Desta forma, considerando o estudo da resposta crônica de linhagens de glioma a TMZ supracitado, que estratégia utilizar para estudar a parcela ínfima de células residuais resistentes a TMZ e, desvendar se tais células sobreviventes pertencem a mesma subpopulação?

Conceitualmente, as células funcionam como unidades individuais ou organizadas em tecidos e órgãos. Apesar da aparente sincronia nos sistemas celulares, cada célula tem um comportamento único e exclusivo, que está de acordo com fatores genéticos, ambientais, além do ritmo individual da célula em processos cíclicos e metabólicos. Já foi mostrado, inclusive, que a heterogeneidade celular pode ocorrer mesmo em células irmãs recém-divididas (Spencer *et al.*, 2009). Nosso grupo já demonstrou, em um estudo de células únicas, que tratamentos quimioterápicos podem induzir autofagia e senescência de forma dessincronizada entre células de uma mesma linhagem tumoral (Filippi-Chiela *et al.*, 2015). Dessa maneira, os estudos de resistência tumoral que levam em conta análises populacionais de amostras podem mascarar características determinantes em células únicas ou tipos celulares, limitando nossa capacidade de compreender e desenvolver tratamentos para as células tumorais de maneira eficaz. Análises de células únicas têm emergido como uma importante estratégia para circunvir essas limitações, tornando possível observar variações na biologia tumoral individual das células, tais como morfologia celular, composição genética e expressão gênica ou proteômica (Khoo *et al.*, 2016). Nesse contexto, a análise de ensaios de colônias originadas de células únicas pode representar uma nova estratégia metodológica a ser empregada no estudo da variabilidade de resposta de células únicas a quimioterápicos.

1.3 Análise de colônias originadas de células únicas como estratégia para estudos de resistência à quimioterápicos

Em tese, uma colônia gerada *in vitro* a partir de célula única deveria ser composta por células-filhas genética e fenotipicamente idênticas à célula de origem, partindo do princípio que a carga genética das células-filhas seja conservada ao longo das divisões celulares e que este genótipo segregado determine a semelhança do fenótipo de todas as células componentes de uma mesma colônia (Khare e Shaulsky, 2006). Desta forma, considerando a situação hipotética de um tratamento que seja capaz de eliminar 50% da população celular, se alterações genéticas estáveis e herdáveis forem responsáveis pelo fenótipo resistente, esperaria-se uma resposta homogênea dos clones: 50% das colônias seriam eliminadas por este tratamento e os restantes 50%, seriam resistentes. As colônias resistentes sobreviveriam uniformemente a terapia, enquanto o total de células das colônias sensíveis seria eliminado: essa resposta é considerada clonal.

Essa concepção baseia-se no esquema de evolução somática Darwiniana, que propõe que a inovação fenotípica de uma célula - seja a aquisição de uma “hallmark” do câncer ou de resistência- é resultante unicamente e diretamente de uma mutação ou do acúmulo de mutações genômicas previamente à terapia, a qual selecionaria apenas as células mutantes aptas a sobreviver a uma situação adversa (Pisco e Huang, 2015). Dados de sequenciamento de nova geração fortalecem esse modelo, mostrando que o tumor recorrente conserva alterações genômicas-chaves do tumor primário, o que indica um padrão de evolução majoritariamente clonal (Kim *et al.*, 2015). Entretanto, mesmo para tais estudos, ainda não está claro se a resistência emerge de alterações genômicas pré-existentes ou mutações *de novo*, em parte, devido aos limites de resolução do sequenciamento de nova geração, que podem subestimar a diversidade do tumor (Bhang *et al.*, 2015; Khoo *et al.*, 2016).

Em adição, dados prévios do nosso grupo e da literatura, mostram que esse paradigma é confrontado por evidências de restauração da sensibilidade em células previamente resistentes a tratamentos após a remoção da pressão seletiva em cultura e na clínica (Riely *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). Ademais, a maioria dos protocolos para seleção de células resistentes, requer a exposição permanente ao agente quimioterápico (Mcdermott *et al.*, 2014), fato que se contrapõe fortemente ao conceito de aquisição de um fenótipo resistente estável transmitido pelas próximas gerações. Essa condição experimental também não é condizente com a realidade: o regime terapêutico clínico é pautado por intervalos sem administração do quimioterápico, logo, as células selecionadas *in vitro* pelo protocolo podem não ser

representativas da resistência desenvolvida pelo paciente. À parte dos mecanismos genéticos de resistência já mencionados, processos como remodelamento de vias de sinalização de proliferação e de morte celular (Sergina *et al.*, 2007), alterações epigenéticas (Sharma *et al.*, 2010) e influência do microambiente tumoral (Bissell e Labarge, 2005) podem produzir fenótipos heterogêneos em células com genótipos idênticos.

Considerando tais observações, levanta-se a hipótese de que a instabilidade fenotípica pode modular o processo de resistência. Assim, retomando o exemplo anteriormente citado, utilizando-se do mesmo tratamento capaz de eliminar 50% da população celular, as colônias poderiam responder, também, de forma heterogênea, com a eliminação de 50% das células de cada uma das colônias formadas, resultando novamente em uma eficácia de 50%. Imagina-se uma única colônia dividida entre subpopulações de células de fenótipo resistentes, selecionadas pelo tratamento, e subpopulações fenotipicamente sensíveis, eliminadas pelo tratamento: esse caso é denominado de resistência subclonal.

1.4 Hipóteses de origem de resistência subclonal

A hipotética resistência heterogênea de uma mesma colônia pode ser resultante de alterações fenotípicas, genéticas e epigenéticas, induzidas pelo próprio fármaco que confere a estas a capacidade de sobreviver à presença da droga. Já foi demonstrado que um estresse citotóxico subletal, pode induzir um estado fenotípico resistente nas células tumorais residuais *a priori* não resistentes (Ciocca *et al.*, 1992). De fato, há inúmeros trabalhos na literatura que relacionam quimioterápicos com indução de um fenótipo resistente ou de células-tronco tumorais (CSC)(Ciocca *et al.*, 1992; Kavallaris *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2010; Ghisolfi *et al.*, 2012; Rosenzweig, 2012; Abubaker *et al.*, 2013). Variados casos indicam que alterações genéticas não são suficientes para conduzir a resistência de células tumorais, mas, aliadas a processos não-genéticos, induzem resistência (Kavallaris *et al.*, 2001).

Células tumorais apresentam um status epigenético instável capaz de regular processos de reprogramação de células tumorais diferenciadas (mais sensíveis à terapia) para células-tronco tumorais (CSC – mais resistentes). Define-se por epigenética, todos aqueles mecanismos que não provocam diretamente alterações na estrutura sequencial de bases do DNA - como metilação do DNA genômico, modificações das histonas e regulação de mRNAs - que geram o remodelamento da cromatina, interferindo na acessibilidade de regiões do DNA na transcrição gênica (Berdasco e Esteller, 2010). Essas modificações, na organização da

cromatina, garantem a herdabilidade de estados transcricionais responsáveis pela manutenção de um fenótipo durante uma condição (Vogel e Lassmann, 2014). No entanto, esse processo é reversível: assim, uma célula pode adquirir múltiplos estados fenotípicos funcionais, produzidos pelo mesmo genoma, em resposta a uma condição (Pisco e Huang, 2015). A exposição a uma determinada condição terapêutica pode agir como um fator exógeno, adicionando variabilidade de resposta dentro de uma mesma colônia originada por célula única. Ademais, células-tronco tumorais possuem a capacidade de, por meio de uma única divisão celular assimétrica, se auto-renovar e concomitantemente produzir uma célula diferenciada, originando uma subpopulação fenotipicamente distinta dentro de uma mesma colônia (Morrison e Kimble, 2006).

Por fim, cada divisão celular torna possível a ocorrência de uma ou mais situações descritas acima e, o número crescente de divisões pelas quais as células tumorais componentes da mesma colônia passam, pode aumentar a instabilidade genética de cada uma. Por consequência, quanto maior a colônia, maior a possibilidade de surgimento de heterogeneidade inter-células e maior a variabilidade de fenótipos. Diante dessa hipótese, outra forma de averiguar a instabilidade da resistência, pode ser meio da medida do acúmulo de alterações durante as divisões celulares no período de formação da colônia, que pode dar origem à subpopulações dentro de uma mesma colônia gerada a partir de célula única. Não há referências na literatura sobre a instabilidade fenotípica da resistência ao longo das gerações.

Portanto, considerando a existência de diversas possíveis formas de resistência, torna-se fundamental conhecer a frequência de eventos de resposta clonal ou subclonal em colônias originadas de célula única e, principalmente, averiguar o nível de influência de características intrínsecas estáveis, e de processos produtores de fenótipos instáveis, como modulações epigenéticas e reprogramação celular, na geração de resistência.

2. JUSTIFICATIVA

A resistência à terapia é hoje um dos maiores obstáculos no tratamento e na pesquisa de propostas terapêuticas para diversos tipos de câncer. Frente ao alto grau de complexidade e de heterogeneidade dos tumores, o insucesso das terapias de aplicação clínica parece ser decorrente da capacidade de resistência e sobrevivência apresentada por uma pequena parte das células tumorais que, eventualmente, acaba levando à recorrência da doença. A observação da heterogeneidade de resposta a nível de célula única, portanto, pode ser

determinante para compreender os eventos de resistência e recidiva tumoral, já que a porcentagem não-responsiva do tumor é representada por uma parcela ínfima da população tumoral original.

Apesar de a divisão celular produzir duas cópias geneticamente idênticas, evidências apontam que células-irmãs podem diferir fenotipicamente, caso já descrito para processos como senescência, autofagia (Filippi-Chiela *et al.*, 2015), apoptose (Spencer *et al.*, 2009) e ciclo celular (Sandler *et al.*, 2015). Assim, levanta-se a hipótese de que células-irmãs possam responder heterogeneamente aos tratamentos antineoplásicos. As principais evidências que sustentam essa hipótese são:

1. A tumorigênese e a progressão tumoral compreendem a expansão de uma célula malignizada que, no entanto, é capaz de formar uma massa tumoral heterogênea, que responde de forma assimétrica a um tratamento (Gerlinger *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2016);
2. A restauração da sensibilidade em células previamente resistentes a tratamentos relatada *in vitro* e na clínica, após a remoção da pressão seletiva (Riely *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012);
3. A necessidade de exposição permanente ao agente quimioterápico em protocolos com a finalidade de seleção de células resistentes (Mcdermott *et al.*, 2014).
4. A falta de eficácia de terapias molecularmente direcionadas para alvos classicamente associados à resistência, como bombas de efluxo (Binkhathlan e Lavasanifar, 2013) e enzimas de reparo (Watson *et al.*, 2010).

Com relação às observações mencionadas, o presente trabalho tem o propósito de compreender a origem da subpopulação tumoral resistente e verificar a homogeneidade de resposta a quimioterápicos entre e, principalmente, dentro de colônias originadas de células únicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de resposta clonal *in vitro* a quimioterápicos em linhagens tumorais, avaliando a heterogeneidade do efeito destes a partir de colônias originadas de células únicas.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de resposta heterogênea de colônias originadas de células únicas a tratamentos quimioterápicos;
- Se observado heterogeneidade de resposta dentro de uma colônia originada de célula única, verificar se há correlação entre os eventos de resistência subclonal e diferentes linhagens celulares e/ou tratamentos;
- Verificar se ocorrem alterações no mecanismo de proliferação celular, a nível clonal, após tratamentos quimioterápicos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

ESTUDO DA RESPOSTA *IN VITRO* A TRATAMENTOS QUIMIOTERÁPICOS EM LINHAGENS TUMORAIS A PARTIR DE COLÔNIAS ORIGINADAS DE CÉLULAS ÚNICAS

Este artigo será submetido à revista Cell Proliferation.

Eloisa Dalsin¹; Andrew Oliveira Silva¹; Guido Lenz¹

¹ Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Autor Correspondente: lenz@ufrgs.br

Departamento de Biofísica, Rua Bento Gonçalves, 9500
Prédio 43431 – Lab. 115
91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo

Objetivo: A sensibilidade *in vitro* a terapias antineoplásicas correlaciona-se pouco com a eficácia clínica em pacientes oncológicos, devido à sobrevivência de uma parcela ínfima de células tumorais resistentes que, eventualmente, levam a recorrência. Análises de célula-única, portanto, podem ser determinantes para a compreensão da resistência. Assim, o objetivo do trabalho é analisar o perfil de resposta clonal *in vitro* a quimioterápicos em linhagens tumorais, avaliando a heterogeneidade do efeito destes a partir de colônias originadas de células únicas.

Materiais e Métodos: Células das linhagens U343 e U251 foram fotografadas diariamente até a formação de colônias compostas por 1 a 16 células ou, mantidas em cultura pelo tempo médio correspondente à formação de colônias de 50 células, calculado a partir de dados de Population Doubling (PD). O número de células plaqueadas foi baseado em dados prévios de eficiência clonogênica. Colônias formadas foram fotografadas e, em seguida, tratadas por três e cinco dias com Temozolomina (TMZ) e drogas adjuvantes (Mebendazol – MBZ, Vimblastina – VBL, Paclitaxel – PTX, Lomustina – CCNU e Cisplatina – CPT) nas suas doses plasmáticas. Após os tratamentos, as colônias foram fotografadas regularmente até o limite máximo do campo de captação da imagem. Dados morfométricos das colônias foram obtidos pelo programa ImageProPlus para a análise da área, do número de células e da densidade das colônias ao longo do tempo.

Resultados: Foi registrada a seleção de sub-regiões celulares resistentes, com taxas de crescimento aparente distintas, dentro de colônias originadas de células únicas, principalmente após tratamento com VBL e MBZ: esse evento foi denominado de resistência subclonal. Todas as drogas testadas em U251 apresentaram a ocorrência de resistência subclonal, exceto PTX. Em U343, a maioria das colônias proliferativas são homoganeamente resistentes, embora tenham sido observados dois casos de resistência subclonal dentre seis colônias resistentes a VBL.

Conclusão: Como conclusão, acreditava-se que uma colônia gerada a partir de célula única seria composta por células fenotípica e genotipicamente idênticas entre si e assim, responderia de forma homogênea aos quimioterápicos. No entanto, foi observado que, dentro de uma mesma colônia, a resposta a quimioterápicos também pode ser heterogênea, o que evidencia que o crescimento populacional da colônia pode não expressar uma uniformidade de fenótipo. Os dados reforçam que, mesmo dentre clones, a resposta de células-únicas pode ser o ponto decisivo para a resistência e o reestabelecimento do tumor.

Palavras-Chave: Glioma, Resistência, Colônias Originadas de Células Únicas, Temozolomida.

Abreviações: TMZ, Temozolomida; MBZ, Mebendazol; VBL, Vimblastina; PTX, Paclitaxel; CCNU, Lomustina; CPT, Cisplatina; Cumulative Population Doubling, CPD; Population Doubling, PD; Cumulative Area Doubling, CAD; Area Doubling, AD; ICA, Índice de Crescimento Antes do Tratamento; ICD, Índice de Crescimento Durante o Tratamento; ICP, Índice de Crescimento Posteriormente ao Tratamento; CSC, células-tronco tumorais.

1. Introdução

Quimioterapia é um dos principais métodos empregados para tratamento de pacientes oncológicos, porém, pode apresentar eficácia clínica limitada, devido ao desenvolvimento de resistência (Holohan *et al.*, 2013). Dados prévios de ensaios crônicos de proliferação celular mostram que linhagens de glioma tratadas com o quimioterápico de escolha para tratamento de glioblastoma (Temozolomida - TMZ), na sua dose plasmática (50 μ M), comportam-se de maneira semelhante aos relatos clínicos (Silva A.O. *et al.*, - dados submetidos para Experimental Cell Research, 2016). Inicialmente, todas as linhagens demonstram uma resposta satisfatória até o 12º dia, seguida de um crescimento progressivo da população celular sobrevivente. Independente da sensibilidade inicial, houve a manutenção de subpopulações com capacidade proliferativa após a terapia com TMZ, corroborando com dados da clínica que mostram uma redução inicial do volume tumoral acompanhado de uma posterior progressão do tumor (Van Meir *et al.*, 2010). Salienta-se que tais dados foram gerados a partir de uma análise populacional, cujos resultados são baseados em uma média de milhares de células, que podem mascarar qualquer heterogeneidade de resposta a nível de célula única.

