

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

Carolina Nunes Santo

**INIBIÇÃO DE KDM5A E HISTONAS DEACETILASES COMO ESTRATÉGIA PARA  
A HOMOGENEIZAÇÃO DA ÁREA NUCLEAR EM RESPOSTA À  
TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

Porto Alegre

2021

Carolina Nunes Santo

**INIBIÇÃO DE KDM5A E HISTONAS DEACETILASES COMO ESTRATÉGIA PARA  
A HOMOGENEIZAÇÃO DA ÁREA NUCLEAR EM RESPOSTA À  
TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

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 Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz  
Coorientador: Msc. Jephesson Santos

Porto Alegre

2021

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

### CIP - Catalogação na Publicação

Santo, Carolina Nunes

Inibição de KDM5A e histonas deacetilases como estratégia para a homogeneização da área nuclear em resposta à Temozolomida em células de glioblastoma / Carolina Nunes Santo. -- 2021.

61 f.

Orientador: Guido Lenz.

Coorientador: Jephesson Alex Floriano dos Santos.

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, 2021.

1. glioblastoma. 2. senescência. 3. KDM5A. 4. histones deacetilases. 5. área nuclear. I. Lenz, Guido, orient. II. Floriano dos Santos, Jephesson Alex, coorient. III. Título.

Carolina Nunes Santo

**INIBIÇÃO DE KDM5A E HISTONAS DEACETILASES COMO ESTRATÉGIA PARA  
A HOMOGENEIZAÇÃO DA ÁREA NUCLEAR EM RESPOSTA À  
TEMOZOLOMIDA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA**

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 Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 26 de abril de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Eduardo Vargas - UPF

---

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela - UFRGS

---

Prof. Dr. Guido Lenz – UFRGS

---

Msc. Jephesson Santos – UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família, meus pais Carlos e Adriana e minha irmã Alice, por todo apoio e suporte que ofereceram durante toda a minha graduação. Obrigada por me permitirem alçar voo e correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por compartilharem comigo os piores e melhores momentos dessa fase que chega ao final. Espero que saibam que os valores que me foram passados seguirão no meu coração em qualquer lugar que eu esteja. Sem o apoio interminável de vocês, essa conquista não seria possível. Minha eterna gratidão!

Aos professores Guido Lenz e Eduardo Chiela, muito obrigada por serem minha inspiração a tantos anos. Guido, tua paixão pela ciência e pela orientação de alunos me ensinaram muito sobre ser pesquisadora. Eduardo, tua paixão pela profissão e teu entusiasmo foram os principais responsáveis por eu encontrar meu lugar na biomedicina. Obrigada por aquela aula de citopatologia oncológica, em 17 de julho de 2017, ela mudou minha vida! Espero um dia me tornar um terço do ser humano e pesquisador que vocês são e poder contribuir para a sociedade.

Ao meu coorientador Jephesson, muito obrigada por todos os ensinamentos durante a iniciação científica. Tenho certeza que a troca que tivemos resultou no crescimento pessoal e profissional de ambos os lados. Obrigada por ter ajudado a construir a pesquisadora que sou hoje. Guardarei com carinho todos os momentos que compartilhamos e nunca esquecerei do teu apoio, suporte e disponibilidade nesse trabalho.

A todo o grupo Labsinal, obrigada pelo acolhimento e grande compartilhamento de conhecimento. Cada um de vocês acrescentou um pouco do que sei sobre fazer ciência. Sou muito grata a todos vocês e espero que nossos laços sejam duradouros.

Aos meus amigos da escola e graduação, meu muito obrigada pelo suporte e ombro amigo nos momentos de solidão e saudade de casa. Sem vocês não haveria saúde mental e forças para contornar todas as dificuldades. Naiane, Luísa e Rafael, vocês foram essenciais pra essa conquista, espero um dia conseguir retribuir todo amor e apoio que recebi durante todos esses anos.

## RESUMO

**Introdução:** O Glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e agressivo em adultos. A terapia antineoplásica com Temozolomida (TMZ) foi implantada na clínica por aumentar as taxas de sobrevida em combinação com a ressecção cirúrgica seguida de radioterapia. Infelizmente, os benefícios do TMZ são limitados e a sobrevida média ainda permanece em 14 meses. O efeito citotóxico do TMZ é dado pela formação de O<sup>6</sup>-metilguanina e consequente desemparelhamento com a timina em ciclos de replicação celular, levando à diferentes desfechos celulares, como apoptose e senescência. Um dos principais motivos para a baixa taxa de sobrevida é a aquisição de resistência ao tratamento. A resistência ao TMZ é dada, principalmente, pela grande heterogeneidade genética e epigenética encontrada nesses tumores. As alterações genéticas tendem a ser estáveis e irreversíveis, enquanto que as epigenéticas mostram-se dinâmicas e reversíveis. A epigenética é descrita por eventos que alteram o estado da cromatina, como padrões de metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas, interferindo na expressão gênica sem alterar a sequência do DNA. Dessa forma, cada célula da população tumoral pode apresentar um comportamento único de resposta ao quimioterápico. A possibilidade de reversão das mudanças epigenéticas tornou as enzimas modificadoras de histonas, como histonas deacetilases (HDACs) e histonas demetilases (KDMs), excelentes alvos terapêuticos. A terapia epigenética tem como objetivo ressensibilizar as células ao quimioterápico através da re-expressão de genes como os pró-apoptóticos e diminuição da variabilidade fenotípica. **Objetivos:** homogeneização da resposta celular de área nuclear ao TMZ através da modulação epigenética via inibição de KDM5A e HDACs à nível de células únicas. **Discussão:** A área nuclear fornece informações importantes acerca do estado celular, como a senescência, visto que células senescentes apresentam uma maior área nuclear. A senescência é um estado de parada de ciclo celular permanente desencadeada por processos como resposta ao dano ao DNA crônica. Nossa ferramenta de análise da heterogeneidade entre a área nuclear de células dentro de uma colônia foi capaz de gerar dados como proporção de células senescentes, média da área nuclear por colônia e coeficiente de variação da área nuclear entre células em colônias. **Resultados:** Nossos resultados preliminares indicam que a combinação CPI-455, um inibidor específico de KDM5A, com TMZ pode levar à diminuição da proliferação celular através da indução de senescência. Provavelmente, o estado de cromatina favorável à transcrição provocada pela inibição de KDM5A, aumentou a expressão de genes envolvidos nos processos de indução de senescência, enquanto que a combinação SAHA e TMZ diminuiu a proporção de células senescentes e a taxa de crescimento, indicando que o SAHA pode ter sensibilizado as células ao TMZ e talvez aumentado as taxas de apoptose. **Conclusão:** mais estudos são necessários para a confirmação dos efeitos benéficos dos moduladores e a compreensão de seu mecanismo.

Palavras-chave: Glioblastoma. Área nuclear. Temozolomida. Epigenética. KDM5A. Histona deacetilase. Senescência

## ABSTRACT

**Introduction:** Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults. Despite the multimodal treatment consisting of surgical debulking followed by radiotherapy and chemotherapy with Temozolomide (TMZ), the GBM patients prognosis remains poor, with a median survival around 14 months. The cytotoxic effect of TMZ is mediated by O<sup>6</sup>-methylguanine formation, which mismatches with thymine in subsequent DNA replication cycles. This was described as leading to several cellular outcomes, such as apoptosis and senescence-like events. The emergence of TMZ resistance is the main responsible for therapeutic failure and tumor relapse. The lack of successful therapy is often assigned to the genetic and epigenetic heterogeneity of this tumor. Genetic alterations tend to be stable and irreversible, while epigenetic changes can be dynamic and reversible. Epigenetic is described by chromatin state modification events, like histones pos-translational modifications, that lead on change of gene expression without altering DNA sequence. Thus, each cell of a tumor population may present an unique chemotherapy response behavior. The reversal possibility of epigenetic changes cause the emergence of histone modification enzymes, such as histone deacetylases (HDACs) and histone demethylases (KDMs), as excellent therapeutic targets. Epigenetic therapy purpose is resensibilize cells to chemotherapy through re-expression of pro-apoptotic genes, for example, and decrease phenotypic variability. **Objectives:** homogenization of nuclear area cell response to TMZ through epigenetic modulation via inhibition of KDM5A and HDACs at the level of single cells. **Discussion:** the nuclear size provides information about cellular state, such as senescence, that presents bigger nuclear size. Cell senescence is a permanent cycle arrest state triggered by process like chronic DNA damage response. Our tool of nuclear area heterogeneity analysis among cells was able to generate data on the proportion of senescent cells, nuclear area average by colony and nuclear area coefficient variation among cells in colonies. **Results:** Our preliminary results indicate that CPI-455, an specific KDM5A inhibitor, and TMZ in combination could lead to decreased proliferation by senescence induction. Probably, the open chromatin state caused by KDM5A inhibition increased the expression of pro-senescence genes. In other hand, SAHA, an HDAC I and II inhibitor, and TMZ combination diminished senescence cells proportion and growth rate, indicating that SAHA may resensitize cells to TMZ and maybe increase apoptosis rate. **Conclusion:** however, more tests are needed for the confirmation of beneficial effects of theses epigenetic modulators and the mechanism understanding.