São documentados inúmeros mecanismos de resistência a quimioterápicos, como o aumento da expressão de proteínas envolvidas no processo de efluxo de drogas (Gottesman *et al.*, 2002) e de proteínas anti-apoptóticas (Shi *et al.*, 2010), além da modulação dos sistemas de reparo de danos ao DNA (Kitange *et al.*, 2016, Perazzoli *et al.*, 2015). Estudos revelam que as alterações nesses mecanismos podem ser produto de translocações ou mutações genéticas estáveis, transmitidas de forma íntegra às gerações seguintes (Holohan *et al.*, 2013). Dentre os mecanismos de resistência à TMZ, o mais efetivo na reversão dos efeitos danosos induzidos pelo fármaco é a superexpressão da enzima de reparo *O*⁶-metilguanina DNA metil transferase (MGMT), que remove o grupamento alquil adicionado à guanina pela TMZ, prevenindo o mau pareamento com resíduos de timina durante a replicação do DNA (Fan *et al.*, 2013). Entretanto, terapias molecularmente direcionadas para esses alvos apresentam pouco impacto terapêutico, como documentado para inibidores de proteínas de efluxo (Binkhathlan *et al.*, 2013) ou para inibidores da enzima de reparo MGMT em gliomas resistentes à TMZ (Watson *et al.*, 2010).

Sabe-se que muitos tipos tumorais, especialmente glioblastoma, apresentam um elevado grau de heterogeneidade intratumoral, que pode explicar a presença de subpopulações celulares resistentes à terapia (Swanton, 2012). A heterogeneidade intratumoral é gerada pela expansão de subpopulações geneticamente distintas durante a progressão do tumor; no entanto, não é conhecido se as subpopulações resistentes são provenientes da expansão clonal de uma única subpopulação da massa tumoral ou se são

derivadas de várias subpopulações com capacidades distintas de resistência (Kreso *et al.*, 2013).

Conceitualmente, uma colônia gerada *in vitro* a partir de célula única é composta por células-filhas geneticamente e fenotipicamente idênticas à célula de origem, partindo do princípio que a carga genética das células-filhas seja conservada ao longo das divisões celulares e que este genótipo segregado determine a semelhança do fenótipo de todas as células componentes de uma mesma colônia (Khare *et al.*, 2006). Assim, considerando um tratamento que elimina 50% da população celular, se alterações genéticas estáveis e herdáveis forem responsáveis pelo fenótipo resistente, espera-se uma resposta homogênea dentro de uma colônia originada de célula única: 50% das colônias seriam totalmente eliminadas e as 50% restantes seriam totalmente resistentes ao tratamento.

Entretanto, esse paradigma é confrontado por evidências de restauração da sensibilidade em células previamente resistentes a tratamentos após a remoção da pressão seletiva em cultura e na clínica, somadas à necessidade de exposição permanente ao fármaco em protocolos de seleção de células resistentes *in vitro* (Riely *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2012, McDermott *et al.*, 2014). Apesar de a resistência genética ser extensamente descrita em tumores sólidos (Vogelstein *et al.*, 2013), processos como remodelamento de vias de sinalização de proliferação e de morte celular (Sergina *et al.*, 2007), alterações epigenéticas (Sharma *et al.*, 2010) e influência do microambiente tumoral (Bissell *et al.*, 2005) podem produzir fenótipos heterogêneos em células com genótipos idênticos. Considerando tais observações, levanta-se a hipótese de que a instabilidade fenotípica pode modular o processo da resistência. Assim, para o mesmo tratamento que elimina 50% da população celular, as colônias poderiam responder também de forma heterogênea, com eliminação de 50% das células de cada uma das colônias formadas, resultando novamente na eficácia de 50% do tratamento.

Portanto, considerando a existência de diversas possíveis formas de resistência, torna-se fundamental conhecer a frequência de eventos de resposta clonal ou subclonal em colônias originadas de célula única, a fim de traçar um perfil de resposta clonal de linhagens tumorais a quimioterápicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura de Células

As linhagens celulares de glioma (U251 e U343) foram adquiridas na Coleção Americana de Culturas de Tecido (ATCC, do inglês *American Tissue Cell Culture*). Todo material de cultura e reagentes foi adquirida da Gibco Laboratories (Grand Island, NY,

USA). As células foram cultivadas em meio DMEM, com baixa concentração de glicose e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de anfotericina B em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Os quimioterápicos TMZ e fármacos adjuvantes Mebendazol (MBZ), Vinblastina (VBL), Paclitaxel (PTX), Lomustina (CCNU) e Cisplatina (CPT) foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, Acros Organics, NJ, USA).

2.2. Ensaio de Formação de Colônias

Para análise da homogeneidade de resposta das colônias à quimioterápicos distintos, células das linhagens de glioma U343 e U251 foram semeadas e mantidas em cultura pelo tempo médio correspondente à formação de colônias de no mínimo 50 células (Franken *et al.*, 2006). O tempo necessário foi calculado a partir de ensaios prévios de *Cumulative Population Doubling* (CPD), que indicam o número de duplicações da população celular ao longo do tempo (Heiss *et al.*, 2007) (Fig. Suplementar 1SA e 1SB). O cálculo do número de células plaqueadas para a formação de cerca de 30 colônias por poço foi baseado em dados prévios de Eficiência Clonogênica (Fig. Suplementar 1SC). As colônias foram previamente fotografadas e tratadas por 5 dias com as respectivas drogas nas suas concentrações plasmáticas: TMZ (50 µM), Mebendazol (MBZ, 500 nM), Vinblastina (VBL, 5 nM), Paclitaxel (PTX, 1 µM) e Lomustina (CCNU, 35 µM). Micrografias foram adquiridas em microscópio invertido de fluorescência modelo Zeiss Axiovert 200.

Após o período de tratamento, as colônias em meio livre de quimioterápico foram fotografadas regularmente até o limite máximo do campo de captação da imagem e a quantificação da área absoluta das colônias foi obtida pelo programa Image ProPlus. Após os limites da colônia ultrapassarem os limites de captação das micrografias, a área relativa foi calculada através da medida do diâmetro das colônias. Os dados morfométricos foram utilizados para o cálculo do índice de duplicação de área (Area Doubling – AD) das colônias ao longo do tempo, obtido através da fórmula $AD = (\ln A(T_f) - \ln A(T_o)) / \ln 2$, sendo que $A(T_f)$ corresponde à área final de cada colônia no momento do registro da micrografia e $A(T_o)$, à área inicial da colônia no registro anterior. O número de células de cada colônia será obtido através de contagem utilizando o software ImageJ e o dado gerado foi usado para cálculo do índice de duplicação da população (Population Doubling – PD) das colônias ao longo do tempo, representado pela fórmula $PD = (\ln N(T_f) - \ln N(T_o)) / \ln 2$, sendo que $N(T_f)$ corresponde ao número final de células da colônia e $N(T_o)$, ao número de células da colônia no registro anterior. Número de células de colônias muito extensas ou densas foi estimado por regra de três simples. A densidade individual das colônias foi calculada a partir da relação entre os valores brutos de número de células e de área. As colônias resistentes

aos tratamentos foram qualitativamente classificadas entre colônias uniformemente resistentes aos tratamentos em sua extensão (resistência clonal) e, colônias parcialmente sensíveis, que se fragmentaram em sub-regiões compostas por células sobreviventes após os tratamentos quimioterápicos, evento chamado de resistência subclonal.

Para análise da velocidade de crescimento das colônias, imagens foram captadas pelo citômetro de células aderidas MiniMax 300 acoplado a plataforma de detecção Spectra Max I3 (Molecular Devices). Células da linhagem U251, U343 foram fotografadas diariamente até a formação de colônias de 1 a 4 células e de 4 a 16 células. A partir de então, foram tratadas com TMZ 50 μ M, MBZ 500 nM, VBL 5 nM e CPT 8,5 μ M por três dias e fotografadas regularmente. O número de células das colônias foi obtido para o cálculo da média de PDs/dia da colônia para três períodos: antes do tratamento (tempo varia de 1 a 2 dias), durante o tratamento (tempo fixo de 3 dias) e após o tratamento (4 a 6 dias após tratamento). Índices de Crescimento Antes (ICA), Durante (ICD) e Posteriormente (ICP) ao tratamento foram calculados pela respectiva fórmula: $IC = (PD_{1^{\circ} \text{ dia do período}} + \dots + PD_{\text{último dia do período}}) / N^{\circ} \text{ de dias do período}$.

3. Resultados

Com a finalidade de verificar a homogeneidade de efeito de quimioterápicos em colônias originadas de células únicas, células das linhagens de glioma U343 e U251 foram semeadas em baixa confluência e mantidas em cultura pelo tempo médio necessário para a formação de colônias de 50 células, calculado por meio de dados populacionais. O tempo estipulado para cada linhagem originou colônias em um amplo espectro de áreas (colônia que duplicaram a área de 2 a 4 vezes desde a célula inicial) (Fig. 1 e 3) e de número de células iniciais (entre 2 a 8 duplicações do número de células desde a célula única, ou seja, a formação de colônias pré-tratadas com número de 30 a 200 células) (Fig. 2 e 4), mostrando que cada célula única tem uma taxa de divisão celular particular, suprimida em análises populacionais. Após essa faixa de tempo, as colônias formadas foram tratadas por 5 dias com TMZ e drogas adjuvantes.

3.1 Colônias originadas de células únicas das linhagens U343 e U251 respondem diferentemente ao tratamento com TMZ

A maioria das colônias da linhagem U251 apresentou uma leve diminuição na área e no número de células entre um a seis dias após o tratamento com TMZ, posteriormente retomando uma taxa de AD e PD similar aos controles, que pode ser visualizada no gráfico ao se comparar a inclinação das retas referentes aos controles com as retas das colônias

tratadas (Fig. 1B. e 2A). Se compararmos com as micrografias controle, as colônias de U251 tratadas com TMZ apresentaram uma sensibilidade parcial, responsável pela redução da densidade celular da colônia, apesar de manter um valor de área semelhante ao controle (Fig. 1B).

Colônias da linhagem U343 apresentaram aumento gradativo na área das colônias após o tratamento com TMZ, entretanto, diferentemente do observada em colônias de U251, o número de células visualmente se mantinha bastante similar durante o período analisado (Fig. 3B e 4A). As micrografias mostram colônias formadas por células não proliferativas com morfologia senescente, bem distintas dos controles.

Outro agente alquilante testado, CCNU, apresentou efeitos similares aos descritos para TMZ nas duas linhagens testadas, porém, não foi eficaz na alteração da área, nem do número de células das colônias pós- tratamento (Fig. Suplementar 2SC e 3SC).

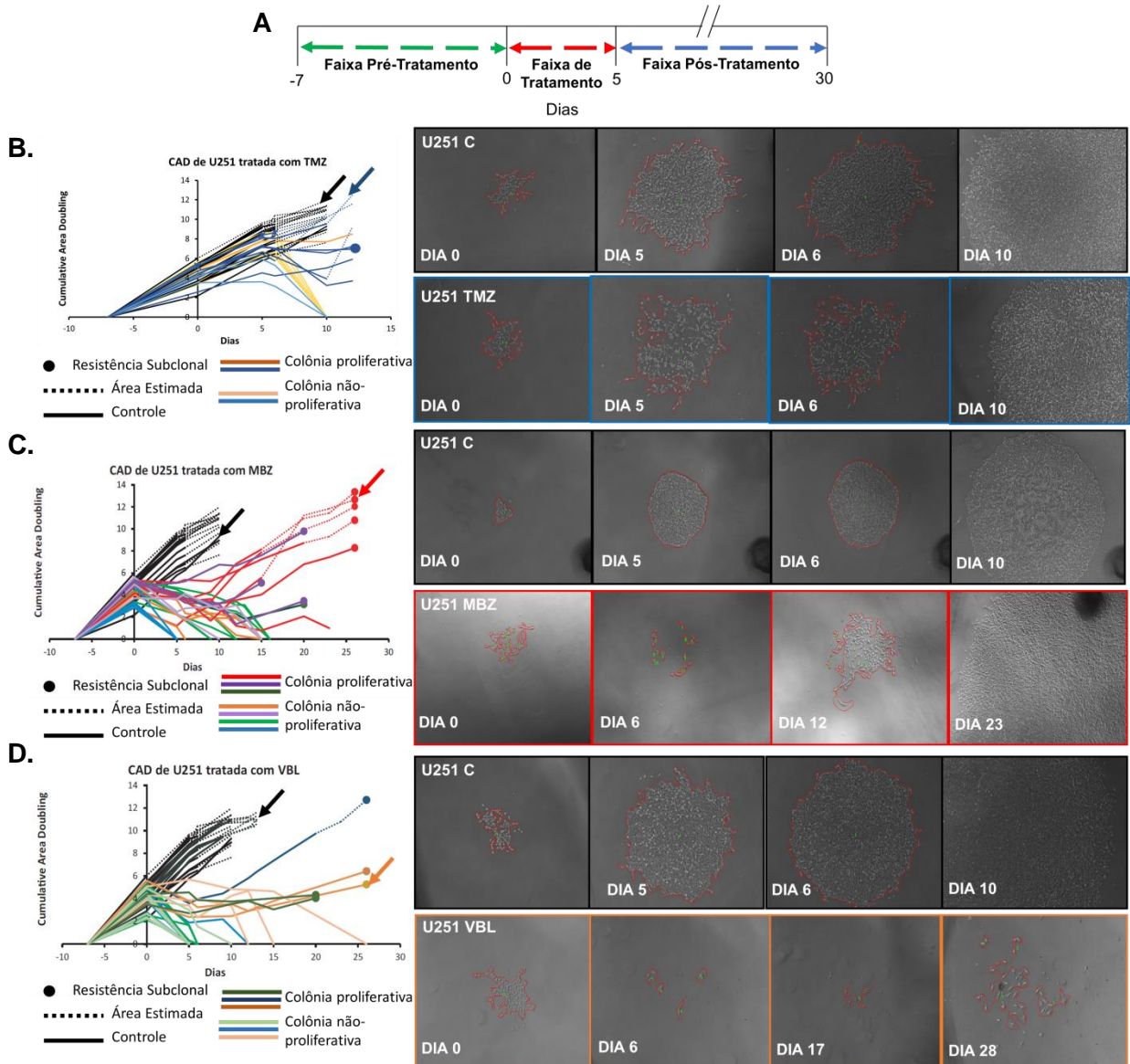


Figura 1. Cumulative Area Doubling (CAD) das Colônias da Linhagem U251 tratadas com TMZ, MBZ e VBL. (A) Células foram mantidas em cultura por sete dias, tratadas com quimioterápico correspondente por cinco dias e acompanhadas até que se mantivessem íntegras, conforme esquema. (B,C,D) Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como não-proliferativa e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como proliferativas. Essa classificação foi feita com base nas micrografias. As áreas estimadas foram obtidas quando os limites da colônia ultrapassavam os limites de captação das micrografias. No lado direito de cada quadro, uma sequência de micrografias representativa de cada população presente na análise. A evolução de CAD das micrografias representativas está apontada pelas setas pretas (controle) e coloridas (tratadas).

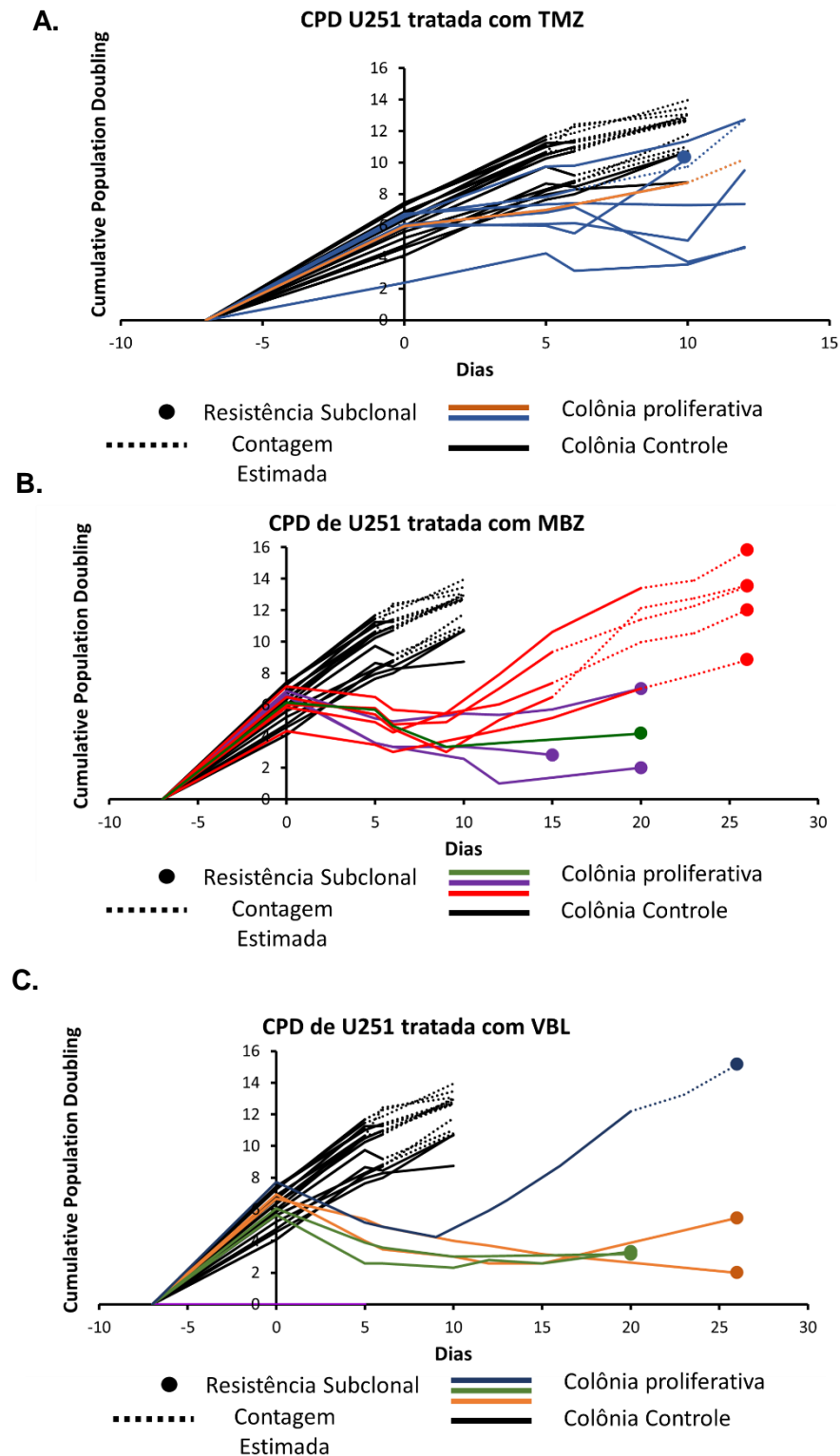


Figura 2. Cumulative Population Doubling (CPD) das Colônias com Aumento de Área da Linhagem U251 tratadas com TMZ, MBZ e VBL. Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como colônias com aumento de área não-proliferativo e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como com aumento de área proliferativo.

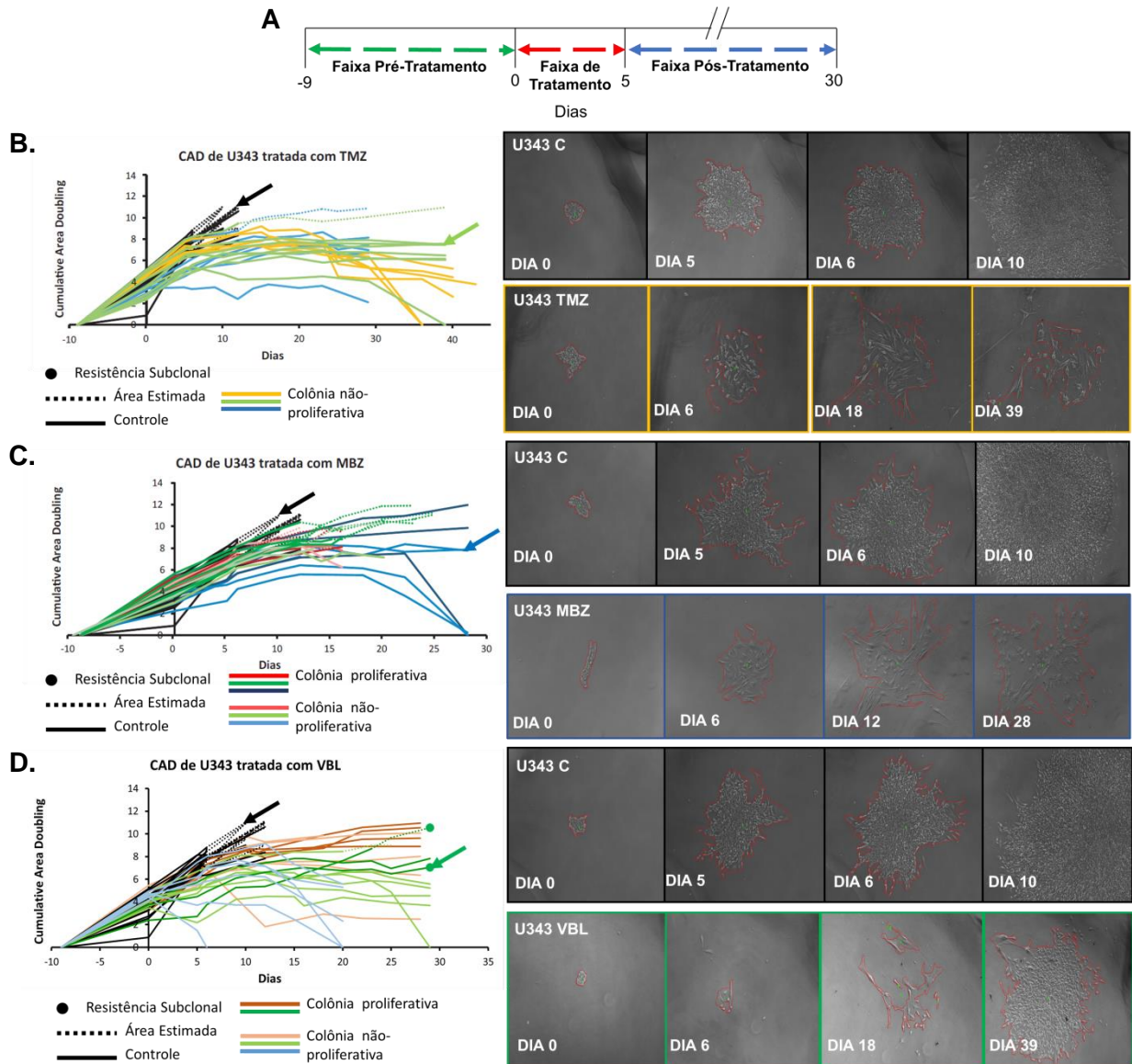


Figura 3. Cumulative Area Doubling (CAD) das Colônias da Linhagem U343 tratadas com TMZ, MBZ e VBL. (A) Células foram mantidas em cultura por sete dias, tratadas com quimioterápico correspondente por cinco dias e acompanhadas até que se mantivessem íntegras, conforme esquema. (B,C,D) Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como não-proliferativa e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como proliferativas. Essa classificação foi feita com base nas micrografias. As áreas estimadas foram obtidas quando os limites da colônia ultrapassavam os limites de captação das micrografias. No lado direito de cada quadro, uma sequência de micrografias representativa de cada população presente na análise. A evolução de CAD das micrografias representativas está apontada pelas setas pretas (controle) e coloridas (tratadas).

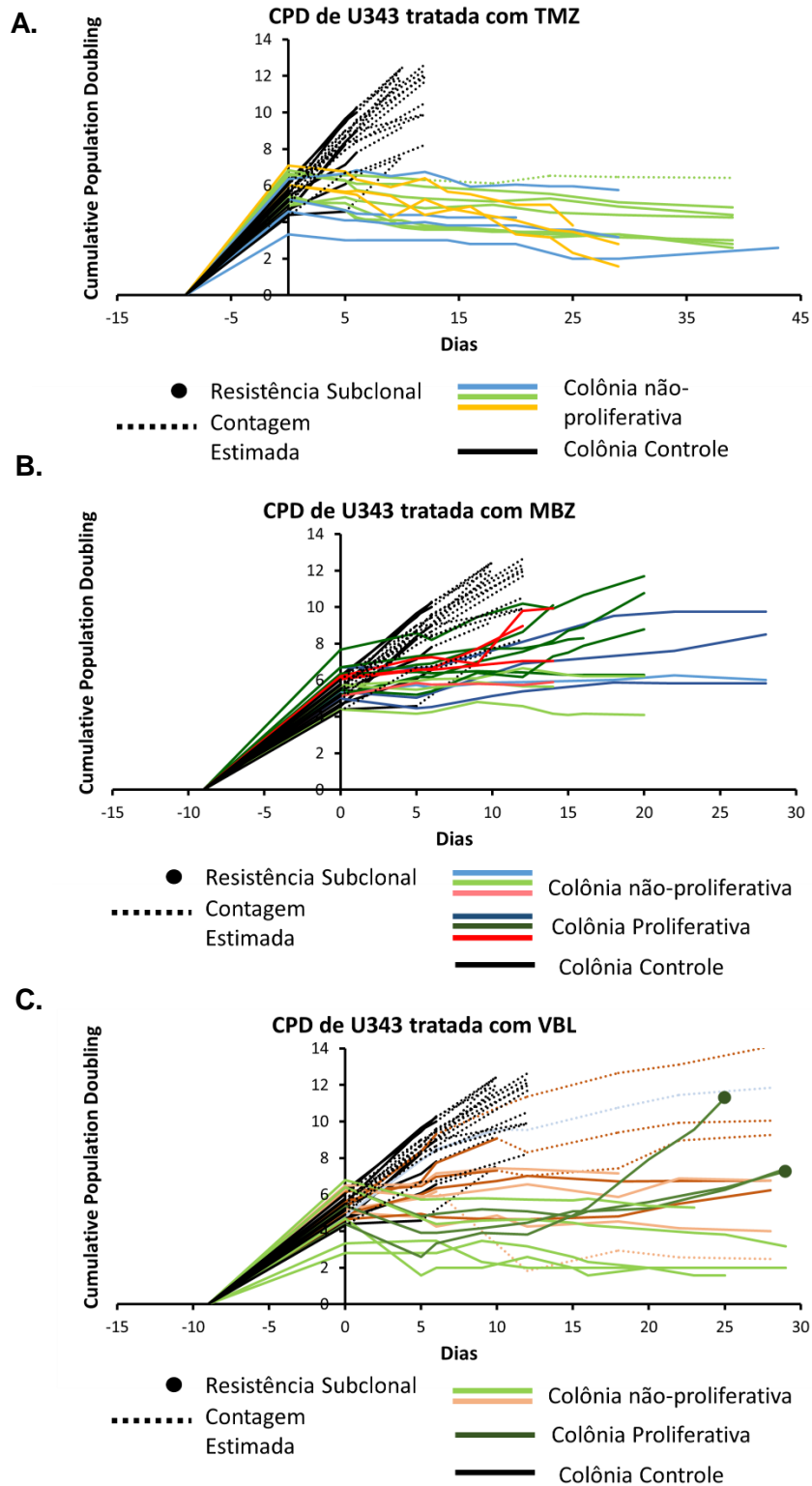


Figura 4. Cumulative Population Doubling (CPD) das Colônias com Aumento de Área da Linhagem U343 tratadas com TMZ, MBZ e VBL. Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como colônias com aumento de área não-proliferativo e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como com aumento de área proliferativo.

3.2 Colônias originadas de células únicas da linhagem U343, com aumento de área após tratamentos quimioterápicos, subdividem-se em colônias com aumento de área proliferativo e colônias com aumento de área não-proliferativo

Para as colônias de U343 tratadas com VBL, um inibidor de microtúbulos, distingue-se dois grupos: 1) colônias cuja área foi reduzida, refletindo o desencadeamento de mecanismos antiproliferativos (Fig. 5C) e outro subgrupo, 2) colônias com aumento progressivo de área, similar ao observado para o tratamento com TMZ (Fig. 5D e 5E). A análise das micrografias das colônias, ao longo do tempo, revelou que o subgrupo com expansão de área apresentava-se subdividido em: 2.a) colônias com número crescente de células ao longo do tempo (Fig. 5E) e 2.b) colônias em que o número de células se mantinha bastante similar durante período analisado após o tratamento, porém a área correspondente a cada uma das células da colônia aumentava ao longo da análise (Fig. 5D).

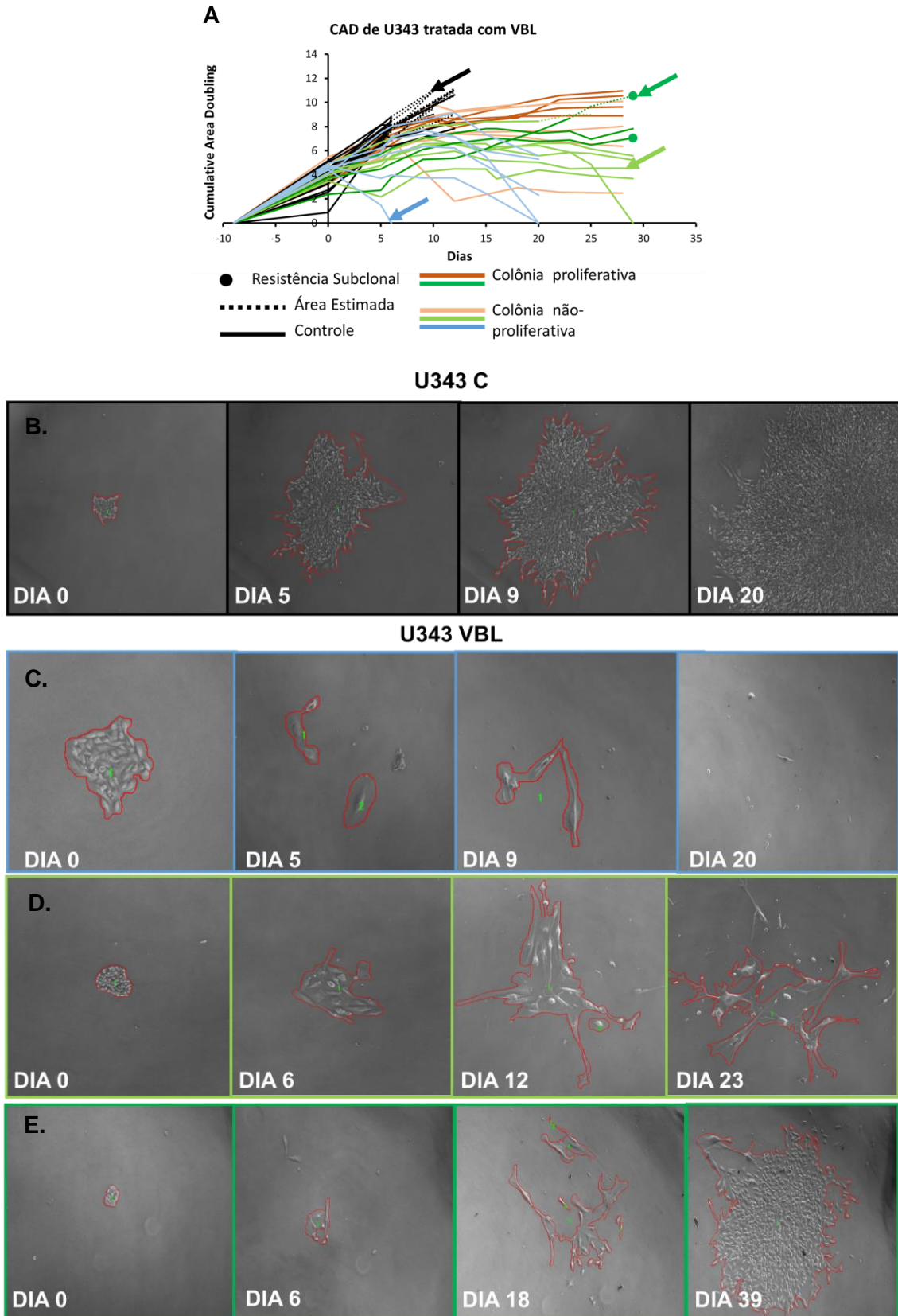


Figura 5. Cumulative Area Doubling (CAD) das Colônias da Linhagem U343 tratadas com VBL. (A) A evolução de CAD das micrografias representativas está apontada pelas setas pretas (controle) e coloridas (tratadas). Abaixo, uma sequência de micrografias representativa de cada população observada na análise: (B) Colônia Controle; (C) Colônia com redução de área; Colônias com aumento de área, subdivididas em: (D) com número constante de células; (E) com número crescente de células ao longo do tempo.