Keywords: Glioblastoma. Nuclear area. Temozolomide. Epigenetic. KDM5A. Histone deacetylase. Senescence

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa global das taxas de mortalidade por tipo de câncer em todos os países, padronizado para ambos os sexos e todas as idades .....	13
Figura 2 – Alteração das taxas de sobrevivência em cinco anos para os sítios tumorais mais comuns entre os anos de 1975-1977 e 2006-2012.....	14
Figura 3 – Modificações pós-traducionais de histonas .....	22
Figura 4 – Estrutura química do inibidor de histonas deacetilases SAHA.....	25
Figura 5 – Reação de demetilação por KDM5A .....	26



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BER** - Reparo por excisão de base (*Base Excision Repair*)
- DNA-PK** - Proteína Quinase de DNA (*DNA-dependent protein kinase*)
- DNMT** - DNA metiltransferase (*DNA methyltransferase*)
- DSBs** - Quebras de fita dupla do DNA (*DNA double-strand breaks*)
- FDA** - *Food and Drug Administration U.S.*
- GBM** - Glioblastoma multiforme
- HAT** - Histonas acetiltransferase (*Histone acetyltransferase*)
- HDAC** - Histonas deacetilase (*Histone deacetylase*)
- HDACi** - Inibidor de histona deacetilase (*Histone deacetylase inhibitor*)
- HR** - Recombinação homóloga (*Homologous recombination*)
- INCA** - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- KDM** - Lisina Demetilase (*Histone lysine demethylase*)
- MBD** - Família do domínio de ligação CpG metil (*Methyl CpG binding domain*)
- MMR** - Reparo de incompatibilidade (*Mismatch repair*)
- NER** - Reparo por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide excision repair*)
- NHEJ** - Junção não homóloga de extremidades (*Non-homologous end joining*)
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- pRb** - Proteína do Retinoblastoma (*Retinoblastoma protein*)
- SAHA** - Inibidor de HDAC (*Vorinostat or Suberoylanilide hydroxamic acid*)
- TMZ** - Temozolomida

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 CÂNCER .....	11
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER.....	12
1.3 GLIOMAS .....	14
1.4 DANO AO DNA E MORTE CELULAR .....	16
<b>1.4.1 Proteína Ligante de p53 1 (53BP1) .....</b>	<b>17</b>
1.5 SENESCÊNCIA .....	17
1.6 HETEROGENEIDADE TUMORAL .....	18
1.7 EPIGENÉTICA .....	20
<b>1.7.1 Histonas Deacetilases (HDACs).....</b>	<b>24</b>
<b>1.7.2 KDM5A.....</b>	<b>26</b>
1.8 JUSTIFICATIVA .....	27
<b>1.9 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>1.9.1 Objetivo geral.....</b>	<b>28</b>
<b>1.9.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>29</b>
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA <i>CLINICAL</i></b>	
<b><i>EPIGENETICS</i>.....</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CÂNCER

Câncer é o nome dado ao conjunto de centenas de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células e a constante alteração genômica. O processo de conversão de uma célula não maligna em uma célula maligna é dado através da aquisição sequencial de alterações, conhecidas como *hallmarks* do câncer, que compreendem autossuficiência em sinais proliferativos, insensibilidade à sinais anticrescimento, evasão à sinais de morte, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese e ativação de mecanismos que levam à invasão tecidual e metástase (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). Em suma, acredita-se que células cancerígenas surjam como resultado da instabilidade genômica e seu consequente acúmulo de defeitos nos mecanismos de controle da divisão celular e no sistema de retroalimentação da célula (HORNE; POLLICK; HENG, 2015).

Por ser a característica diferencial da doença, a proliferação celular tumoral foi, e mantém-se, alvo de muitos estudos. Hoje, sabe-se que enquanto células normais necessitam de sinais exógenos de crescimento para evadir o estado quiescente e tornarem-se proliferamente ativas, células tumorais são capazes de atingir a independência da estimulação do microambiente tecidual através da produção de seus próprios fatores de crescimento (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). Além da estimulação autócrina, ocorrem alterações em proteínas envolvidas na via de sinalização dos fatores de crescimento, como receptores tirosina-quinase, que podem ter sua conformação modificada para a ativação independente do ligante e provocar a entrada das células em uma retroalimentação infinita de estimulação proliferativa sustentada (DU; LOVLY, 2018).

Mesmo com a autossuficiência em sinais de crescimento, mecanismos como evasão à sinais anticrescimento e pró-apoptóticos são necessários para que a célula obtenha um potencial replicativo ilimitado. Esses processos ocorrem através da alteração de proteínas chaves na regulação do ciclo celular, que controlam a decisão entre proliferação, senescência ou apoptose, como pRb e p53 (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). Tanto pRb quanto p53 funcionam como estágios de controle na fase G1/S do ciclo celular, impedindo a progressão do mesmo quando em condições subótimas, protegendo a célula contra o rearranjo cromossômico e acúmulo de mutações (HICKMAN, 2002);(GIACINTI; GIORDANO, 2006). A mutação das mesmas,

permite então, a replicação celular sem o reparo correto das mutações já estabelecidas (BURKHART; SAGE, 2008).

A consequência da proliferação celular descontrolada e estocástica é a formação de uma massa tumoral constituída de inúmeros genótipos e fenótipos mutantes com vantagens seletivas, que são capazes de crescer, sobreviver e dominar o microambiente tecidual (HORNE; POLLICK; HENG, 2015). As distintas assinaturas genéticas e epigenéticas entre as células acarretam em diferentes níveis de sensibilidade à terapia, e essa diferença é a chave para o abrigo de mecanismos de resistência e/ou tolerância, que permitem que as células sobrevivam e repovoem o ambiente tumoral após o tratamento (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018);(LENZ *et al.*, 2021).

A terapia antineoplásica, muitas vezes combinada com radioterapia e ressecção cirúrgica do tumor, é a forma mais utilizada de tratamento para inúmeros tipos tumorais. Os quimioterápicos são desenvolvidos para provocar a morte celular ou inibir o crescimento das células que dividem-se rapidamente através da indução de danos ao DNA ou impedimento da replicação cromossomal. Dessa forma, células saudáveis de rápida replicação, como folículos capilares e células precursoras do sangue na medula óssea, também são afetadas. Atualmente existem cinco classes de quimioterápicos utilizadas: agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores mitóticos, inibidores da topoisomerase e antibióticos antitumorais (AL-DIMASSI; ABOU-ANTOUN; EL-SIBAI, 2014).

Mesmo com a amplitude de agentes quimioterápicos, o efeito citotóxico que têm no organismo, a aquisição de resistência ao tratamento e a possibilidade de recidiva confirmam a necessidade de avanços ainda maiores na biologia e farmacologia oncológica (LIVSHITS; RAO; SMITH, 2014).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

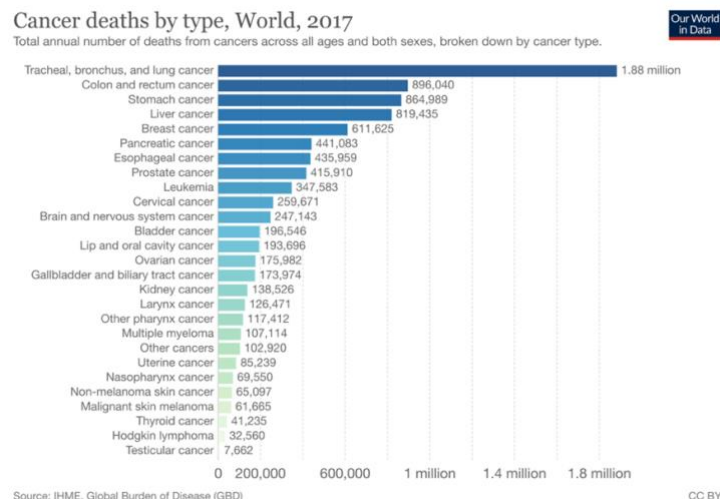
O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública mundial e permanece sendo um grande desafio médico. Atualmente, ocupa o segundo lugar em principais causas de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Dados publicados pela plataforma *Our World in Data*, que reúne dados ao redor do mundo, mostram que, em 2017, estimou-se que 9,6 milhões de pessoas tenham morrido devido à doença. O tipo de câncer com maior incidência mundial no ano de 2018 foi o câncer de pulmão, excluindo os cânceres de pele não

melanoma, enquanto que os tipos tumorais com maior mortalidade foram do sistema respiratório, como mostra a figura 1. Para o ano de 2040, as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) são de 29,5 milhões de novos casos, o que revela um aumento de aproximadamente 60% do número de casos, e 16,5 milhões de mortes, um aumento, que mesmo com o crescimento da densidade demográfica, permanece significativa e preocupante. No Brasil, o aumento da incidência em 2040 chegará a 80%, enquanto que a morte sofrerá um aumento de 83%.

A incidência e a mortalidade da doença vêm aumentando no mundo inteiro, tanto pelo envelhecimento e pelo crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e prevalência dos fatores de risco da doença, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a incidência de todos os tumores combinados é cerca de 20% maior entre homens (218,6/100.000) do que entre mulheres (182,6/100.000). Estratificando-se por sexo, as neoplasias mais comuns em homens são de próstata, do aparelho respiratório e do colorretal, enquanto que em mulheres, o tumor mais incidente é o de mama, seguido por colorretal e colo do útero (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), [s. d.]).

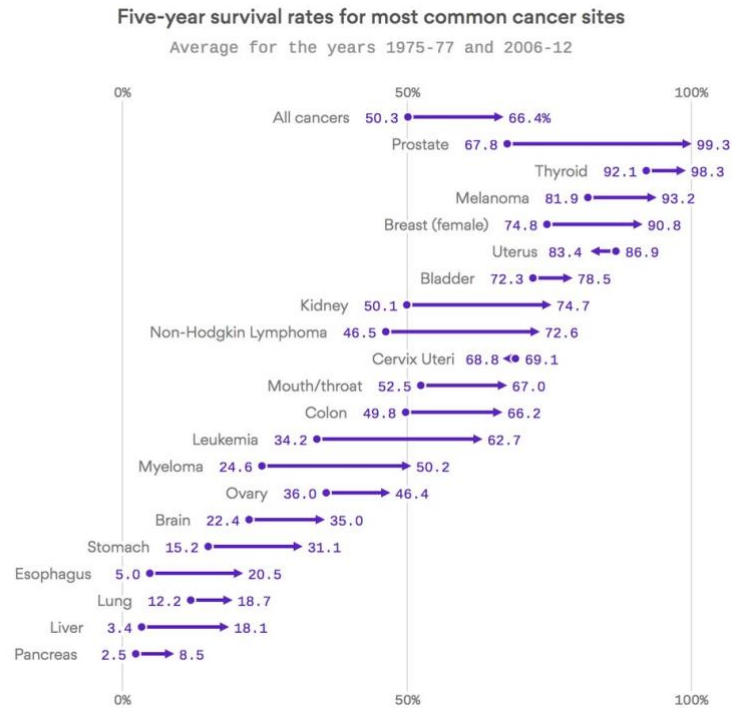
Felizmente, muitos tipos tumorais hoje apresentam elevadas taxas de sobrevida. Isso deve-se ao progresso em seu diagnóstico e tratamento. Entretanto, em relação à outros, o progresso permanece mínimo, como tumores renais, hepáticos, pulmonares e esofágicos. A figura 2 demonstra a progressão das taxas de sobrevida em 5 anos em inúmeros tipos tumorais.