A fim de esclarecer esse viés, foi realizada a contagem do número de células das colônias com aumento de área (Fig. 4). A contagem do número de células ao longo do tempo confirmou a avaliação qualitativa, classificando o subgrupo com aumento progressivo de área em colônias com aumento de área proliferativo e em colônias com aumento de área não-proliferativo. Ainda para as colônias de U343, o tratamento com MBZ produziu efeitos bem parecidos aos de VBL, sendo que ambas drogas possuem mecanismo de ação bem similares (Fig. 3C).

Comprovou-se, ainda, que a medição da progressão das colônias ao longo do tempo através da área, pode gerar falsos positivos, como representado pelas colônias não proliferativas com expansão de área. Para uma análise mais detalhada, realizou-se o acompanhamento da densidade das colônias, que mostrou uma separação entre colônias de U343 não proliferativas com aumento de área (logo, pouco densas) e colônias proliferativas com aumento de área (muito densas) (Fig. 6). As colônias classificadas como não-proliferativas com aumento de área, mantiveram uma densidade abaixo de 5 após o tratamento (Fig. 6A). Para as colônias controle ou colônias altamente proliferativas, que alcançam o limiar de detecção do método de contagem ou de medição de área utilizados, a densidade também tende a ficar constante, mas predominantemente maior que 5 ao longo da análise: as limitações do método de contagem subestimam o número de células quando a colônia fica muito confluenta, assim, o número de células é estimado em proporção com a área da colônia, o que estabelece uma relação direta e constante entre as duas variáveis. Houve casos de colônias pouco densas mas proliferativas, que foram classificadas com base no crescimento celular observado nas micrografias (Fig. 6B e Fig.6C). Um maior tempo de análise culminaria no aumento da densidade de tais colônias.

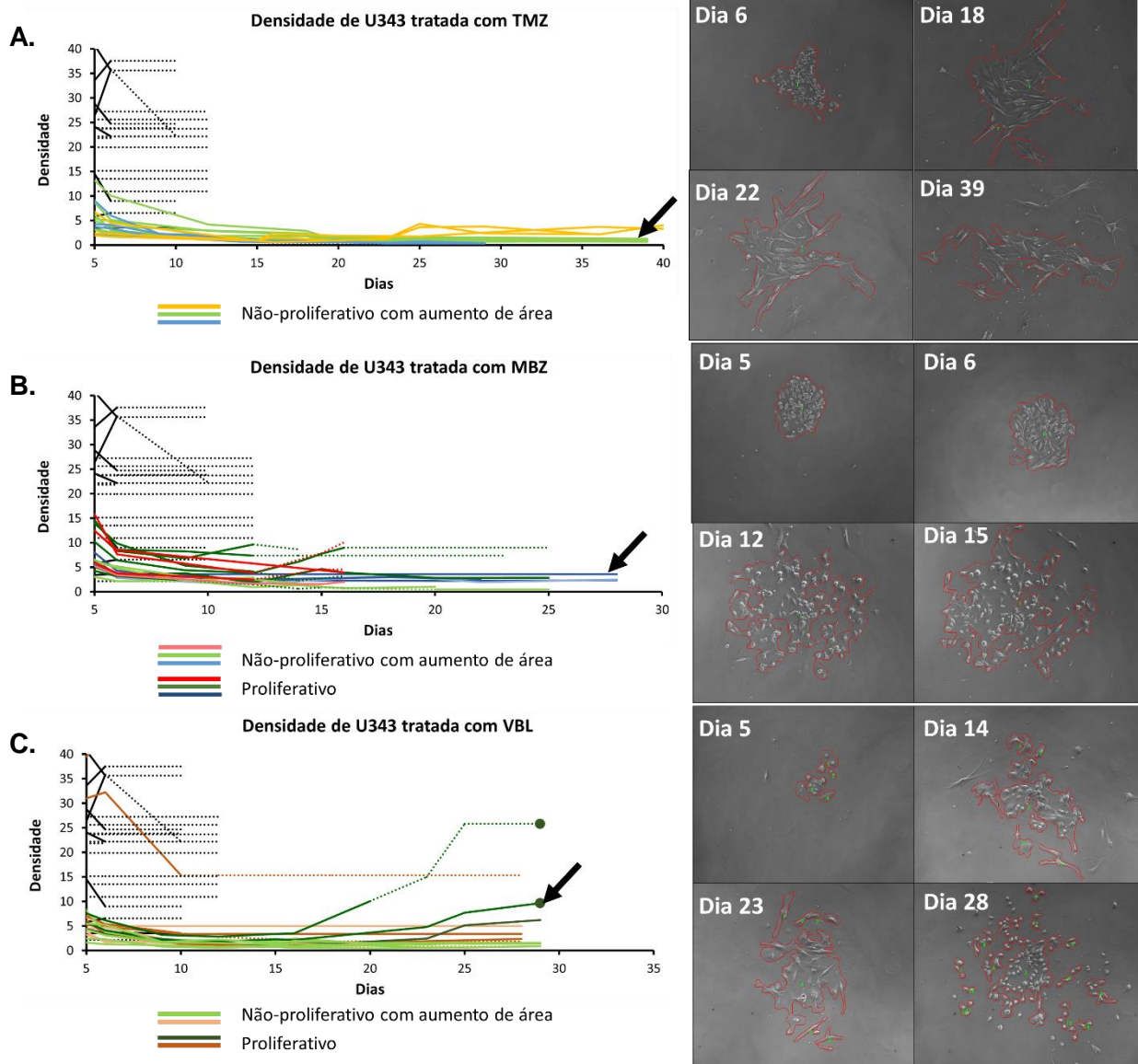


Figura 6. Evolução da Densidade das Colônias com Aumento de Área da Linhagem U342 após o tratamento com TMZ, MBZ e VBL. Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como colônias com aumento de área não-proliferativo e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como com aumento de área proliferativo. Linhas pontilhadas correspondem à densidade estimada. Seta indica evolução da densidade da colônia representativa, à direita. Marcador circular representa colônias parcialmente resistentes ao tratamento, evento denominado de resistência subclonal.

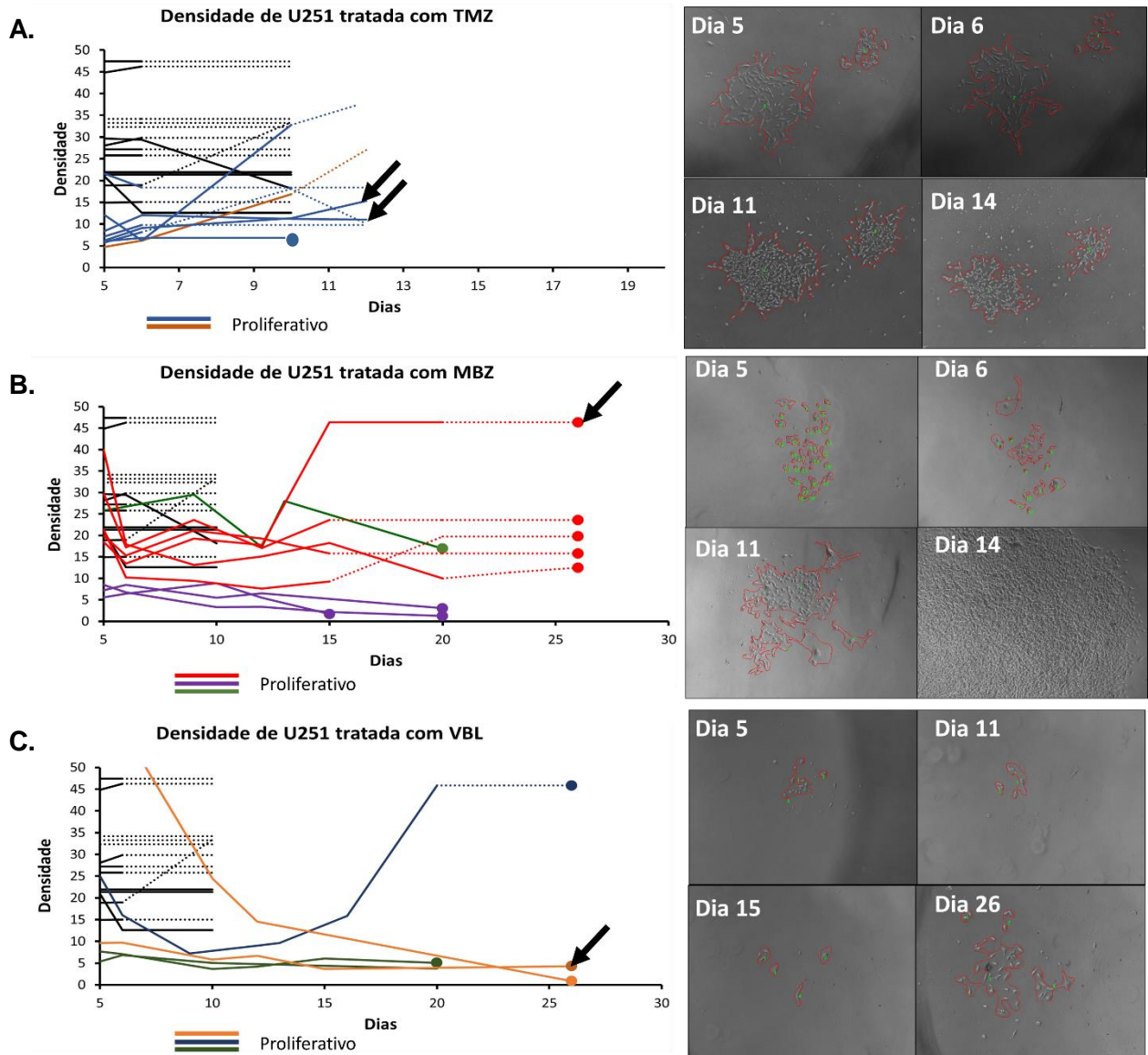


Figura 7. Evolução da Densidade das Colônias com Aumento de Área da Linhagem U251 após o tratamento com TMZ, MBZ e VBL. Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como colônias com aumento de área não-proliferativo e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como com aumento de área proliferativo. Linhas pontilhadas correspondem à densidade estimada. Seta indica evolução da densidade da colônia representativa, à direita. Marcador circular representa colônias parcialmente resistentes ao tratamento, evento denominado de resistência subclonal.

A linhagem U251, diferentemente de U343, não apresenta a subdivisão dentro do grupo de colônias com expansão gradual de área. A contagem do número de células das colônias com expansão de área indica que o aumento de área é proveniente de proliferação celular (Fig. 2). Para as duas linhagens, não parece haver uma tendência clara de maior sensibilidade ao quimioterápico em colônias intrinsecamente mais proliferativas no período de formação das colônias, nem dentre as menos proliferativas (Fig. 1, 2, 3 e 4). O tratamento com o anti-mitótico PTX na sua dose plasmática não apresentou nenhuma colônia resistente proliferativa tanto de U251 como de U343 (Fig. 2SC e 3SC).

3.3 Colônias originada de células única da linhagem U251 apresentam ocorrência de Resistência Subclonal aos tratamentos testados

Foram registradas casos de heterogeneidade de resposta dentro de colônias originadas de células únicas, nas quais o tratamento resultou na eliminação de grande parte das células componentes de uma colônia, acarretando o surgimento de subregiões compostas por células resistentes, evento que denominamos de Resistência Subclonal. Essa observação evidencia que, apesar da definição de que “uma colônia originada de célula única é constituída por clones da célula inicial”, a colônia pode não expressar uniformemente o fenótipo resistente.

Todas as colônias resistentes a VBL e a MBZ da linhagem U251 foram classificada como colônias contendo regiões de resistência subclonal (Fig. 1C, 1D e Fig. 2B, 2C). Para o tratamento com MBZ, observa-se colônias que reduzem sua área e seu número de células a partir do 5º dia pós-terapia, mas retomam sua expansão de área com aumento gradual no número de células, entre o 9º e 12º dia de análise, o que evidencia a expansão de populações subclonais (Fig. 8).

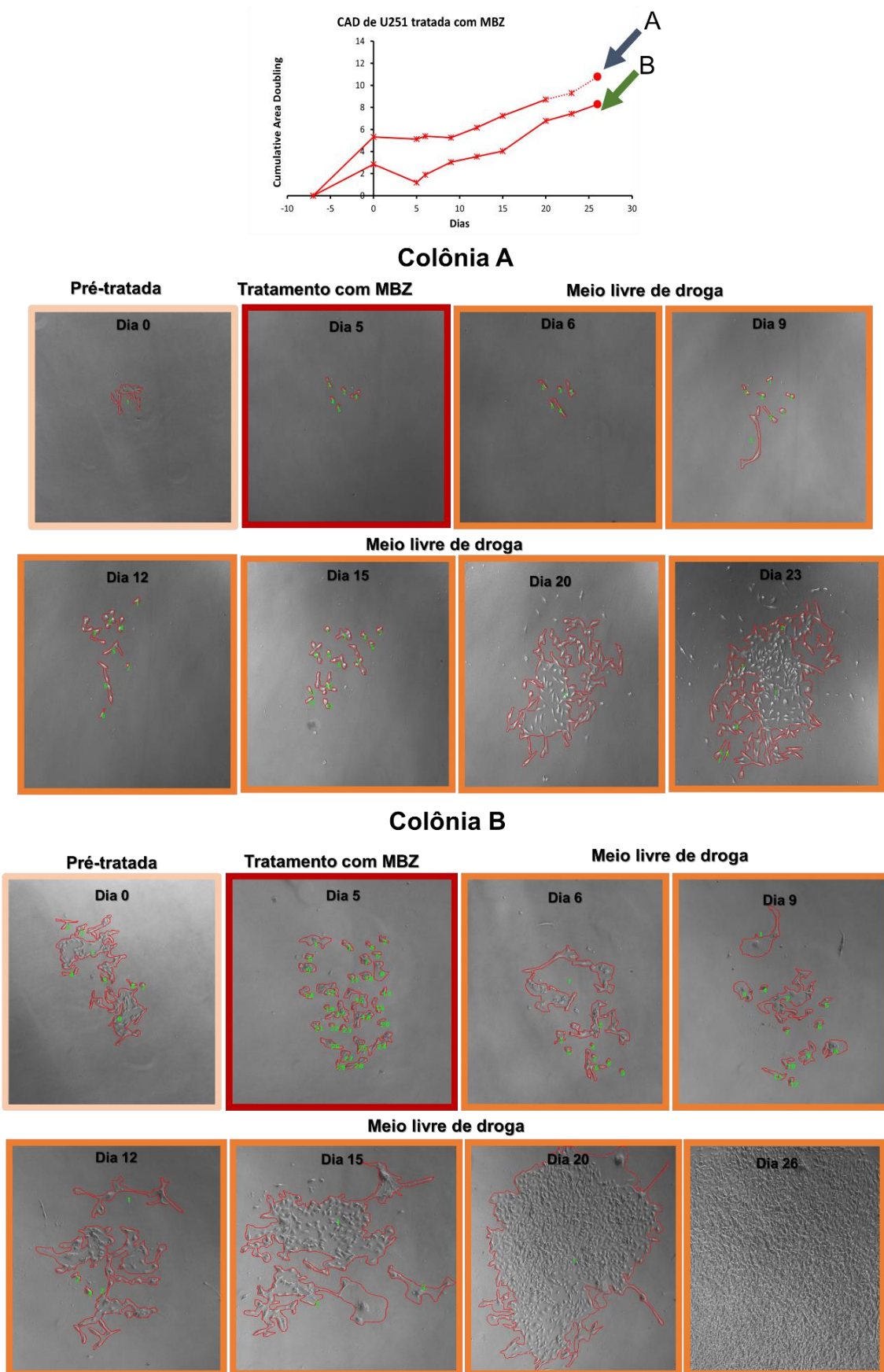


Figura 8. Colônias da linhagem U251 classificadas como de resistência subclonal após tratamento com MBZ. Acima, a evolução da área de cada exemplo ilustrado.

Este quadro pode ser melhor evidenciado através da análise de uma colônia específica de U251 tratada com VBL (Fig. 9): no 5º dia, observa-se a redução no número de células da colônia e manutenção de algumas células sobreviventes ao período de exposição à droga. Ao 9º dia, nota-se o surgimento de duas células com morfologia semelhante à de células senescentes. Possivelmente ambas as células são provenientes de algum(s) subclone(s) selecionados imediatamente após a remoção do quimioterápico. Ao longo do tempo, algumas subpopulações começam a se expandir, enquanto outras, aparentemente, permanecem não proliferativas. Se for observada a velocidade de proliferação de cada subclone, podem-se destacar quatro subpopulações com fenótipos diferentes: a subpopulação de células sensíveis a VBL, as subpopulações que originam as células com morfologia senescente e, por último, subpopulações com perfis de proliferação distintos (os subclones menos proliferativos e a subpopulação ressaltada em amarelo, que é a mais proliferativa e a maior responsável pela expansão final da colônia).

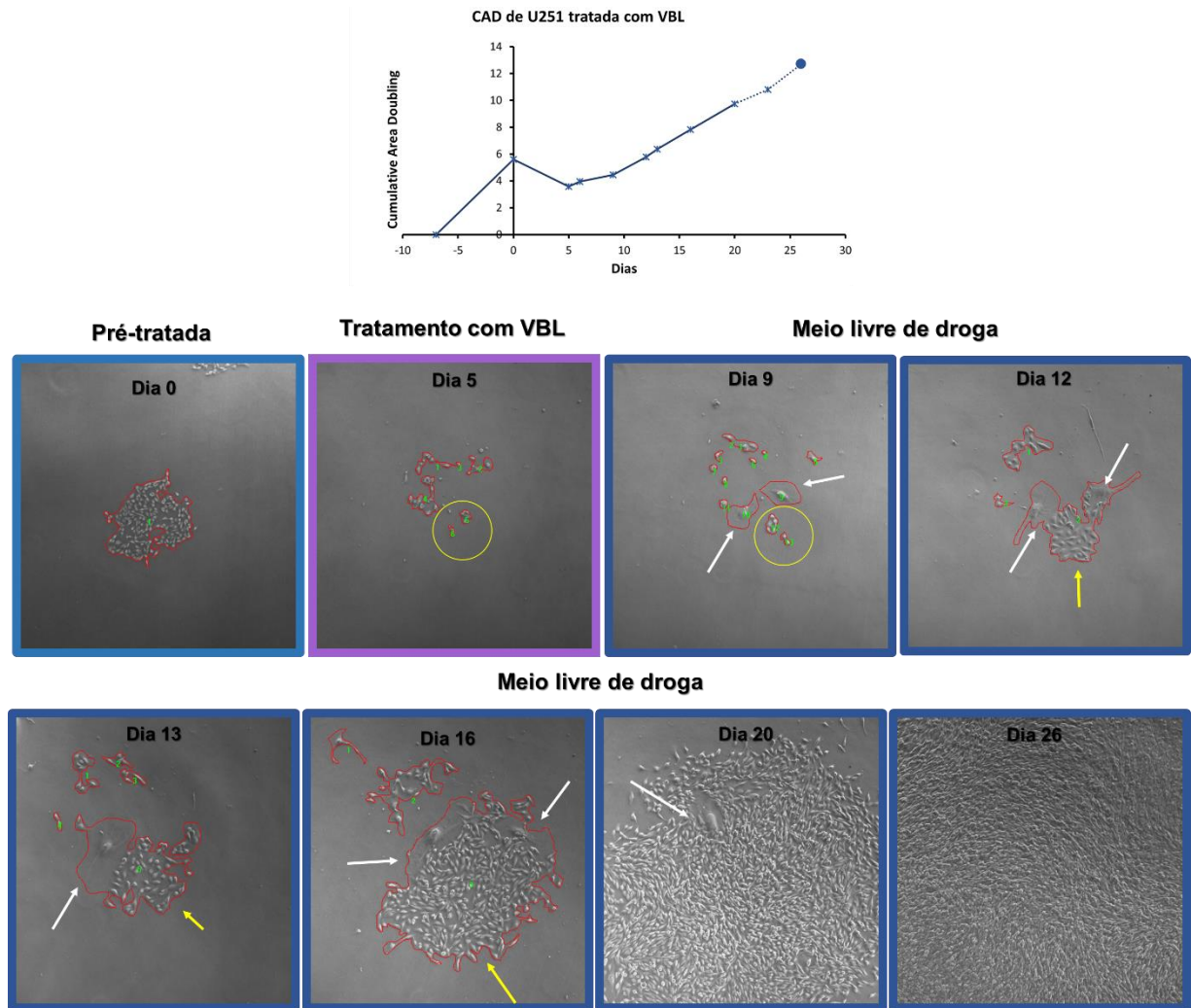


Figura 9. Colônia da linhagem U251 classificadas como de resistência subclonal após tratamento com VBL. Acima, a evolução da área do exemplo ilustrado. Setas apontam localização de células com morfologia senescente. Em amarelo, destaca-se populações subclonais com alta atividade proliferativa, que se distinguem das demais.

A análise de densidade das colônias da linhagem U251, após o tratamento, indicou uma diminuição da inicial da densidade para os tratamentos TMZ, MBZ e VBL. No entanto, para a maioria dos casos classificados como de resistência subclonal desenvolvidos por MBZ e VBL, a redução aguda na densidade da colônia foi seguida pelo aumento drástico entre o 12^o e 15^o dias de análise, que corrobora com a análise do número de células da colônia. Isso aponta uma sensibilidade parcial, seguido pelo repovoamento da colônia por subpopulações proliferativas (Fig. 7).

3.4 Colônias originadas de células únicas de U343 e U251 respondem diferentemente aos quimioterápicos testados

Em resumo, as linhagens U251 e U343 respondem de forma diferente aos tratamentos: U343 apresenta colônias com aumento de área sem proliferação celular, enquanto todas as colônias de U251 que apresentam células resistentes após o tratamento são proliferativas (Fig. 10A).

Todas as drogas testadas em U251 apresentaram a ocorrência de resistência de, pelo menos, uma fração da colônia, denominada de resistência subclonal, exceto PTX, que desencadeou morte celular em todas colônias (Fig. 10B). Em U343, a maioria das colônias proliferativas são homoganeamente resistentes, embora seja observada a ocorrência de 2 casos de resistência subclonal para VBL entre 6 colônias resistentes (Fig. 10C).

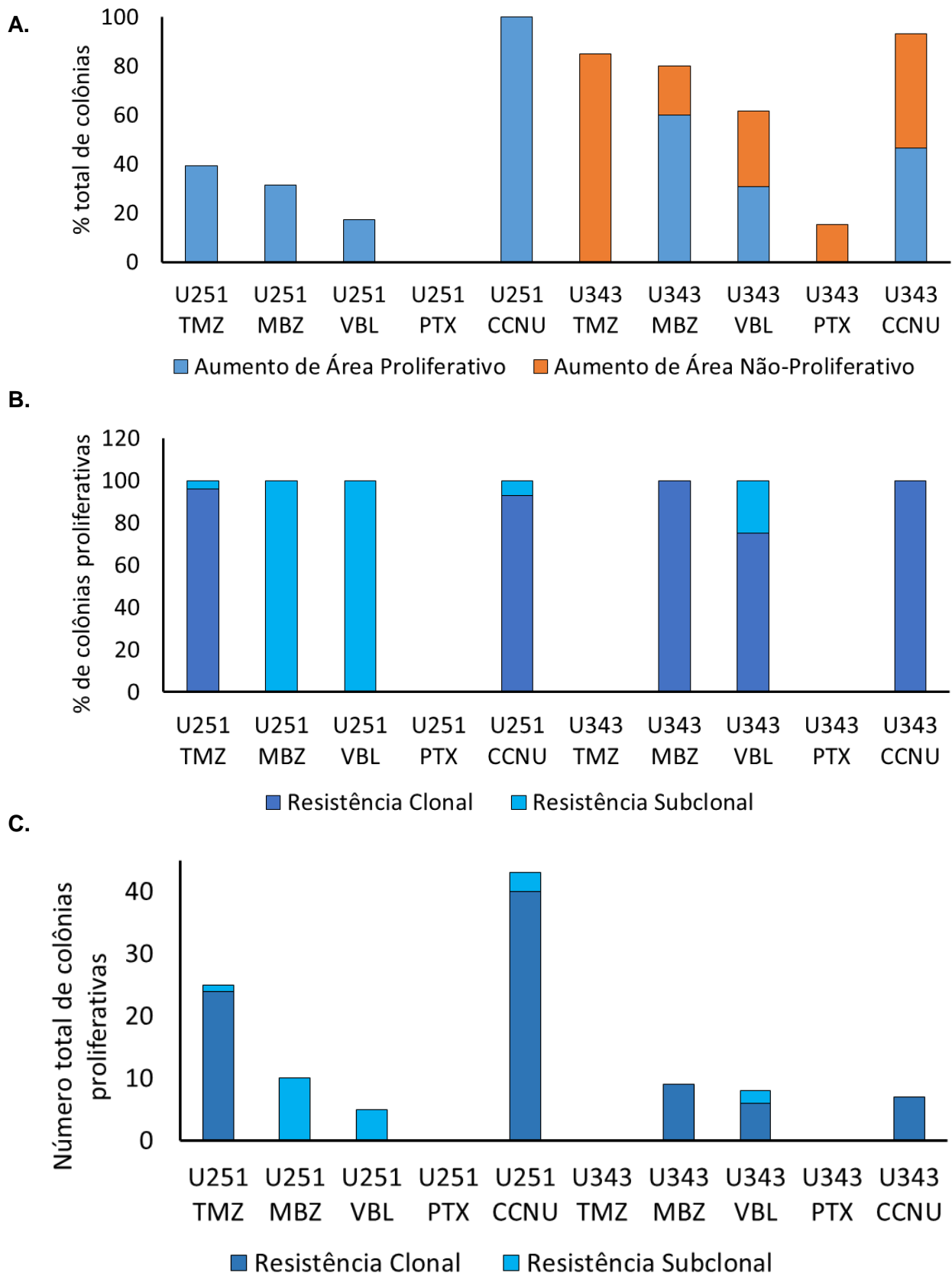


Figura 10. Perfil da resposta das colônias pós-tratamento. (A) Porcentagem de colônias com aumento de área. (B) e (C) Perfil de resistência das colônias pós-tratamento. Colônias com aumento de área proliferativo foram classificadas quanto ao tipo de resistência.

3.5 TMZ e CPT apresentam toxicidade tardia, enquanto MBZ e VBL apresentam citotoxicidade aguda em colônias da linhagem U251

Para verificar a dinâmica de resposta das colônias aos tratamentos, foi calculada a velocidade média de crescimento de cada colônia através do número de duplicação da população a cada dia, representado pela sigla PD/dia, para três períodos da análise: antes, durante e posteriormente ao tratamento (Fig. 11). Com a mesma finalidade, também foi feita a classificação das colônias quanto ao crescimento nos três períodos (Fig. 12).

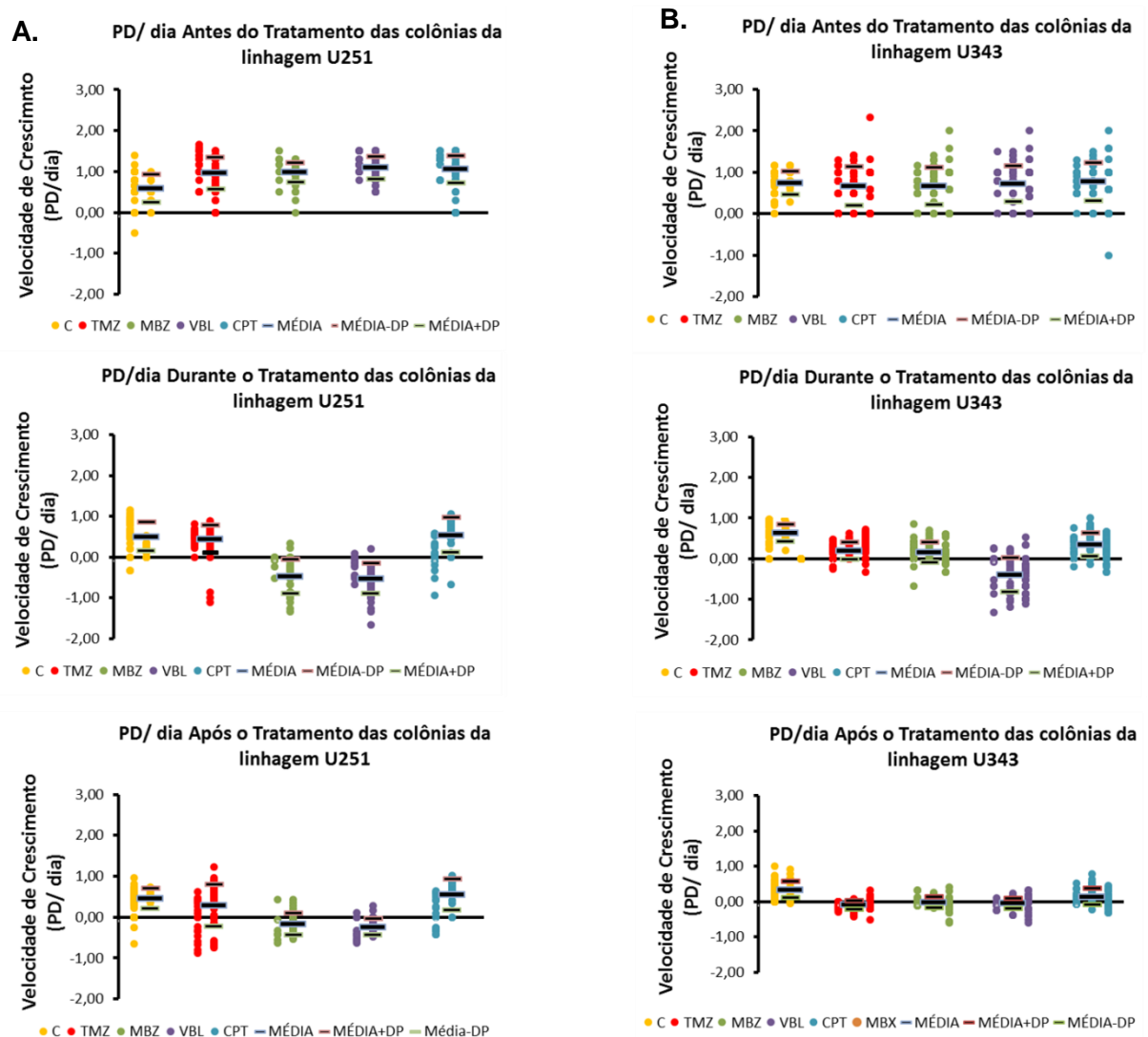
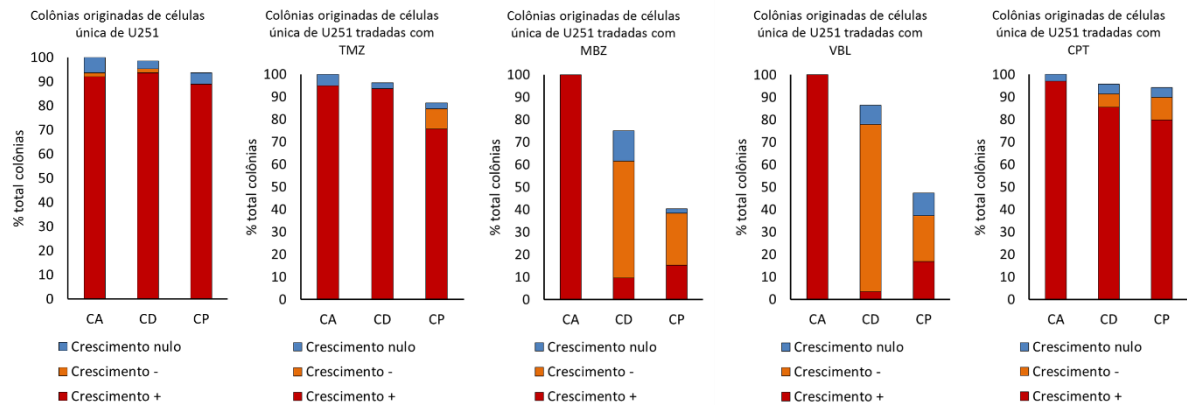


Figura 11. Velocidade de crescimento das colônias de U251 (A) e U343 (B) antes, durante e após tratamentos com TMZ, MBZ, VBL e CPT. Cada marcador circular representa uma colônia. As cores representam o tratamento testado, cujos experimentos independentes estão dispostos lado a lado, em fileiras, no eixo horizontal.