**Figura 1 - Número de mortes por tipo de câncer no mundo, 2017.**



Fonte: *Our world in data*, 2017.

**Figura 2 - Alteração das taxas de sobrevivência em cinco anos para os sítios tumorais mais comuns entre os anos de 1975-1977 e 2006-2012.**



Fonte: Jornal do Instituto Nacional do Câncer, 2017.

### 1.3 GLIOMAS

Os gliomas são tumores cerebrais primários de origem glial com a maior prevalência na população. Eles são classificados de acordo com sua histopatologia em: astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. Os tumores mais agressivos são os astrocitomas de grau IV, que incluem glioblastomas e gliomas difusos na linha média (CHEN *et al.*, 2017).

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral maligno primário mais comum e agressivo que acomete os seres humanos, com incidência de 3,19 casos a cada 100.000 pessoas ao ano. O prognóstico, ainda hoje, permanece muito baixo, tendo uma taxa de sobrevivência em 5 anos de apenas 4-5%, uma das piores encontradas na oncologia moderna. Essa curta taxa de sobrevivência pode ser atribuída às limitações do tratamento, a difusa natureza do GBM e uma compreensão incompleta acerca da fisiopatologia do tumor (BATASH *et al.*, 2017).

Segundo o Ministério da Saúde (2014), o tratamento padrão atual é dado pela ressecção cirúrgica do tumor seguida de radioterapia com ou sem quimioterapia combinada. Por ser altamente proliferativo e invasivo, a ressecção total do tumor torna-se quase impossível,

fazendo-se necessária a complementação do tratamento com radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia antineoplásica para GBM traz benefícios clínicos temporários e inúmeros efeitos colaterais, e por isso, o uso da mesma torna-se opcional em muitas situações. Quando realizada, conta com medicamentos em monoterapia, como temozolomida (TMZ), lomustina, cisplatina ou carmustina e combinações de medicamentos, como o regime PCV (procarbazina, lomustina e vincristina). Nos dias atuais, o TMZ é o primeiro quimioterápico de escolha, visto que possui vantagens de absorção e via de administração (STUPP *et al.*, 2005).

O TMZ é um pró-fármaco que sofre hidrólise espontânea no plasma e é convertido em monometiltriazenoimidazol (MTIC), seu metabólito ativo. Por ser um agente alquilante, seu mecanismo de ação consiste em adicionar grupamentos metil (-CH<sub>3</sub>) à guanina nos locais N<sup>7</sup> e O<sup>6</sup> e à adenina no local N<sup>3</sup>. Isso provoca a substituição da timina pela citosina durante a replicação do DNA, o que cria um par de bases incompatível. Em consequência, provoca a quebra dupla da fita de DNA, que ativa a maquinaria de resposta ao dano ao DNA das células e pode provocar diversos desfechos celulares. Outras grandes vantagens da temozolomida são o seu pequeno tamanho (194 Da) e a lipofilicidade, uma vez que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS; DEPARTAMENTO DE GESTÃO E INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE, 2014).

O objetivo principal do tratamento com TMZ é provocar a parada de ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M e ativar a via intrínseca da apoptose, porém, a efetividade do TMZ depende de fatores como: fase do ciclo celular, estado da cromatina e níveis de expressão gênica de enzimas de reparo, e por essa razão, a célula pode responder ao tratamento com morte celular programada, reparo do dano, senescência ou mutação com consequente repasse da mutação para as células filhas (PAWLOWSKA *et al.*, 2018).

Infelizmente, as células rapidamente tornam-se refratárias ao tratamento com TMZ. Isso deve-se, em grande parte, à heterogeneidade celular e molecular deste tumor, que abriga uma população de células com potencial de diferenciação diverso e propriedades únicas de invasividade e autorrenovação. A resistência à temozolomida pode ser dada através de processos genéticos e epigenéticos. Pesquisas atuais indicam que ela pode estar associada com o estado de metilação do promotor gênico da enzima MGMT, responsável pelo reparo do dano causado pelo TMZ, superexpressão de KDMs e HDACs, proteína p53 não funcional, presença de células-tronco de glioma, e muitas outras modificações proteicas. Portanto, esclarecer os mecanismos de resistência ao TMZ e encontrar maneiras de ressensibilizar as células é essencial

para aumentar a eficácia do medicamento e a sobrevida dos pacientes (JIAPAER *et al.*, 2018);(BANELLI *et al.*, 2017).

## 1.6 DANO AO DNA E MORTE CELULAR

O reparo adequado das lesões ao DNA é essencial para a homeostase tecidual e prevenção da tumorigênese. Nesse sentido, por estarem constantemente expostas à agentes causadores de danos ao DNA, as células desenvolveram múltiplos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade do genoma (VAN DEN BERG *et al.*, 2018). Os danos podem ser induzidos por agentes ambientais ou gerados espontaneamente durante o metabolismo celular. Os agentes ambientais podem ser de origem física, como radiações ultravioleta e ionizante, ou química, como agentes quimioterápicos. Os danos gerados pelo metabolismo da célula, referem-se, principalmente, às espécies reativas de oxigênio produzidas durante a respiração oxidativa e aos erros cometidos pela maquinaria de duplicação (JACKSON; BARTEK, 2009);(HOEIJMAKERS, 2001).

A resposta ao dano ao DNA é feita por um sistema hierarquicamente organizado de enzimas, a qual pode ser dividida em três principais passos: reconhecimento, sinalização e ativação da resposta apropriada ao dano. O sistema de resposta ao dano é o principal responsável pelo desfecho celular, tomando a decisão entre parada do ciclo celular transitória e reparo do dano, senescência celular ou apoptose, dependendo do extensão e toxicidade da lesão, além de considerar a fase do ciclo celular e estado da cromatina da célula (MATT *et al.*, 2016).

As lesões menos nocivas, como bases mal pareadas e quebras de fita única, são reparadas pelos sistemas de *mismatch repair* (MMR) e reparo por excisão de bases (BER), respectivamente. Lesões mais complexas, como dímeros de pirimidina, são reparadas pelo sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). Por fim, lesões extremamente complexas, como a quebra dupla de fita de DNA (DSBs), possuem dois principais diferentes mecanismos de reparo: recombinação homóloga (HR) e a junção não homóloga de extremidades (NHEJ) (JACKSON; BARTEK, 2009).

Por serem extremamente nocivas às células, as DSBs podem induzir apoptose sem ao menos uma tentativa de reparo. Seguindo essa linha de raciocínio, a indução aguda de quebras duplas na fita de DNA tornou-se o princípio de inúmeros agentes quimioterápicos, incluindo o TMZ. A eficácia desses tratamentos depende diretamente da forma com que essas lesões são



reconhecidas e reparadas, além dos níveis de expressão de proteínas de reparo e da via apoptótica (APARICIO; BAER; GAUTIER, 2014).

A resistência ao TMZ pode envolver a expressão de proteínas como p53 e BCL-2, proteínas chave na via intrínseca da apoptose. O papel da p53 é a regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, que na sequência, ligam-se à proteínas pró-sobrevivência da família BCL-2 e inibem sua ação. Em consequência, há a ativação das proteínas BAX e BAK, que atuam aumentando a permeabilidade da membrana da mitocôndria e provocam a liberação de citocromo C no citoplasma da célula (AUBREY *et al.*, 2018). A liberação dessa molécula promove a ativação da cascata de caspases, proteínas que realizam a destruição da célula (SANTUCCI *et al.*, 2019).

Em células com p53 mutada ou com superexpressão de enzimas de reparo e proteínas anti-apoptóticas, a via intrínseca da apoptose não é ativada quando necessária, o que provoca um acúmulo de mutações e contribui ainda mais para a heterogeneidade tumoral (STRASSER *et al.*, 2020).

#### **1.4.1 Proteína ligante de p53 (53BP1)**

A proteína ligante de p53 (53BP1) é continuamente expressa no núcleo celular e atua principalmente na resposta de dano ao DNA, sendo recrutada para sítios de DSB de forma rápida e atuando como mediadora no recrutamento de inúmeras proteínas de reparo. Para fixar-se no sítio da lesão, liga-se à H4K20me2, presente de forma abundante na fase G1 do ciclo celular. A 53BP1 é essencial no bloqueio da ressecção de extremidades e consequente promoção do reparo por NHEJ, e por isso, defeitos em sua funcionalidade podem provocar problemas nos mecanismos de dano, reparo incorreto das lesões e hipersensibilidade à radiação ionizante (MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI *et al.*, 2019);(BÁRTOVÁ *et al.*, 2019).

#### **1.6 SENESCÊNCIA**

A senescência é um estado permanente de parada do ciclo celular geralmente ativado por uma persistente resposta de dano ao DNA, que pode ser causada por uma ampla gama de

fatores intrínsecos e extrínsecos, como estresse genotóxico e oxidativo, disfunção mitocondrial, irradiação e agentes quimioterápicos (HERRANZ *et al.*, 2018). A senescência é um processo irreversível que limita a proliferação celular através da perda de atividade mitótica. O fenótipo de células senescentes é geralmente marcado por remodelação da cromatina, reprogramação metabólica, estresse de retículo endoplasmático e aumento da secreção de fatores pró-inflamatórios. Todas essas alterações provocam mudanças na morfologia celular, como aumento do tamanho nuclear, acúmulo de lisossomos e mitocôndrias e alterações na composição da membrana plasmática (HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2018).

No contexto tumoral, a senescência celular pode ser benéfica ou maléfica. O processo de senescência pode ser benéfico quando desencadeado por mutações em oncogenes, impedindo que a célula continue a se dividir, ou através da ativação do sistema imunológico, que irá reconhecer e eliminar outras células senescentes. Em contrapartida, sua função maléfica pode ser dada pela alta secreção de fatores inflamatórios, que podem modular o microambiente tumoral fazendo-o favorecer ainda mais a progressão do tumor. Os efeitos das células senescentes dentro do tumor são complexos e dependem do contexto fisiológico (YUAN *et al.*, 2020);(LEE *et al.*, 2014).

Apesar de ter como objetivo a morte celular programada, a terapia com TMZ também é capaz de induz senescência em células de glioblastoma (SILVA, A.O *et al.*, 2016). Essa indução aparenta ser dependente de p53 e parada do ciclo em G2/M (AASLAND *et al.*, 2019). As altas taxas de resistência à apoptose encontradas em células de glioblastoma tratadas com TMZ sugerem que talvez as células sejam mais suscetíveis à outros mecanismos de morte, como a senescência. Nesse sentido, a indução de senescência como terapia combinada ao TMZ emergiu como uma promissora estratégia no tratamento do GBM (RONINSON *et al.*, 2001).

## 1.6 HETEROGENEIDADE TUMORAL

Durante todo o percurso da doença, uma somatória de alterações genéticas e epigenéticas são herdadas e/ou adquiridas de forma aleatória pelas células tumorais, resultando no surgimento de processos como resistência e tolerância. Tais processos tornam as células únicas, e dessa forma, a massa tumoral torna-se extremamente heterogênea. Existem diferentes formas de heterogeneidade, sendo elas: intratumoral, espacial e temporal (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

A heterogeneidade intratumoral refere-se às diferenças encontradas entre as células dentro de uma população tumoral, e pode ser dada por inúmeros fatores, como a interação das células com o seu microambiente. O microambiente é o ambiente ao redor do tumor responsável pelo aporte necessário para a iniciação, progressão e metástase. Ele é composto por diversos tipos celulares, como células endoteliais, fibroblastos e células imunes, e componentes extracelulares, como vasos sanguíneos, citocinas, fatores de crescimento e hormônios (WU; DAI, 2017);(WHITESIDE, 2008). Em algumas circunstâncias, o microambiente acaba impondo desafios como pressão física, estresse oxidativo, privação de nutrientes, acidose e hipóxia às células, o que provoca instabilidade genômica e o ganho de mutações (LYSSIOTIS; KIMMELMAN, 2017);(WEBER; KUO, 2012).

A heterogeneidade espacial, por sua vez, representa as diferenças encontradas entre as células do sítio primário e do sítio metastático. Ela deve-se, principalmente, à aquisição de mutações ao longo do processo de metástase derivadas das inúmeras condições biológicas encontradas pelo caminho, e à interação das células com o microambiente do tumor satélite, que pode conter células específicas do órgão - como neurônios no sistema nervoso central, por exemplo - (HIRATA; SAHAI, 2017);(HUNTER *et al.*, 2018).

A heterogeneidade temporal, por fim, é o reflexo da flutuação na expressão gênica das células ao longo do tempo dentro de uma massa tumoral em resposta aos diferentes estímulos ambientais, como por exemplo, um quimioterápico (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). Essa flutuação é orquestrada pela maquinaria epigenética e permite que as células oscilem entre estados sensíveis e tolerantes à determinado quimioterápico (JONES; BAYLIN, 2007).

As distintas formas de heterogeneidade demonstram que os tumores estão em constante mudança. Para contornar todos os processos de resistência e tolerância, seria necessário compreender todas as mudanças de comportamento a nível de células únicas, como expressão gênica, vias de sinalização e rotas metabólicas (QIAN *et al.*, 2017).

A resistência é um processo genético, estável e irreversível que, em sua maioria, não permite que uma célula resistente volte a ser sensível à determinado fármaco (SALGIA; KULKARNI, 2018). Dentre os inúmeros processos de resistência conhecidos, a mutação da proteína p53 têm grande importância na biologia tumoral, pois a mesma possui função essencial no desencadeamento da via intrínseca da apoptose, via alvo de múltiplos quimioterápicos. Um dos mecanismos mais conhecidos de inativação de p53 é a mutação de sentido errado no seu sítio de ligação ao DNA (VIELER *et al.*, 2018). A via da proteína p53 está alterada em 87% dos casos de glioblastomas e favorece evasão da apoptose. Dessa forma, proteínas com

mutações em p53 irão responder de forma diferente ao TMZ do que células com p53 funcional (FORTE *et al.*, 2019).

A tolerância, em contrapartida, é um processo epigenético, dinâmico e reversível, onde as modificações ocorrem de forma transitória. Seus principais mecanismos envolvem metilação do DNA e remodelação da cromatina, seja para ativação de oncogenes ou evasão da morte celular induzida por agentes quimioterápicos através da superexpressão de enzimas de reparo ao dano no DNA, por exemplo (JONES; BAYLIN, 2007). Cada célula possui seu próprio padrão de expressão gênica, onde uma sutil diferença de expressão proteica pode evitar a morte celular. Nesse sentido, fica claro a individualidade de resposta de diferentes células de um mesmo tumor ao mesmo tratamento. Uma modificação largamente conhecida no GBM é a hipometilação do promotor gênico da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) e sua consequente superexpressão. A MGMT é a enzima responsável pelo reparo do dano ao DNA causado pelo TMZ, e por isso, seu aumento transcricional está fortemente relacionado à um pior prognóstico e uma menor sobrevida (PANDITH *et al.*, 2018). Por ser um processo dinâmico e reversível, diferentes enzimas da maquinaria epigenética vem tornando-se excelentes alvos terapêuticos, visto que o principal objetivo da terapia epigenética é a reativação de genes benignos (KELLY; ISSA, 2017).

Portanto, o entendimento completo acerca da composição, interações, dinâmica e princípios operacionais dos ecossistemas tumorais mostra-se como uma ferramenta essencial para a criação de novos quimioterápicos e para o contorno dos mecanismos de tolerância e resistência à terapia (REN; KANG; ZHANG, 2018).

## 1.7 EPIGENÉTICA

A grande maioria das neoplasias malignas abriga anomalias genéticas e epigenéticas, com uma forte e dinâmica interação entre elas (JONES; ISSA; BAYLIN, 2016). A epigenética é caracterizada por mudanças na expressão gênica sem alterações na sequência de DNA, tendo suas maiores contribuições para o fenótipo celular a partir da metilação do DNA, da modificação de histonas e da reorganização da cromatina (KELLY; ISSA, 2017). O código epigenético é o responsável pela modulação dos padrões de expressão gênica através da ativação ou repressão transcricional, e pode ser influenciado por fatores endógenos e exógenos (HASHIMOTO; VERTINO; CHENG, 2010). Em células tumorais, no entanto, a epigenética é

utilizada como ferramenta para o ganho de malignidade e tolerância ao tratamento durante o desenvolvimento e progressão tumoral, seja pelo silenciamento de genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes (SHARMA *et al.*, 2010).

A cromatina é um polímero carregado negativamente composto de DNA, histonas e outras proteínas associadas responsável pelo empacotamento do genoma. Sua unidade funcional básica é o nucleossomo, que é composto de aproximadamente 147 pares de base de DNA enrolados 1,8 vezes em volta de octâmeros de histonas, sendo elas normalmente de duplas de H2A/H2B e de H3/H4. Outros 16 variantes de H2A, H2B e H3 podem substituir as histonas canônicas em casos especiais. Em termos gerais, a cromatina pode ser subdividida em duas regiões principais: 1) heterocromatina, que é altamente condensada e contém principalmente genes inativos; e 2) eucromatina, que é relativamente aberta e contém a maioria dos genes ativos (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

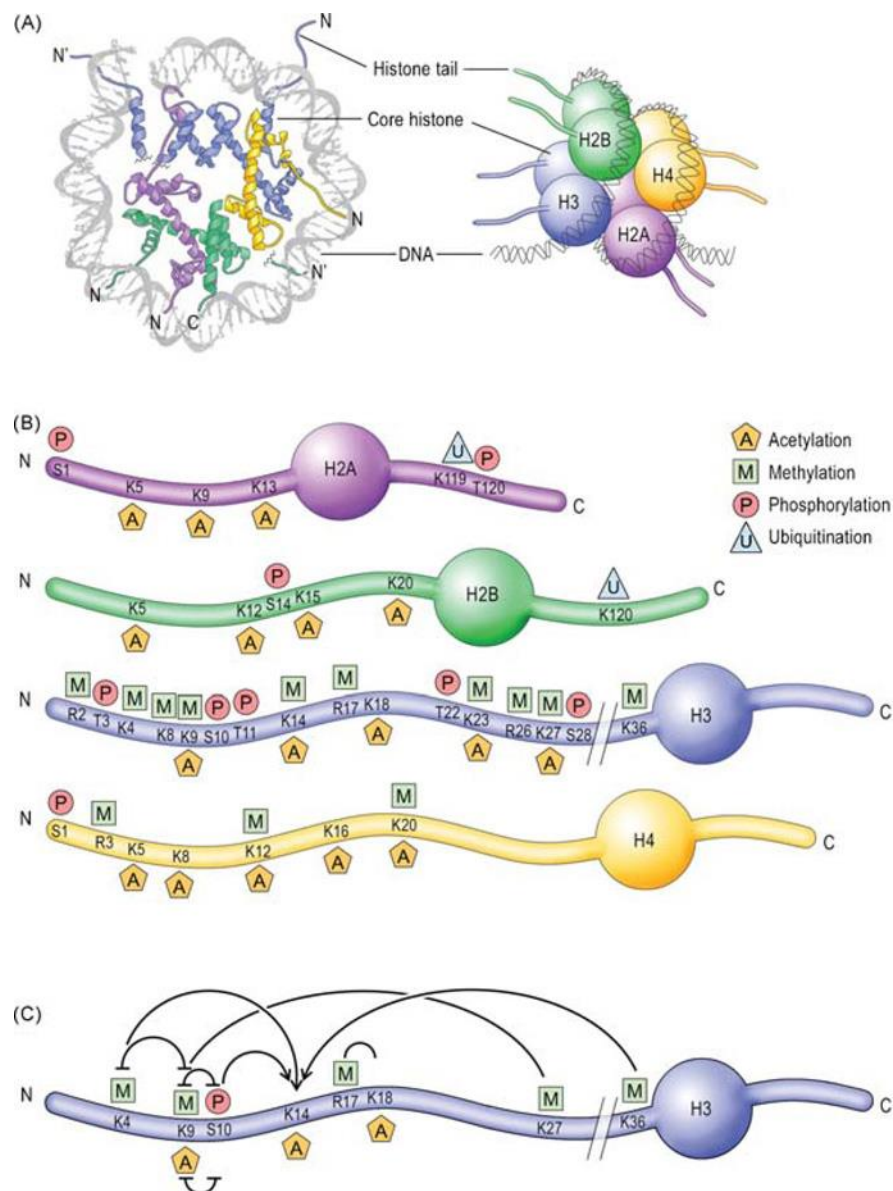
As modificações pós-traducionais das histonas ocorrem através de diversos processos, como acetilação e metilação, como mostra a figura 3. A acetilação de histonas é um processo dinâmico e altamente regulado pela ação contrária de duas diferentes famílias de enzimas, histonas acetiltransferases (HATs) e histonas deacetilases (HDACs). As HATs utilizam acetil-CoA como cofator e catalisam a transferência de um grupamento acetil ao grupo  $\epsilon$ -amino das cadeias laterais da lisina. Ao fazerem isso, provocam a neutralização da carga positiva da lisina e reduzem a interação das caudas de histonas com a carga negativa da estrutura açúcar-fosfato do DNA. Dessa forma, a cromatina é aberta e torna-se acessível para a transcrição. As HDACs, de forma contrária, opõem-se aos efeitos de acetilação e catalisam a deacetilação da lisina, provocando a restauração da carga positiva e da interação com o DNA. Elas funcionam, então, como grandes repressivos transcripcionais (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