A.



B.

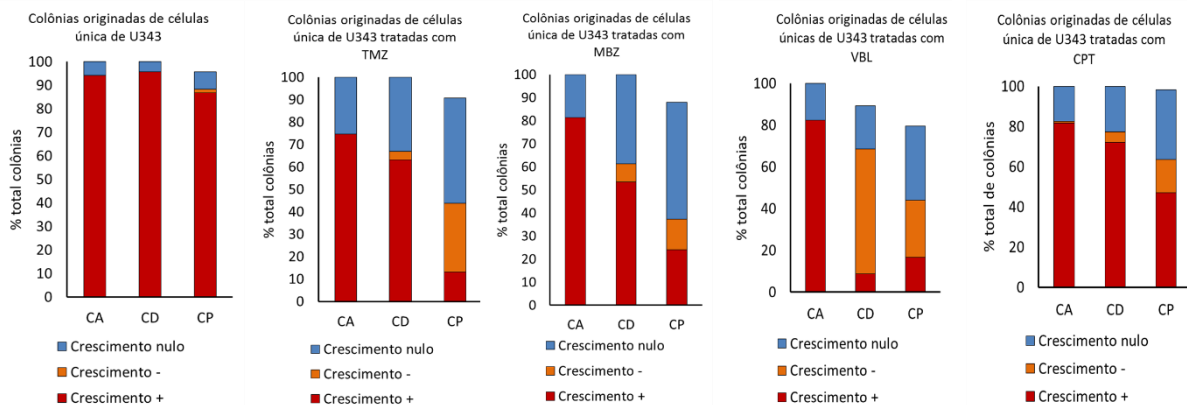


Figura 12. Dinâmica de resposta das colônias de U251 (A) e U343 (B) aos quimioterápicos TMZ, MBZ, VBL e CPT. Com base no número de células finais e iniciais de cada colônia antes (CA), durante (CD) e após (CP) os tratamentos, classificou-se cada colônia como: de Crescimento + (n° final de células $>$ n° inicial de células), de Crescimento - (n° final de células $<$ n° inicial de células), de Crescimento nulo (n° final de células = n° inicial de células). Colônias com n° final de células = 0 foram consideradas mortas, logo, sem crescimento.

Uma minoria de células únicas quantificadas na faixa de pré-tratamento, apresentou crescimento nulo desde o plaqueamento, o que é explicado pela dificuldade de adaptação da célula e pela eficiência clonogênica individual de cada linhagem. A porcentagem de células classificadas como de crescimento nulo durante o período de formação das colônias não excedeu os valores de eficiência clonogênica de cada linhagem.

A maioria das colônias da linhagem U251 não alterou sua velocidade de crescimento em resposta a TMZ e CPT; entretanto, foi verificado, no período pós-tratamento, uma redução da velocidade de crescimento e do número de células da minoria de colônias de U251 afetadas por TMZ e CPT. Assim, os agentes alquilantes apresentaram um efeito citotóxico tardio, verificado após o tratamento.

Em contrapartida, VBL e MBZ diminuem drasticamente a velocidade de crescimento e o número de células das colônias de U251 ainda durante o tratamento: cerca de 75% e 55% das colônias mostraram redução no crescimento, respectivamente, no período. Esse efeito agudo se estende até o período pós-tratamento, culminando na eliminação completa

de cerca de 39% das colônias tratadas com VBL e 37% das colônias tratadas com MBZ. Porém, observa-se, tanto para VBL, quanto para MBZ, um aumento de 14% e 5% de colônias com crescimento + após o tratamento, respectivamente, relativo ao período de tratamento, que voltam a proliferar após o estresse terapêutico. Considerando o alto percentual de colônias com crescimento – ao longo do tratamento e as observações de resistência subclonal, VBL e MBZ podem selecionar subpopulações resistentes dentro das colônias durante o tratamento, que reestabelecem sua velocidade de proliferação normal após o tratamento.

3.6 Os quimioterápicos TMZ, CPT e VBL apresentam um efeito tardio e citostático em U343

As colônias da linhagem U343 respondem de forma bem semelhante aos quimioterápicos TMZ, CPT e MBZ durante o tratamento: ocorre uma leve diminuição da velocidade de crescimento das colônias, decorrente, principalmente, por parada no crescimento das colônias durante o tratamento. O período de maior efeito nas colônias tratadas com MBZ parece ser o período do pós-tratamento, onde constatou-se um aumento de até 33% de colônias com crescimento nulo após a exposição à droga. Igualmente, sobretudo no período pós- tratamento com CPT e TMZ, observa-se um aumento de colônias com crescimento nulo ou crescimento negativo. Desta forma, diferente de U251, a maioria dos quimioterápicos testados apresentou um efeito majoritariamente citostático nas colônias de U343.

A exceção foi VBL, que apresentou toxicidade aguda e reduziu a velocidade de crescimento das colônias, em decorrência da diminuição de suas densidades, já durante o tratamento.

4. Discussão

Acreditava-se que uma colônia gerada, *in vitro*, a partir de célula única, seria composta por células idênticas fenotípica e genotipicamente e, assim, responderia de forma uniforme às terapias. Foi levantada a hipótese de que dentro de uma mesma colônia, a resposta a quimioterápicos poderia ser heterogênea. Os dados concluem que a resistência pode ser uma mescla das duas hipóteses.

A resistência de uma parcela de células de uma mesma colônia pode ser resultante de alterações genóticas e epigenéticas induzidas pelo próprio fármaco que conferem a estas a capacidade de sobreviver à presença da droga. Inúmeras análises do perfil mutacional de gliomas descrevem uma série de tumores recorrentes apresentando um perfil

hipermutado após o tratamento com TMZ (Kim *et al.*, 2015), alguns carregando menos da metade das mutações do tumor inicial (Johnson *et al.*, 2014). Apesar da mutagenicidade, TMZ apresentou baixa frequência de ocorrência de resistência subclonal. Assim, a resistência pode independe de alterações genéticas induzidas pelo fármaco, mas sim da flutuação estocástica de processos celulares, que geram uma variabilidade de fenótipos passageiros em populações clonais (Pisco *et al.*, 2015). Esses processos podem estar associados a flutuações de miRNAs (Blake *et al.*, 2003), síntese e degradação proteica diferenciada (Sigal *et al.*, 2006, Ansel *et al.*, 2008), divisão do conteúdo celular inapropriada na mitose (Huh *et al.*, 2011), entre outros processos dinâmicos, nos quais a célula pode distribuir-se, ao longo do tempo, em estados que a tornam menos suscetível ao mecanismo de ação dos fármacos (Huang, 2009). Um dos mais elucidados mecanismos que pode apresentar uma alta influência no desenvolvimento do fenótipo resistente é o mecanismo de controle e regulação do ciclo celular.

Assim como CPT e CCNU, TMZ é um quimioterápico no qual sua atividade é altamente dependente da passagem pela fase S do ciclo celular: os três têm efeito danoso cumulativo dependente da adição de bases que causam o pareamento errôneo ao longo das replicações do DNA e, conseqüentemente, ciclos fúteis de reparo, sendo necessário mínimo de dois ciclos celulares para bloqueio em G2 ou indução de morte celular após tratamento com TMZ (Zhang *et al.*, 2012). Em concordância com nossos dados, esses agentes apresentam toxicidade tardia. Uma porção significativa de colônias, com número inicial de 1 a 8 células, não alterou o crescimento mesmo após tratamento com CPT e TMZ: as células sobreviventes podem não necessariamente ser resistentes aos quimioterápicos, mas simplesmente podem não ter entrado na fase proliferativa durante os três dias de tratamento, evadindo do efeito mutagênico do fármaco.

Seja na duração de cada uma das etapas ou no processo de transição entre fase proliferativa e fase G₀, a progressão no ciclo celular não é populacionalmente sincronizada (Spencer *et al.*, 2013), mesmo entre células recém divididas (Sandler *et al.*, 2015). Já foi demonstrada uma baixa correlação de duração do ciclo celular entre células-irmãs e alta entre células-primas (Sandler *et al.*, 2015), o que implica dizer que, para haver distinção entre grupos de células sincronizadas numa colônia são necessárias três gerações. A variabilidade de distribuição das células entre as fases do ciclo celular no momento da terapia pode produzir uma resposta muito difusa dentro da colônia, já que a duração no ciclo celular não é herdável entre célula-mãe e filha e, as células sincronizadas podem estar amplamente distribuídas na colônia. Assim, o que pode ser visualizado é uma redução na densidade geral das colônias, conforme observado após o tratamento com TMZ. Ademais, o desfecho de cada célula afetada depende do tempo que ela leva para dividir-se, ao menos, duas vezes. A morte de células afetadas, provenientes da mesma colônia, pode diluir-se a

partir da proliferação das células resistentes, o que pode ter dificultado a verificação de resistência subclonal a agentes alquilantes através da metodologia utilizada.

Define-se por epigenética, mecanismos não-genéticos, herdáveis e reversíveis, que geram o remodelamento da cromatina, interferindo na acessibilidade de regiões do DNA na transcrição gênica (Berdasco *et al.*, 2010, Vogel *et al.*, 2014). Células tumorais apresentam um status epigenético instável capaz de regular processos de reprogramação de células tumorais de um estágio de elevada diferenciação para um estado de células-tronco tumorais (CSC) uma vez expostas a uma condição terapêutica, evento já descrito em glioblastoma pós-tratamento com TMZ (Chen *et al.*, 2012). Ademais, CSC possuem a capacidade de se auto-renovar e, concomitantemente, produzir uma célula diferenciada, por meio de uma única divisão celular assimétrica, originando uma subpopulação fenotipicamente distinta dentro da mesma colônia (Morrison *et al.*, 2006).

Ressalta-se, ainda, que drogas não mutagênicas, como os inibidores da polimerização dos microtúbulos MBZ e VBL, apresentaram os resultados mais significativos de resistência subclonal. O número crescente de divisões pelas quais as células tumorais componentes da mesma colônia passam, pode aumentar a instabilidade genética de cada uma. Por consequência, quanto maior a colônia, maior a possibilidade de surgimento de heterogeneidade inter-células e maior a variabilidade de fenótipos. Diante dessa hipótese, outra forma de averiguar a instabilidade da resistência, pode ser por meio da medida do acúmulo de alterações durante as divisões celulares no período de formação da colônia.

Nossos dados mostraram que cinco a oito divisões celulares são suficientes para produzir uma resposta heterogênea dentro de uma colônia originada de célula única. É possível que as colônias que apresentaram resistência clonal sejam compostas por células que ainda não se dividiram o suficiente para produzir fenótipos diferentes de resistência ao quimioterápico dentro da mesma colônia.

A dinâmica de resposta das linhagens aos anti-mitóticos é distinta dos demais fármacos. Um dos principais mecanismos de resistência intrínseca a essa classe, decorre da expressão de isoformas distintas do monômero β -tubulina, que diferem na afinidade de ligação com anti-mitóticos, o que pode permitir segregação cromossômica aberrante durante a mitose (Cabral, 2001). Entretanto, a célula apresenta pontos de checagem durante a intérfase (G2/M, principal responsável pela verificação da correta replicação do DNA) e mitose (verifica má formação do fuso mitótico e ligação centrômero/fuso), que leva a ativação de apoptose ou parada prolongada no ciclo celular (Sacristan *et al.*, 2015). Caso a célula progrida para mitose devido a falhas nos pontos de checagem, pode sofrer catástrofe mitótica, a fim de prevenir aneuploidização no próximo ciclo (Castedo *et al.*, 2004). A toxicidade de VBL e MBZ é aguda e a resposta celular ao dano nos microtúbulos tende a ser mais rápida, de acordo com a eficiência dos pontos de checagem que reconhecem os danos

causados pelo tratamento e rapidamente respondem através da ativação de vias de sinalização que levam estas células à morte celular programada.

A linhagem U343 responde aos tratamentos diferentemente de U251: foi observado, principalmente após tratamento com TMZ, colônias com velocidade e crescimento nulos, compostas por células não-proliferativas com aumento de área, formato plano e alargado, uma morfologia distinta das células proliferativa. Tais alterações morfológicas são associadas às células senescentes (Bayreuther *et al.*, 1988). Além disso, diferentemente de U343, a linhagem U251 apresenta p53 mutada (Asai *et al.*, 1994). Evidências sustentam que, mediante diversos estímulos e vias de sinalização, p53 é importante para indução de senescência (Kong *et al.*, 2011). Dados prévios não mostram efeito de senescência considerável em U251 após tratamento com TMZ, porém, a indução de senescência na linhagem U343 é de 97%, o que fortalece os indícios de desencadeamento de senescência em cultura por parte do quimioterápico (Silva A.O. *et al.*, - dados submetidos para Experimental Cell Research, 2016).

Como perspectiva, pretende-se automatizar a contagem das células, por meio de marcadores fluorescentes, para uma análise mais detalhada do que origina os eventos de resistência subclonal e da distribuição de fenótipos de resistência dentro de uma colônia originada de célula única.

Referências

- Ansel J, Bottin H, Rodriguez-Beltran C, Damon C, Nagarajan M, Fehrmann S, Francois J, Yvert G (2008). Cell-to-cell stochastic variation in gene expression is a complex genetic trait. *PLoS Genet* 4, e1000049.
- Asai A, Miyagi Y, Sugiyama A, Gamanuma M, Hong SH, Takamoto S, Nomura K, Matsutani M, Takakura K, Kuchino Y (1994). Negative effects of wild-type p53 and s-Myc on cellular growth and tumorigenicity of glioma cells. Implication of the tumor suppressor genes for gene therapy. *J Neurooncol* 19, 259-268.
- Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Francz PI (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5112-5116.
- Berdasco M, Esteller M (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19, 698-711.
- Binkhathlan Z, Lavasanifar A (2013). P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 13, 326-346.
- Bissell MJ, Labarge MA (2005). Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells

also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell* 7, 17-23.

Blake WJ, M KA, Cantor CR, Collins JJ (2003). Noise in eukaryotic gene expression. *Nature* 422, 633-637.