A metilação de histonas, da mesma forma, ocorre comumente em resíduos de lisina na cauda das histonas. Existem três estados de metilação de lisinas: mono, di e tri metiladas (me1, me2 e me3, respectivamente), sendo catalisadas por enzimas da família lisinas metiltransferases (KMTs), e nenhum deles provoca a alteração da carga eletrônica do resíduo. Diferente de outras modificações sofridas por histonas, que determinam estados ativos ou repressivos de cromatina, a metilação de histonas confere alterações na transcrição de acordo com a posição e estado de metilação. Geralmente, a metilação nas lisinas 4, 36 e 79 da histona 3, representados por H3K4, H3K36 e H3K79 são marcos de transcrição ativa, enquanto que a metilação de H3K9, H3K27 e H3K20 são associadas com o silenciamento da transcrição (HYUN *et al.*, 2017).

De forma contrária, a família das lisinas demetilases (KDMs) é responsável pela retirada dos grupamentos metil das lisinas. Existem oito subfamílias KDM (KDM1-8), que variam em

termos de sua estrutura e alvos de lisina. KDM1 contém um domínio de amina oxidase dependente de dinucleotídeo flavina adenina, que retira apenas marcas de mono e dimetilação. As subfamílias KDM2-8, por sua vez, contêm um domínio catalítico Jumonji C (JmjC) e removem as marcas de mono, di e trimetilação (STERLING *et al.*, 2020).

**Figura 3 – Modificações pós-traducionais de histonas.**



Fonte: Adaptado de Alberini, C.M, 2009.

A metilação do DNA, por fim, é realizada por três enzimas da família das DNA metiltransferases (DNMTs): DNMT1, DNMT3a e DNMT3b, e consiste na adição de um grupamento metil (-CH<sub>3</sub>) no 5º carbono dos resíduos de citosina que precedem os nucleotídeos de guanina, ligados entre si por ligações fosfato (CpG), levando à formação de 5-metilcitosina. Em células normais, têm-se um padrão global de metilação do DNA, com exceção das ilhas CpG, que normalmente permanecem demetiladas. Em células tumorais, em contrapartida, mantém-se um padrão global de hipometilação acompanhada por hipermetilação anormal de ilhas CpG associadas à promotores de genes repressores tumorais (KANWAL; GUPTA; GUPTA, 2015). A demetilação do DNA é dada pela conversão de 5-metilcitosina (5mC) em citosina (C). Apesar de ser um processo difícil e improvável devido à dificuldade da quebra de ligações carbono-carbono não ativadas, a demetilação pode sim ocorrer através da modificação de bases de DNA (BOCHTLER *et al.*, 2017).

A infinidade de modificações epigenéticas devem ser reconhecidas por proteínas com domínios de acoplamento especializados para mediar seus efeitos celulares (DAMIANI *et al.*, 2020). A acetilação de histonas é reconhecida, principalmente, por 8 famílias de bromodomínios especializadas em marcas de acetilação específicas (MARMORSTEIN *et al.*, 2014). As marcas de metilação em histonas, por sua vez, são lidas por uma infinidade de domínios proteicos, como Tandem Tudor domínios e cromodomínios. Por fim, a metilação do DNA é interpretada por três principais famílias de proteínas: a família do domínio de ligação CpG metil (MBD), proteínas do domínio SRA e proteínas dedo de zinco (ZnF), que, uma vez ligadas ao DNA metilado, iniciam o silenciamento gênico com a ajuda de outros fatores (BISWAS *et al.*, 2018).

Em contraste às alterações genéticas, as modificações epigenéticas são enzimaticamente reversíveis (MAZOR *et al.*, 2016), e por isso, acredita-se que as enzimas responsáveis pela remodelação da cromatina são excelentes alvos terapêuticos. Nos dias atuais, fármacos que agem através de alteração de vias epigenéticas, mesmo ainda sob investigação, já estão sendo utilizados na clínica, como os inibidores de metilação de DNA e inibidores de deacetilação de histonas. Os primeiros agem através da inibição de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e são representados pela Decitabina e Azacitidina. Ambos foram aprovados pela agência *Food and Drug Administration U.S* (FDA) para o tratamento de múltiplos subtipos de síndromes mielodisplásicas. Os segundos agem através da inibição de enzimas histonas deacetilases (HDACs), e, dentre eles, apenas o Vorinostat (SAHA) está aprovado pelo FDA para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (ELLIS; ATADJA; JOHNSTONE, 2009).

Além dos mencionados, outras classes de fármacos, como inibidores de KDMs e HATs, têm mostrado resultados promissores em monoterapia e em combinação com agentes citotóxicos, e estão em fase de testes (ARIFUZZAMAN; KHATUN; KHATUN, 2020);(MANZO *et al.*, 2009).

### 1.7.1 Histonas Deacetilases (HDACs)

As histonas deacetilases são enzimas responsáveis pela catálise da reação de deacetilação das lisinas das histonas, provocando silenciamento gênico. Elas podem ser classificadas em dois grande grupos: classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8) e classe II (HDAC4, HDAC65, HDAC6, HDAC7, HDAC9 e HDAC10). HDACs de classe I são enzimas nucleares dependentes de  $Zn^{2+}$  que desempenham um papel crucial na proliferação e diferenciação celular, resposta a danos no DNA e desenvolvimento de tecidos, enquanto que HDACs de classe II alternam sua localização entre núcleo e citoplasma e demonstram especificidade por tecidos (MILAZZO *et al.*, 2020);(KUNADIS *et al.*, 2021).

Visto que as modificações pós-traducionais das histonas modulam a estrutura da cromatina e a expressão gênica, não é surpreendente que anomalias na acetilação de histonas estejam associadas ao desenvolvimento do câncer. As HDACs podem ser mutadas, silenciadas, superexpressas ou recrutadas de formas aberrantes em células tumorais (HAGELKRUYS *et al.*, 2011). Hoje, sabe-se que a perda global da acetilação da lisina 16 e trimetilação da lisina 20 da histona H4 são alterações comuns no câncer humano. Além disso, entende-se também que essas anomalias influenciam, e muito, na sobrevida dos pacientes. Como exemplo, temos os baixos níveis de acetilação da lisina 18 da histona H3 (H3K18ac), alteração que prediz baixa sobrevida em cânceres de pâncreas, mama, próstata e pulmão. Paralelamente, a pesquisa mostra cada vez mais que a superexpressão de HDACs é frequentemente observada em inúmeros tipos tumorais (LI, Y.; SETO, 2016).

As HDACs 1 e 2 já demonstraram estar reguladas positivamente em linhagens de GBM em comparação à tecidos cerebrais não neoplásicos. A inibição de HDAC através de inibidores (HDACi) têm apresentado resultados promissores. Os benefícios do tratamento com HDACi podem ser dados por diversos processos celulares, como por exemplo: indução do relaxamento da cromatina e conseqüente favorecimento do acesso ao DNA pelos agentes quimioterápicos, reversão do silenciamento epigenético anormal de genes supressores tumorais, inibição da



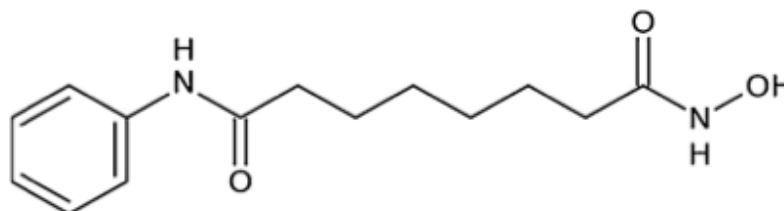
maquinaria de reparo do dano ao DNA, indução de apoptose pela regulação de genes pró- e anti-apoptóticos e ativação de várias proteínas quinases, incluindo ERK 1/2, que modulam o crescimento celular, diferenciação e apoptose (ZHANG *et al.*, 2016);(KUNADIS *et al.*, 2021). A inibição de HDACs tem como principal objetivo o restabelecimento da sensibilidade das células aos agentes primários e consequente superação da resistência à terapia.

Com base em sua especificidade, os HDACi podem ser classificados como pan-inibidores, atuando contra todos os tipos de HDAC, ou seletivos, para tipos específicos de HDACs. Um dos primeiros testes com inibidores ocorreu em 2005 com o Ácido Hidroxâmico Suberoilânilida (SAHA), que mostrou efeitos de radiosensibilização em estudos pré-clínicos quando combinado com TMZ.

O SAHA é um inibidor de moléculas pequenas da maioria das HDACs humanas de classe I e II (inibindo HDAC 1, 2, 3, 6 e 8) pertencente ao grupo dos ácidos hidroxâmicos (BEZECNY, 2014). Seu mecanismo de ação é dado pelo bloqueio do sítio catalítico da enzima, onde consegue quelar o íon zinco e inibir a desacetilação. Esse mecanismo provoca, consequentemente, um acúmulo de histonas hiperacetiladas e aumento da expressão gênica (MARKS *et al.*, 2001). Sua estrutura química está demonstrada na figura 4.