Cabral F (2001). Factors determining cellular mechanisms of resistance to antimitotic drugs. *Drug Resist Updat* 4, 3-8.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.

Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522-526.

Fan CH, Liu WL, Cao H, Wen C, Chen L, Jiang G (2013). O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Cell Death Dis* 4, e876.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-2319.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2, 48-58.

Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM (2007). Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem* 282, 26759-26766.

Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 13, 714-726.

Huang S (2009). Non-genetic heterogeneity of cells in development: more than just noise. *Development* 136, 3853-3862.

Huh D, Paulsson J (2011). Random partitioning of molecules at cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 15004-15009.

Johnson BE, Mazar T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF (2014). Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science* 343, 189-193.

Khare A, Shaulsky G (2006). First among equals: competition between genetically identical cells. *Nat Rev Genet* 7, 577-583.

Kim H, Zheng S, Amini SS, Virk SM, Mikkelsen T, Brat DJ, Grimsby J, Sougnez C, Muller F, Hu J, Sloan AE, Cohen ML, Van Meir EG, Scarpace L, Laird PW, Weinstein JN, Lander ES, Gabriel S, Getz G, Meyerson M, Chin L, Barnholtz-Sloan JS, Verhaak RG (2015). Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma

reveals patterns of tumor evolution. *Genome Res* 25, 316-327.

Kitange GJ, Mladek AC, Schroeder MA, Pokorny JC, Carlson BL, Zhang Y, Nair AA, Lee JH, Yan H, Decker PA, Zhang Z, Sarkaria JN (2016). Retinoblastoma Binding Protein 4 Modulates Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma by Regulating DNA Repair Proteins. *Cell Rep* 14, 2587-2598.

Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H (2011). Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res* 2011, 963172.

Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AM, Ng K, Ma J, Wienholds E, Dunant C, Pollett A, Gallinger S, McPherson J, Mullighan CG, Shibata D, Dick JE (2013). Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 339, 543-548.

Lee SJ, Lee HS, Choi JS, Na JO, Seo KH, Oh MH, Jou SS (2012). Remarkable Effect of Gefitinib Retreatment in a Lung Cancer Patient With Lepidic Predominant Adenocarcinoma who had Experienced Favorable Results From Initial Treatment With Gefitinib: A Case Report. *J Clin Med Res* 4, 216-220.

McDermott M, Eustace AJ, Busschots S, Breen L, Crown J, Clynes M, O'Donovan N, Stordal B (2014). In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies. *Front Oncol* 4, 40.

Morrison SJ, Kimble J (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.

Perazzoli G, Prados J, Ortiz R, Caba O, Cabeza L, Berdasco M, Gonzalez B, Melguizo C (2015). Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PLoS One* 10, e0140131.

Pisco AO, Huang S (2015). Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: 'What does not kill me strengthens me'. *Br J Cancer* 112, 1725-1732.

Riely GJ, Kris MG, Zhao B, Akhurst T, Milton DT, Moore E, Tyson L, Pao W, Rizvi NA, Schwartz LH, Miller VA (2007). Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. *Clin Cancer Res* 13, 5150-5155.

Sacristan C, Kops GJ (2015). Joined at the hip: kinetochores, microtubules, and spindle assembly checkpoint signaling. *Trends Cell Biol* 25, 21-28.

Sandler O, Mizrahi SP, Weiss N, Agam O, Simon I, Balaban NQ (2015). Lineage correlations of single cell division time as a probe of cell-cycle dynamics. *Nature* 519, 468-471.

Sergina NV, Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, Moasser MM (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* 445, 437-441.

Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian

- N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141, 69-80.
- Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z (2010). MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res* 1352, 255-264.
- Sigal A, Milo R, Cohen A, Geva-Zatorsky N, Klein Y, Liron Y, Rosenfeld N, Danon T, Perzov N, Alon U (2006). Variability and memory of protein levels in human cells. *Nature* 444, 643-646.
- Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC, Overton KW, Wang CL, Meyer T (2013). The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell* 155, 369-383.
- Swanton C (2012). Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res* 72, 4875-4882.
- Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60, 166-193.
- Vogel T, Lassmann S (2014). Epigenetics: development, dynamics and disease. *Cell Tissue Res* 356, 451-455.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546-1558.
- Watson AJ, Sabharwal A, Thorncroft M, McGown G, Kerr R, Bojanic S, Soonawalla Z, King A, Miller A, Waller S, Leung H, Margison GP, Middleton MR (2010). Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. *Clin Cancer Res* 16, 743-749.
- Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 5, 102-114.

Material Suplementar

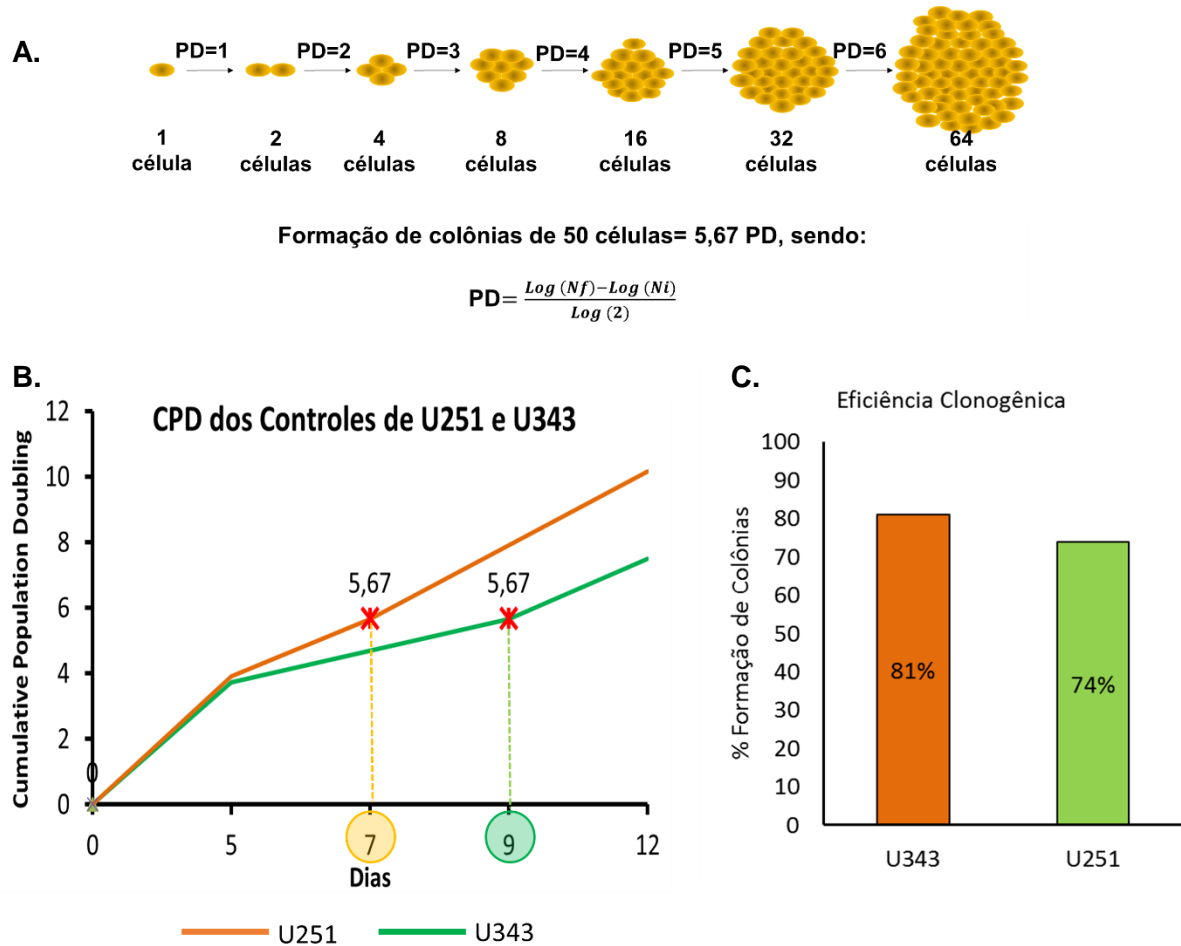


Figura Suplementar 1S. (A). O tempo de formação de colônias em cultura foi baseado em dados de ensaios de Population Doubling, calculado pela fórmula acima. Cada PD representa uma duplicação da população celular, sendo necessário 5,6 duplicações para a formação de colônias com 50 células. (B) Isso corresponde a cerca de 7 dias em cultura para a linhagem U251 e cerca de 9 dias para a linhagem U343. (C). Eficiência Clonogênica das linhagens U251 e U343. O gráfico indica a porcentagem de células semeadas capazes de formar colônias.

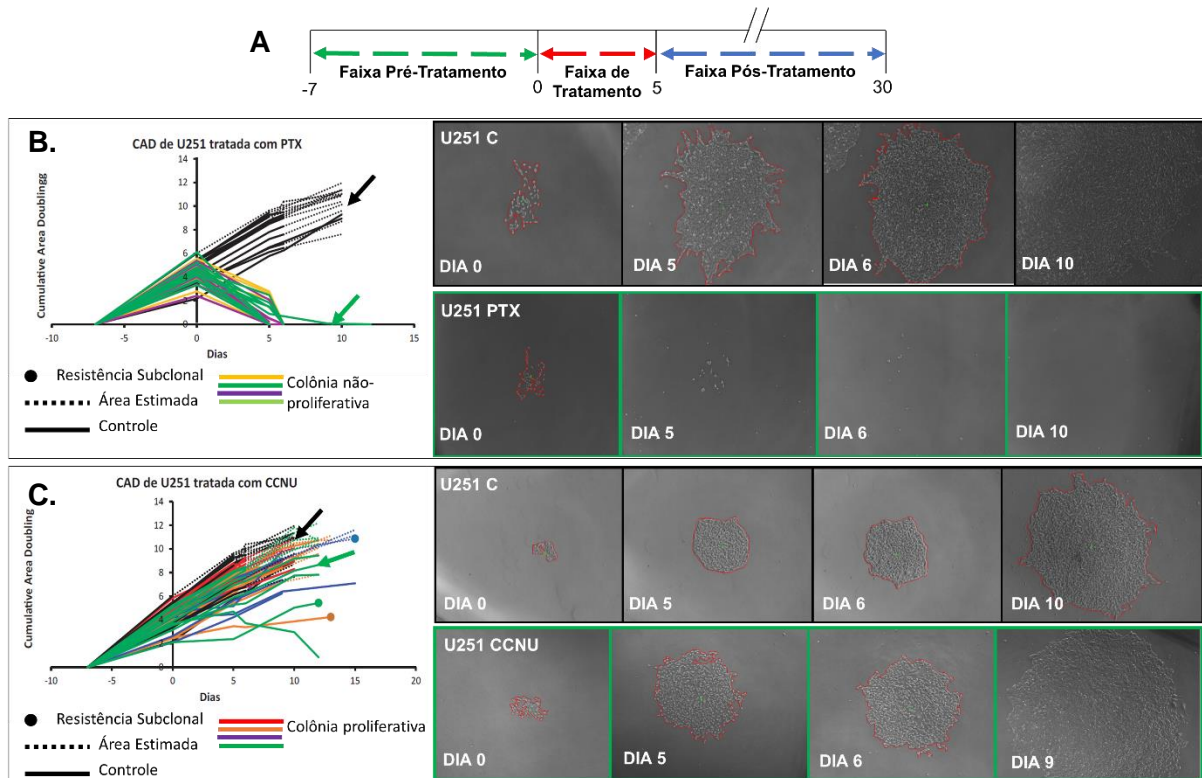


Figura Suplementar 2S. Cumulative Area Doubling (CAD) das Colônias da Linhagem U251 tratadas com PTX e CCNU. (A) Células foram mantidas em cultura por sete dias, tratadas com quimioterápico correspondente por cinco dias e acompanhadas até que se mantivessem íntegras, conforme esquema. (B,C) Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como não-proliferativa e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como proliferativas. Essa classificação foi feita com base nas micrografias. As áreas estimadas foram obtidas quando os limites da colônia ultrapassavam os limites de captação das micrografias. No lado direito de cada quadro, uma sequência de micrografias representativa de cada população presente na análise. A evolução de CAD das micrografias representativas está apontada pelas setas pretas (controle) e coloridas (tratadas).

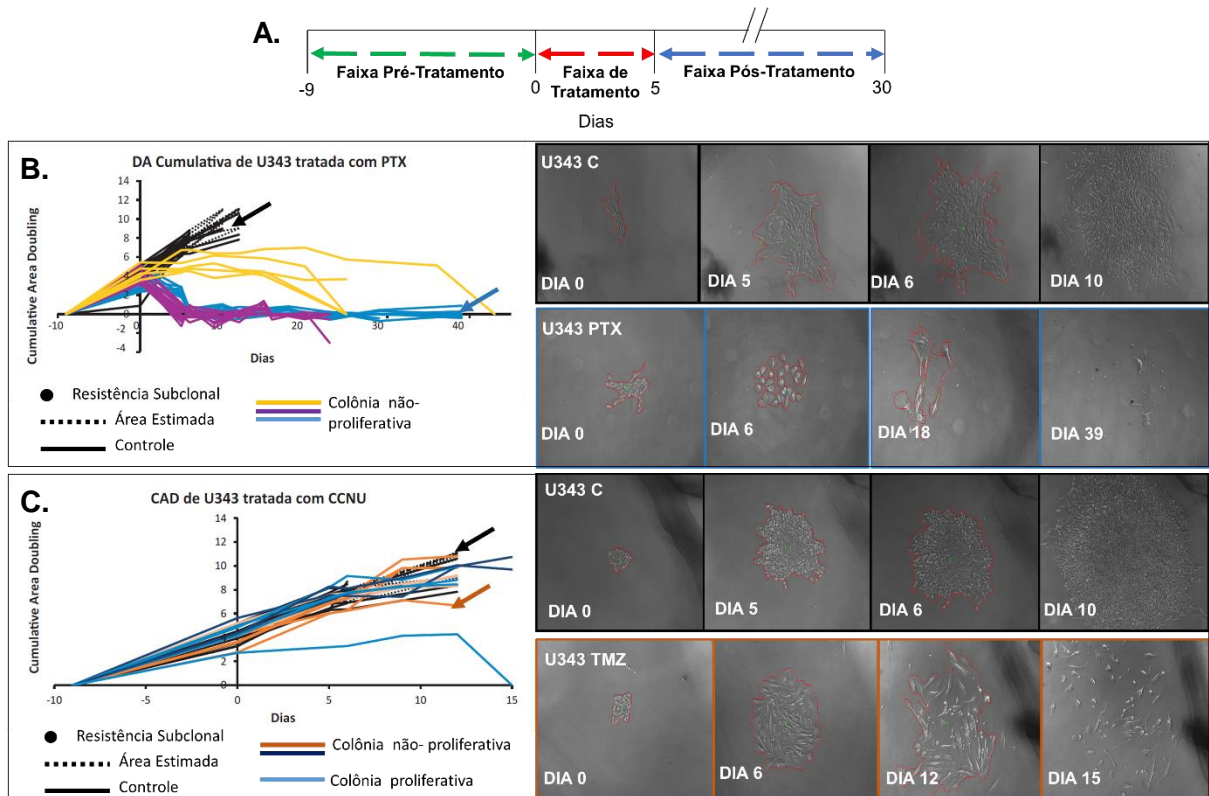


Figura Suplementar 3S. Cumulative Area Doubling (CAD) das Colônias da Linhagem U343 tratadas com PTX e CCNU. (A) Células foram mantidas em cultura por sete dias, tratadas com quimioterápico correspondente por cinco dias e acompanhadas até que se mantivessem íntegras, conforme esquema. (B,C) Controles estão representados em linhas pretas e, o conjunto de colônias tratadas de cada experimento independente, em linhas coloridas. Linhas em tons mais claros representam colônias classificadas como não-proliferativa e linhas em tons mais escuros representam colônias classificadas como proliferativas. Essa classificação foi feita com base nas micrografias. As áreas estimadas foram obtidas quando os limites da colônia ultrapassavam os limites de captação das micrografias. No lado direito de cada quadro, uma sequência de micrografias representativa de cada população presente na análise. A evolução de CAD das micrografias representativas está apontada pelas setas pretas (controle) e coloridas (tratadas).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em tese, uma colônia originada de célula única seria constituída por clones da célula inicial e assim, expressaria uniformemente o fenótipo resistente. Evidências da plasticidade de fenótipos de células tumorais, especialmente por meio de alterações não-genéticas, fortalecem a hipótese de que a resposta a quimioterápicos dentro de uma colônia originada de célula única poderia ser heterogênea. Mesmo em raras ocorrências, foi observado a resistência de frações proliferativas dentro da mesma colônia, evento nomeado de resistência subclonal. Portanto, os dados concluem que a resistência compreende as duas hipóteses.

Foi observado heterogeneidade de resposta aos quimioterápicos entre linhagens do mesmo tipo tumoral: todas as colônias resistentes da linhagem U251 são proliferativas, entretanto, U343 apresenta colônias com aumento de área sem proliferação celular, composta por células com morfologia senescente. O efeito das drogas utilizadas, exceto VBL, foi majoritariamente citostático em U343, enquanto, para U251, os fármacos apresentaram efeito citotóxico.

A dinâmica de resposta de tais linhagens aos tratamentos também é distinta entre os quimioterápicos: agentes específicos para a fase S do ciclo celular apresentam toxicidade tardia, notada no período pós-tratamento. No entanto, fármacos inibidores da polimerização dos microtúbulos, apresentam efeito tóxico agudo, desencadeando morte celular ainda durante o tratamento. Enquanto TMZ e CPT anulam a velocidade de crescimento das colônias após os tratamentos, é observada uma minoria de colônias que, durante o tratamento com VBL e MBZ, diminuem a velocidade de crescimento, mas restabelecem-na no período pós-tratamento, o que indica a seleção de subpopulações resistentes dentro da colônias pelo quimioterápico, que proliferam e repovoam a colônia no período pós-tratamento. Por fim, não parece haver uma tendência de maior sensibilidade ao quimioterápico em colônias intrinsecamente mais proliferativas antes do tratamento, nem dentre as menos proliferativas. Os dados reforçam quão complexo pode ser a progressão tumoral e que, mesmo dentre clones, a resposta entre células-únicas pode ser o ponto decisivo para o reestabelecimento do tumor.

Por fim, como perspectiva, pretende-se automatizar a contagem das células, por meio de marcadores fluorescentes, para uma análise mais detalhada do que origina os eventos de resistência subclonal. A metodologia apontou maior frequência de resistência de subclones após tratamentos quimioterápicos não-mutagênicos, portanto, pretende-se verificar o grau de variabilidade da resistência adicionada a cada divisão celular no período de formação da colônia após poucas divisões celulares (entre uma e cinco). Ademais, planeja-se investigar a

toxicidade de marcadores fluorescentes referentes aos mais variados aspectos celulares como autofagia, massa e funcionalidade mitocondrial e utilizá-los para avaliar correlações entre tais características fenotípicas e resistência, além de investigar a existência de fenótipos resistentes diferentes dentro de uma mesma colônia originada de célula única.

REFERÊNCIAS

ABUBAKER, K. et al. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. **Mol Cancer**, v. 12, p. 24, 2013. ISSN 1476-4598 (Electronic)

1476-4598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537295> >.

BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. **Dev Cell**, v. 19, n. 5, p. 698-711, Nov 16 2010. ISSN 1878-1551 (Electronic)

1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074720> >.

BHANG, H. E. et al. Studying clonal dynamics in response to cancer therapy using high-complexity barcoding. **Nat Med**, v. 21, n. 5, p. 440-8, May 2015. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25849130> >.

BINKHATHLAN, Z.; LAVASANIFAR, A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 13, n. 3, p. 326-46, Mar 2013. ISSN 1873-5576 (Electronic)

1568-0096 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369096> >.

BISSELL, M. J.; LABARGE, M. A. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? **Cancer Cell**, v. 7, n. 1, p. 17-23, Jan 2005. ISSN 1535-6108 (Print)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652746> >.

BROCKS, D. et al. Intratumor DNA methylation heterogeneity reflects clonal evolution in aggressive prostate cancer. **Cell Rep**, v. 8, n. 3, p. 798-806, Aug 7 2014. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066126> >.

CIOCCA, D. R. et al. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. **Cancer Res**, v. 52, n. 13, p. 3648-54, Jul 1 1992. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617638> >.

FAN, C. H. et al. O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e876, 2013. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157870> >.

FAY, M. F.; MARTIN, J. H.; ROSE, S. New imaging techniques for more effective treatment in glioblastoma. **Intern Med J**, v. 44, n. 1, p. 5-6, Jan 2014. ISSN 1445-5994 (Electronic)

1444-0903 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24450518> >.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099-113, 2015. ISSN 1554-8635 (Electronic)

1554-8627 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701485> >.

FINE, H. A. Radiotherapy plus adjuvant temozolomide for the treatment of glioblastoma--a paradigm shift. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 7, p. 334-5, Jul 2005. ISSN 1743-4254 (Print)

1743-4254 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16075787> >.

FRIEDMAN, H. S.; KERBY, T.; CALVERT, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 7, p. 2585-97, Jul 2000. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914698> >.

FURNARI, F. B. et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, v. 21, n. 21, p. 2683-710, Nov 1 2007. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974913> >.

GHISOLFI, L. et al. Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43628, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22928007> >.

GOLDIE, J. H. Drug resistance in cancer: a perspective. **Cancer Metastasis Rev**, v. 20, n. 1-2, p. 63-8, 2001. ISSN 0167-7659 (Print)

0167-7659 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11831649> >.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48-58, Jan 2002. ISSN 1474-175X (Print)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902585> >.

HAAR, C. P. et al. Drug resistance in glioblastoma: a mini review. **Neurochem Res**, v. 37, n. 6, p. 1192-200, Jun 2012. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228201> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

HOLOHAN, C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 10, p. 714-26, Oct 2013. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24060863> >.

KAVALLARIS, M. et al. Multiple microtubule alterations are associated with Vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. **Cancer Res**, v. 61, n. 15, p. 5803-9, Aug 1 2001. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479219> >.

KHARE, A.; SHAULSKY, G. First among equals: competition between genetically identical cells. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 7, p. 577-83, Jul 2006. ISSN 1471-0056 (Print)

1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702983> >.

KHOO, B. L. et al. Single-cell profiling approaches to probing tumor heterogeneity. **Int J Cancer**, Jan 20 2016. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26789729> >.

KIM, H. et al. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution. **Genome Res**, v. 25, n. 3, p. 316-27, Mar 2015. ISSN 1549-5469 (Electronic)

1088-9051 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650244> >.

KITANGE, G. J. et al. Retinoblastoma Binding Protein 4 Modulates Temozolomide Sensitivity in Glioblastoma by Regulating DNA Repair Proteins. **Cell Rep**, v. 14, n. 11, p. 2587-98, Mar 22 2016. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26972001> >.

KRESO, A. et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. **Science**, v. 339, n. 6119, p. 543-8, Feb 1 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239622> >.

LEE, J. Y. et al. Tumor evolution and intratumor heterogeneity of an epithelial ovarian cancer investigated using next-generation sequencing. **BMC Cancer**, v. 15, p. 85, 2015. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881093> >.

LEE, S. J. et al. Remarkable Effect of Gefitinib Retreatment in a Lung Cancer Patient With Lepidic Predominant Adenocarcinoma who had Experienced Favorable Results From Initial Treatment With Gefitinib: A Case Report. **J Clin Med Res**, v. 4, n. 3, p. 216-20, Jun 2012. ISSN 1918-3011 (Electronic)

1918-3003 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22719810> >.

MANNAS, J. P. et al. Long-term treatment with temozolomide in malignant glioma. **J Clin Neurosci**, v. 21, n. 1, p. 121-3, Jan 2014. ISSN 1532-2653 (Electronic)

0967-5868 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24063865> >.

MCFALINE-FIGUEROA, J. L. et al. Minor Changes in Expression of the Mismatch Repair Protein MSH2 Exert a Major Impact on Glioblastoma Response to Temozolomide. **Cancer Res**, v. 75, n. 15, p. 3127-38, Aug 1 2015. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26025730> >.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068-74, Jun 29 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16810241> >.

PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1396-401, Jun 20 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925914> >.

PERAZZOLI, G. et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0140131, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447477> >.

PISCO, A. O.; HUANG, S. Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: 'What does not kill me strengthens me'. **Br J Cancer**, v. 112, n. 11, p. 1725-32, May 26 2015. ISSN 1532-1827 (Electronic)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965164> >.

POLYAK, K. Heterogeneity in breast cancer. **J Clin Invest**, v. 121, n. 10, p. 3786-8, Oct 2011. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965334> >.

RIELY, G. J. et al. Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 17, p. 5150-5, Sep 1 2007. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785570> >.

ROSENZWEIG, S. A. Acquired resistance to drugs targeting receptor tyrosine kinases. **Biochem Pharmacol**, v. 83, n. 8, p. 1041-8, Apr 15 2012. ISSN 1873-2968 (Electronic)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22227013> >.

SANDLER, O. et al. Lineage correlations of single cell division time as a probe of cell-cycle dynamics. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 468-71, Mar 26 2015. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25762143> >.

SERGINA, N. V. et al. Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. **Nature**, v. 445, n. 7126, p. 437-41, Jan 25 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206155> >.

SHARMA, S. V. et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 69-80, Apr 2 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371346> >.

SHI, L. et al. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. **Brain Res**, v. 1352, p. 255-64, Sep 17 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20633539> >.

SOTTORIVA, A. et al. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 10, p. 4009-14, Mar 5 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23412337> >.

SPENCER, S. L. et al. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 428-32, May 21 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19363473> >.

SWANTON, C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. **Cancer Res**, v. 72, n. 19, p. 4875-82, Oct 1 2012. ISSN 1538-7445 (Electronic)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002210> >.

TSURUO, T. et al. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. **Cancer Sci**, v. 94, n. 1, p. 15-21, Jan 2003. ISSN 1347-9032 (Print)

1347-9032 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12708468> >.

URBANSKA, K. et al. Glioblastoma multiforme - an overview. **Contemp Oncol (Pozn)**, v. 18, n. 5, p. 307-12, 2014. ISSN 1428-2526 (Print)

1428-2526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477751> >.

VAN MEIR, E. G. et al. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 3, p. 166-93, May-Jun 2010. ISSN 1542-4863 (Electronic)

0007-9235 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445000> >.

VOGEL, T.; LASSMANN, S. Epigenetics: development, dynamics and disease. **Cell Tissue Res**, v. 356, n. 3, p. 451-5, Jun 2014. ISSN 1432-0878 (Electronic)

0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825415> >.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-58, Mar 29 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23539594> >.

VOLM, M.; EFFERTH, T. Prediction of Cancer Drug Resistance and Implications for Personalized Medicine. **Front Oncol**, v. 5, p. 282, 2015. ISSN 2234-943X (Electronic)

2234-943X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26734568> >.

WATSON, A. J. et al. Tumor O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase inactivation by oral lomeguatrib. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 2, p. 743-9, Jan 15 2010. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068091> >.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CELL PROLIFERATION

Cell Proliferation is a journal devoted to studies into all aspects of cell proliferation and differentiation in normal and abnormal states, stem cells and regenerative medicine; control systems and mechanisms operating at inter- and intracellular, molecular and genetic levels; modification by and interactions with chemical and physical agents; mathematical modelling; and the development of new techniques. In addition to complete papers, the Journal publishes invited review articles, book reviews and correspondence regarding published papers and topics of general interest. All papers are published in English.

Publication Policy

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with Ethical Policies of the Journal, and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Copyright Information

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Cell Proliferation's Open Access option, OnlineOpen, is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For authors signing the Copyright Transfer Agreement

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the Copyright Transfer Agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

Manuscript Format

The manuscript should bear the title of the paper and name and address and email address of each author, together with the name of the hospital, laboratory or institution where the work has been carried out. The name, full postal address, telephone and fax numbers and e-mail address of the author for correspondence, who will be responsible for reading the proofs, should be given on the first page. An informative abstract must be included. For original research papers, the abstract must be structured as follows: Objectives, Materials and methods, Results and Conclusions. Please do not justify the text. Particular attention should be taken to ensure that any articles submitted should adhere exactly to the Journal style in all respects. The author must keep a copy of the manuscript. The Editorial board reserves the right to make literary corrections.

Spelling should conform to The Concise Oxford Dictionary of Current English; Full names with uncommon abbreviations must be given with the first mention; new abbreviations should be made only for long or unwieldy names and should not be used at all unless the name occurs frequently. In the title and abstract unusual abbreviations should be avoided; in the introduction and discussion they should be used sparingly. SI (Systeme International) units and abbreviations should be used for all units; other abbreviations should conform with those shown below.

LI - labelling index

MI - mitotic index

GF - growth fraction

BrdUrd - bromodeoxyuridine

IdUrd - iododeoxyuridine

[³H]dT - tritiated thymidine

G₀, G₁, G₂, M, S - phases of the cell cycle

TC, TCO - duration of the cell cycle

TG₁, TS - durations of the phases of the cell cycle

Illustrations

Charts, diagrams, photographs and photomicrographs should be uploaded electronically, as separate files, as described above. Where there is any possible doubt as to the orientation of an illustration, the top should be marked with an arrow. Each figure should be numbered corresponding with the numbering given in the text. Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should be indicated on a

transparent overlay. Colour illustrations will be accepted when found necessary by the Editor, although the author will be expected to contribute to the cost. Please fill out a Colour Work Agreement form and send it to the Production Office with your copyright license form. This can be downloaded from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in the printed version of the journal, *Cell Proliferation* offers authors the opportunity to reproduce colour figures for free in the online version of the article (but in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should indicate this clearly in the Colour Work Agreement form.

Artwork should be supplied electronically, of appropriate size and with line thickness sufficient for suitable reproduction: photographs as TIFF or EPS files, line art as EPS files or embedded in a word processor document. Full details can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>. Each illustration should be accompanied by a legend clearly describing it; these legends should be grouped on a separate sheet of paper.

There should be as few tables as possible and these should include only essential data; they should be presented on separate sheets and should be given Arabic numbers.

References

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>. Identify references in text, tables and legends by Arabic numerals in parentheses. References must be listed in Vancouver style, and the references list should be numbered consecutively in the order in which the references are first mentioned in the text. Only papers closely related to the author's work should be referred to; exhaustive lists should be avoided. References to articles and papers should give: name(s) followed by the initials of the author(s); title of paper; abbreviated title of the journal as shown in Index Medicus; year of publication in parentheses; volume; first and last pages referred to. References to books and monographs should include: author(s); title; edition; year of publication; publisher(s); place of publication; first and last pages referred to. For articles with more than 6 authors, only the first 6 authors should be listed, followed by et al. Reference to chapters in edited compilations should include: name(s) of authors of the chapter; title of the chapter; name of the book; edition; date of publication; name(s) of the editor(s); publisher(s); place of publication; first and last pages referred to.

Examples:

1. Watkins SJ, Norbury CJ (2004) Cell cycle-related variation in subcellular localization of eIFT3e/INT6 in human fibroblasts. *Cell Prolif* . 37, 149–160.
2. Alison MR, Sarraf CE (1997) *Understanding Cancer* , pp. 99–101. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
3. Maurer HR (1992) Towards chemically defined serum-free media for mammalian cell culture. In: Fersheny RI, ed. *Animal Cell Culture-A Practical Approach* , 2nd edn, pp. 15–46. Oxford, UK: I.R.L. Press.

Page proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to the online proof. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers (see below). Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that accompany the proofs.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hard copy or electronic material submitted four months after publication. If you require the

return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Disclaimer

The Publisher and Editors cannot be held responsible for errors or any consequences arising from the use of information contained in this journal; the views and opinions expressed do not necessarily reflect those of the Publisher and Editors, neither does the publication of advertisements constitute any endorsement by the Publisher and Editors of the products advertised.