Estudos da atividade do SAHA em combinação com outras terapias antineoplásicas (incluindo radiação, inibidores de quinase, agentes citotóxicos e agentes de diferenciação) mostraram atividade sinérgica ou aditiva em uma variedade de linhagens celulares (RICHON, 2006). Atualmente, existem dois ensaios clínicos de fase I/II ativos com a combinação de SAHA e Temozolomida para o tratamento de GBM (NCT00268385 e NCT00731731) e podem ser consultados em [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

**Figura 4 – Estrutura química do inibidor de histonas deacetilases SAHA.**

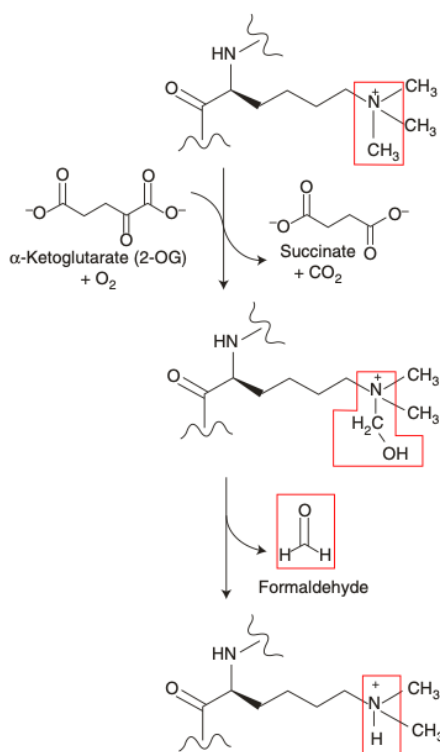


Fonte: Adaptado de *Bezecny et al.*, 2014.

### 1.7.2 KDM5A

A proteína demetilase específica de lisina 5A (KDM5A), também denominada proteína contendo domínio Jumonji/ARID 1A (JARID1A), é responsável pela remoção das marcas de di e tri metilação da quarta lisina da histona 3 (H3K4me2/3), que leva à repressão da transcrição. A KDM5A é muito importante na regulação do desenvolvimento e diferenciação celular. Em termos de mecanismo, KDM5A e seu gene de fusão dependente de Fe(II) catalisam a descarboxilação oxidativa de 2-oxoglutarato com consumo de O<sub>2</sub> para gerar um intermediário oxo de ferro(IV) reativo, dióxido de carbono e succinato. O grupo ferril altamente reativo então oxida a ligação C–N da metil-lisina, formando uma carbinolamina instável (produto oxidado) que se decompõe em formaldeído e lisina demetilada, como mostra a figura 5 (KIRTANA; MANNA; PATRA, 2020).

**Figura 5 – Reação de demetilação por KDM5A.**



Fonte: Adaptado de *Jambhekar et al.*, 2017.

A superexpressão de KDM5A em células de glioblastoma resistentes ao TMZ foi descoberta à poucos anos e a relação dessa superexpressão com a aquisição da resistência vem sendo estudada desde então (BANELLI *et al.*, 2015). Hoje, sabe-se que a alta expressão de KDM5A colabora para a proliferação e regeneração celular, em parte, através da regulação de Hoxa 9/10 e do fator de transcrição FOXM1 (ROMANI *et al.*, 2019).

As vias de demetilação de histonas como alvos terapêuticos surgiram recentemente como uma estratégia promissora no tratamento do câncer. Vários inibidores de histonas lisinas demetilases foram descritos, e alguns deles progrediram para ensaios clínicos. Um grande obstáculo no desenvolvimento de inibidores de demetilase parece ser a obtenção de compostos verdadeiramente seletivos para uma subfamília (por exemplo, KDM5) que não são ativos em outras subfamílias. Apenas alguns dos compostos relatados mostram uma seletividade razoável (JAMBHEKAR; ANASTAS; SHI, 2017). O CPI-455 é um dos únicos inibidores seletivos de KDM5, com IC50 de 10nM para KDM5A. Ele provoca um aumento global nos níveis de H3K4me3 e já demonstrou diminuir o número de células persistentes tolerantes em várias linhagens celulares tratadas com quimioterápicos (VINOGRADOVA *et al.*, 2016).

## 1.8 JUSTIFICATIVA

O glioblastoma multiforme (GBM) é tumor primário cerebral mais comum e agressivo em adultos. Apesar do tratamento de primeira linha, que consiste em ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia com Temozolomida, a sobrevida média dos pacientes é de 14 meses. A baixa taxa de sobrevida deve-se, principalmente, à heterogeneidade genética e epigenética desse tumor, que abriga células com diferentes níveis de sensibilidade à terapia.

A flutuação da expressão gênica de proteínas pode contribuir com a grande variabilidade fenotípica que permite a seleção de estados tolerantes à quimioterapia, seja através da superexpressão de oncogenes ou silenciamento de genes pró-apoptóticos. A expressão gênica é fortemente regulada por mecanismos epigenéticos, como metilação e acetilação de histonas. Nesse sentido, a terapia com inibidores de enzimas modificadoras de histonas surgiram com o propósito de induzir estados fenotípicos mais homogêneos e aumentar a eficácia do tratamento através da redução da heterogeneidade intratumoral de resposta ao agente citotóxico.

A descoberta da superexpressão das enzimas HDACs e KDM5A em células de glioblastoma resistentes ao TMZ fez com que elas se tornassem promissores alvos terapêuticos. Dessa forma, no presente trabalho exploraremos o efeito da inibição dessas duas enzimas em combinação com TMZ comparado ao TMZ em monoterapia na indução de senescência e heterogeneidade da área nuclear em células únicas, visando verificar se a combinação dos moduladores é capaz de homogeneizar o tamanho nuclear e encontrar respostas para a ressensibilização das células à terapia.

## **1.9 OBJETIVOS**

### **1.9.1 Objetivo geral**

Homogeneização da resposta celular de área nuclear em células de glioblastoma através do tratamento com inibidores de HDACs e KDM5A e temozolomida.

### **1.9.2 Objetivos específicos**

- a) Quantificação da área nuclear de células únicas tratadas com Temozolomida 50 $\mu$ M, Saha 0,5 $\mu$ M e CPI-455 1 $\mu$ M através da marcação fluorescente presente no plasmídeo Apple-53BP1trunc;
- b) Análise da indução de senescência com moduladores epigenéticos combinados com Temozolomida;

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Variance in clonogenic senescence induction in glioblastoma” foi formatado conforme normas para publicação do periódico *Clinical Epigenetics* (Anexo A).

1 **Epigenetic modulation as a tool for nuclear area homogenization in**  
2 **glioblastoma**

3 Carolina N. Santo<sup>1</sup>, Jephesson A.F. Santos<sup>1,2</sup>, Guido Lenz<sup>1,2\*</sup>

4

5

6 <sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre,  
7 Rio Grande do Sul, Brazil.

8 <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio  
9 Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

10

11

12 \*Corresponding Author

13 Guido Lenz

14 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

15 Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43431, sala 107, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-  
16 970, Brasil.

17 Telefone: +55 51 33087620

18 Email: [lenz@ufrgs.br](mailto:lenz@ufrgs.br)

19

## 20 Abstract

21 **Background:** Glioblastoma multiforme (GBM) has a median survival around 14 months. The  
22 poor prognosis is mostly given by the acquisition of resistance to Temozolomide, an alkylating  
23 agent used as standard therapy. Resistance is due to the genetic and epigenetic heterogeneity of  
24 this tumor, since cells have widely distinct responses to TMZ. Several phenotypes that impact  
25 on cancer cell survival and proliferation are reversible. In this way, epigenetic therapy, as  
26 HDAC and KDM5A inhibitors, arouse as a therapeutic strategy to decrease intratumoral  
27 heterogeneity and resensitize cells to chemotherapy. Here we use KDM5A and HDAC  
28 inhibitors to explore their capacity to sensitize GBM cells to senescence and homogenate  
29 nuclear size among cells in colonies by single-cell analysis.

30 **Results:** Our tool for nuclear area heterogeneity analysis was able to identify and distinguish  
31 normal nuclear areas of senescence cells. Our preliminary evidence indicate that the  
32 combination of KDM5A inhibitor (CPI-455) and Temozolomide showed a little increase on  
33 senescence cells compared to TMZ alone during and after treatment on A172 GBM cell line at  
34 a colony level. HDAC inhibitor (SAHA) combined with TMZ decreased nuclear area  
35 heterogeneity among cells in colonies during treatment, improve cell death and shows an small  
36 nuclear area average on colonies. In the other hand, the combination of SAHA, CPI-455 and  
37 TMZ increased homogeneity after treatment, also with a smaller nuclear area average and  
38 decreased cell proliferation.

39 **Conclusion:** KDM5A and HDAC inhibition in combination with standard therapy have  
40 promising effects on glioblastoma cells homogenization, but the mechanisms underlying these  
41 homogenization are still unknown. More studies with a bigger sample are needed to evaluate  
42 what the real mechanism behind SAHA senescence decrease and CPI-455 on senescence  
43 improvement.

44 **Keywords:** glioblastoma, cancer, epigenetics, KDM5A, histone deacetylase, temozolomide

45

46

47

## 48 **Background**

49           Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults.  
50   Despite the multimodal treatment consisting of surgical debulking followed by radiotherapy  
51   and chemotherapy with Temozolomide (TMZ), the GBM patients prognosis remains poor, with  
52   a median survival around 14 months and a 5-year survival rate about 7.2% [1]. TMZ is an oral  
53   alkylating agent that induced a limited but significant improvement of survival on GBM  
54   patients. His cytotoxic effect is given by the formation of O<sup>6</sup>-methylguanine, which mismatches  
55   with thymine in subsequent DNA replication cycles, leading to different cellular outcomes,  
56   such as autophagy, apoptosis and senescence [2,3] .

57           The emergence of TMZ resistance is the main responsible for therapeutic failure and  
58   tumor relapse. The lack of successful therapy is often assigned to the genetic and epigenetic  
59   heterogeneity of this tumor. Within the mass, distinct cell populations have unique properties  
60   of drug response [4]. To understand why we have different outcomes whit the same treatment  
61   in different cells on a population, like cell death, senescence and proliferation, we will need to  
62   know every single change of behavior, such as gene expression, signaling pathways and  
63   metabolic functions of each cell within the tumor. Therefore, it is important to investigate  
64   different ways of cells variance by single-cell analysis and discover how they can be clinical  
65   relevant [5].

66           We can evaluate how heterogeneous the phenotype of tumor cells can be through the  
67   measure of nuclear size before and after treatment. The nuclear area can provide answers about  
68   cell state, like senescence, apoptosis and mitosis. During apoptosis, the nucleus is condensed  
69   and fragmentated. On senescence state, we observe an increased nuclear size. In other hand, the  
70   nucleus during mitosis shows to be smaller than normal [6]. To analyze nuclear morphology, it



71 is needed nuclear markers, such as 53BP1, to help us localize and measure the nucleus. 53BP1  
72 is a protein recruit to DNA damage sites right after the lesion [7].

73 We already know that TMZ-induced DNA damage triggers complex cellular DNA  
74 damage responses (DDR), which determine the fate of the cell, making the decision between  
75 survival and death. This decision depends on cell cycle phase, chromatin state and DNA  
76 damage repair enzymes expression and reflects on TMZ effectiveness.

77 The main intent of epigenetic therapy is reprogram the epigenome and change the cell  
78 landscape by interfering on acetylation and methylation processes. The post-translational  
79 modifications (PTMs), such as methylation and acetylation, of core histone proteins  
80 significantly regulate gene expression [8]. The addition or removal of PTMs from histone tails  
81 is a dynamic, and generally reversible, process. For this reason, in the last few decades,  
82 modifying enzymes have emerged as excellent therapeutic targets with promising outcomes  
83 [9].

84 The hope in targeting the main characters of the dynamic and reversible nature of  
85 epigenetic changes, such as histones deacetylases and demethylases, is decrease the variability  
86 among cells on a population. This kind of therapy could also provide the resensibilization of  
87 cells to chemotherapy by retrieve benign cell functions via re-expression of specific genes [10].

88 In this study, we will investigate how inhibitors of two GBM overexpressed enzymes,  
89 HDACs [11] and KDM5A [12], can interfere on the nuclear size and how homogeneous can  
90 the colonies become with epigenetic therapy. This type of phenotype evaluation could provide  
91 golden information about chemotherapy resistance.

92

## 93 Results

### 94 The combination of epigenetic inhibitors and TMZ alters senescence cells proportion 95 during and after treatment compared to TMZ alone

96 As previously reported, the measure of nuclear area can provide information about the  
97 cell state. To evaluate the induction of senescence on TMZ monotherapy and combined with  
98 epigenetic modulators, two different epigenetic inhibitors were used: Vorinostat (Saha), that  
99 competitively inhibits with high affinity HDACs 1 and 2, and CPI-455, who specifically inhibit  
100 KDM5A, an H3K4me2/3 demethylase. Clonogenic assays were performed (**Fig. 1A**) and  
101 colonies sizes 2 and 3 (CS2 and CS3) were analyze with the tool Nuclear Morphometric  
102 Analysis (NMA) [6], that classifies normal and senescence cells through nuclear size (**Fig. 1B-**  
103 **C**). The results shows an small increase of senescent cells proportion on colonies treated with  
104 CPI-455 + TMZ and Saha + CPI-455 + TMZ compared to TMZ alone on CS2 and CS3 (**Fig.**  
105 **2A-B**). In other hand, the combination of Saha + TMZ showed a higher decrease on senescence  
106 cells proportion, during and after treatment (**Fig. 1B-C**).

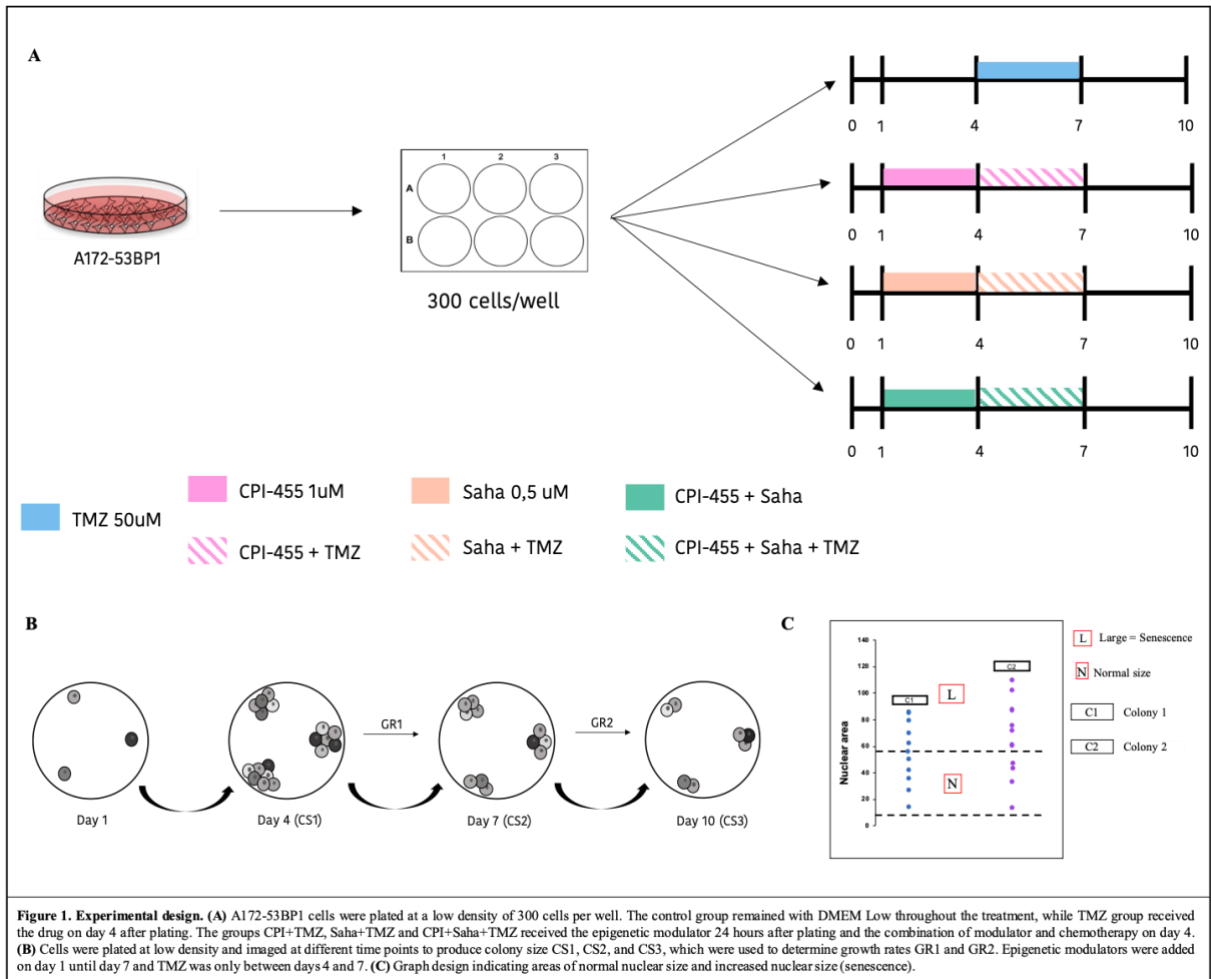
107 The growth rate between days 4 and 7, during treatment, analysis shows less  
108 proliferation on cells treated with CPI + TMZ and CPI + Saha + TMZ compared to TMZ alone  
109 (**Fig. 1D**). In other hand, growth rate between days 7 and 10, after treatment, shows an  
110 decreased proliferation on all epigenetic modulators group compared to TMZ alone (**Fig. 3E**).

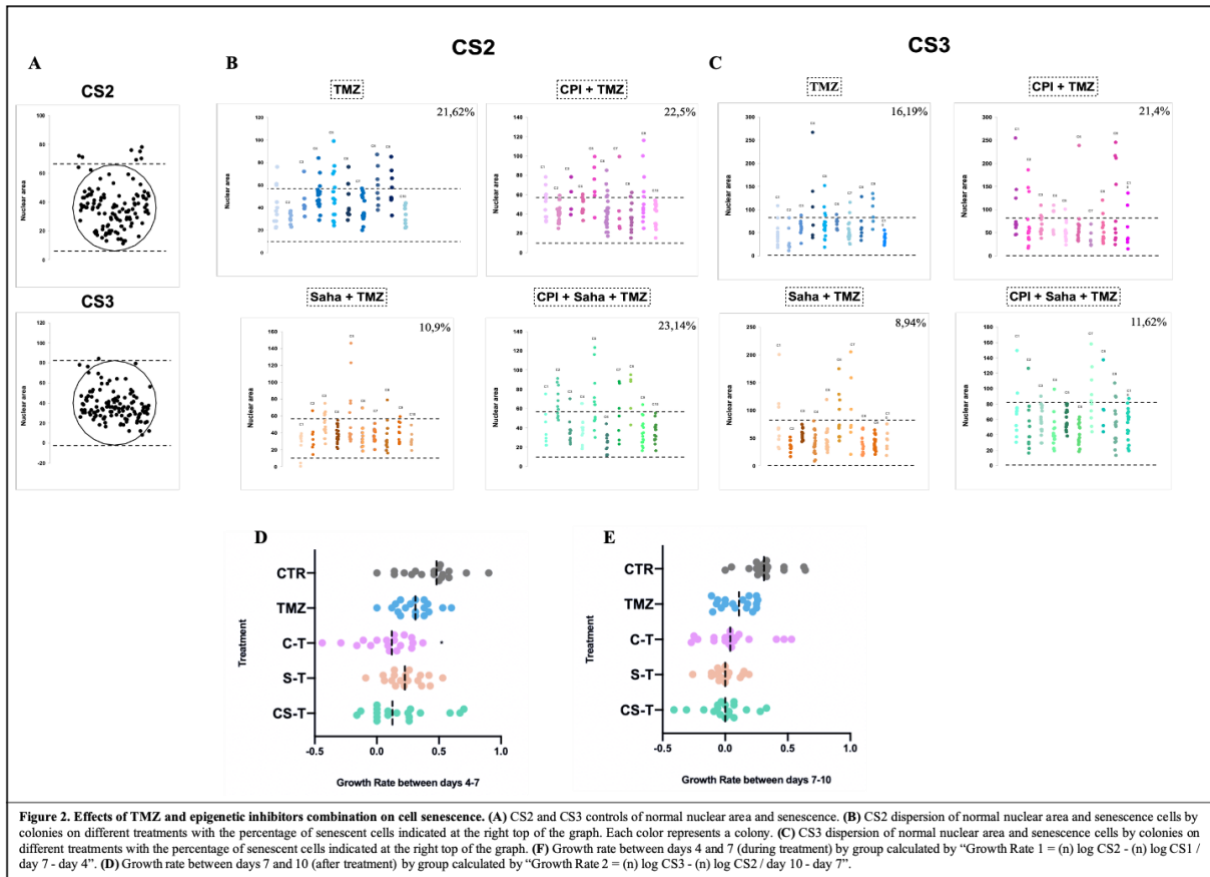
111

112

113

114





116

117

118 **The inhibition of HDACs and KDM5A in combination with TMZ therapy reduced the**  
 119 **nuclear size heterogeneity among cells in colonies**

120

121

122

123

124

125

126

With the attempt to further explore the variance of nuclear size among cells in colonies, we performed the nuclear size average and the coefficient of variation analysis among cells in colonies. To interpret these results, we used the rationale that, when we have a colony with normal cells and senescent cells, we will obtain a high variance of nuclear size and the colony will be heterogeneous (**Fig. 3A**). Otherwise, when we have colonies all normal or all senescent, the nuclear area average will be small or large, respectively, but the coefficient of variation will be small, as the colony will be homogeneous (**Fig. 3B**).

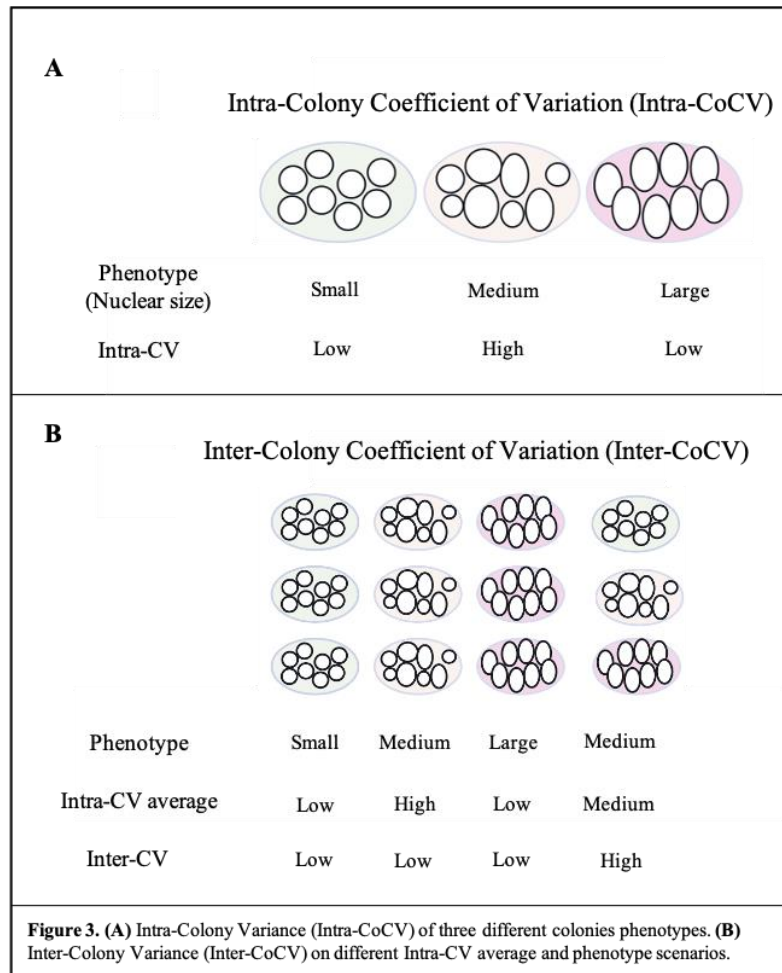
127

128

Preliminary data to indicate this rationale can be seen in Figure 3. Important to mention

129

that these results only indicate the rationale of analysis, as they did not reach the necessary



130

number of repeats to draw conclusions. The results shows an decrease in the Intra-CoCV of

131

nuclear sizes on cells treated with Saha + TMZ at CS2 compared to TMZ alone but a high

132

variance between colonies in the group, suggesting that we can have homogeneous as well as

133

heterogeneous colonies. Besides that, the combination of Saha and TMZ also shows the smaller

134

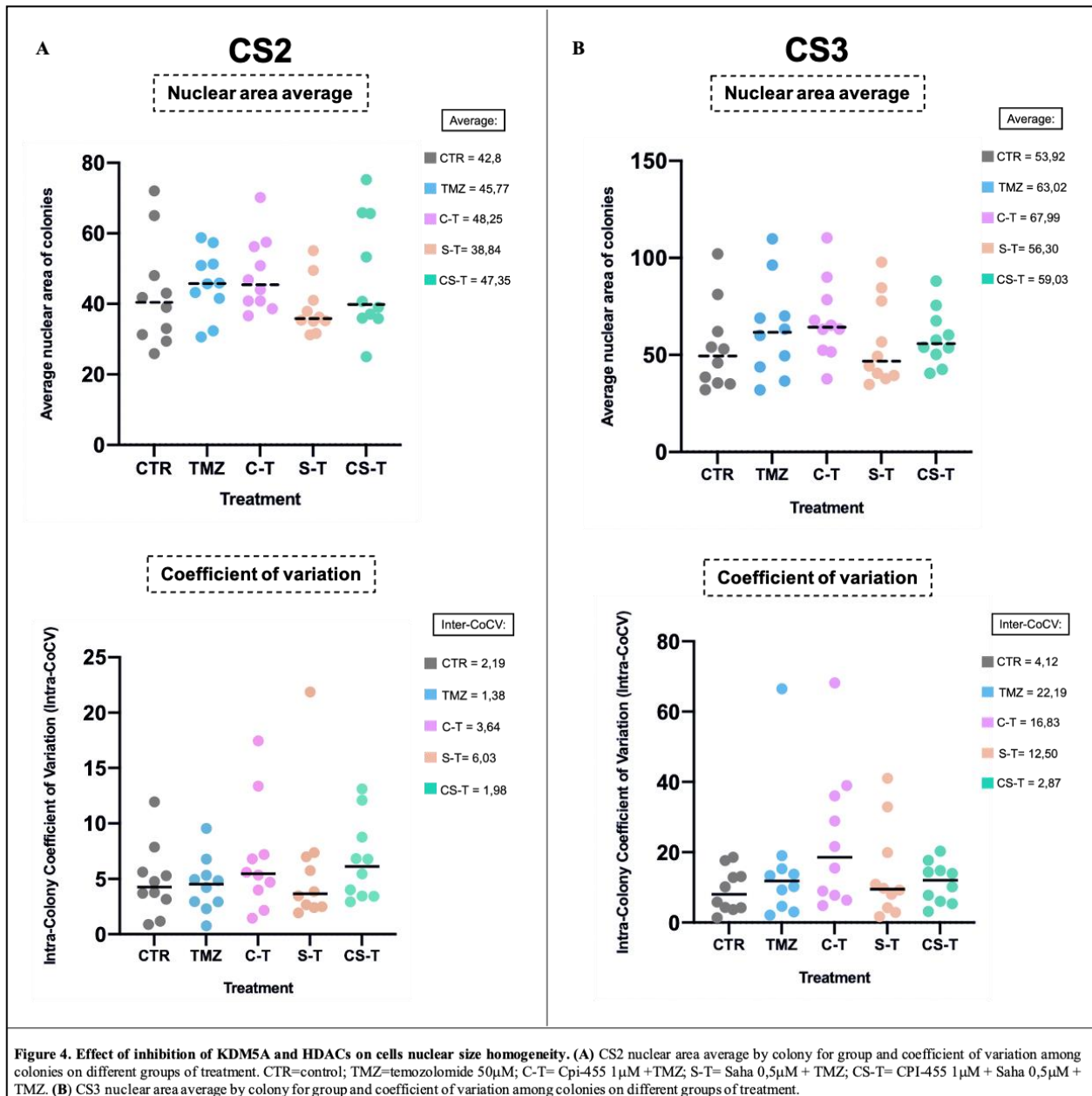
nuclear area average (**Fig. 4A**). On CS3, the combination of CPI + Saha + TMZ exhibits lower

135

coefficient of variation and the smaller Inter-CoCV compared to CPI and Saha alone with TMZ,

136 suggesting an homogenization of nuclear size after treatment. Besides that, CS-T also shows a  
 137 small nuclear area average, but not smaller than Saha + TMZ (Fig. 4B).

138



139

## 140 Discussion

141 A scenario in which all cells in a colony derived from a single cell have a similar  
 142 phenotype would improve the chance of designing combination therapies to eliminate all cells.

143 But in cancer, cells within a tumor have different phenotypes and thus responds differently to  
144 the same drug. The constantly changed epigenome landscape is part of this complex scenario.  
145 Single-cell analysis is in important way to understand the intratumoral heterogeneity. The  
146 development of a tool that is able to calculate variation among cells in colonies could be very  
147 helpful on understanding simple behavior changes within a tumor [13]. Our tool was able to  
148 indicate homogeneity and heterogeneity of nuclear area phenotype in colonies through measure  
149 of nuclear area average, coefficient of variation and senescent cells proportion. To do that, we  
150 adapted the tool developed by Fillipi-Chiela *et al.*, 2012 [6], that was created to analyze nuclear  
151 area and nuclear irregularities, to only nuclear area analysis. After measuring of nuclear area,  
152 we calculate the nuclear area average by colony for each treatment. After that, we calculate  
153 focused our attention on the coefficient of variation of the nuclear area in colonies (Intra-CoCV)  
154 as a way to determine the homogeneity of response, at least in regard to this phenotype, of the  
155 cells to TMZ.

156 If a colony presents a high intra-CoCV, more heterogeneous cell will be, despite its  
157 genetic similarity. Otherwise, a colony with small intra-CoCV represents a homogeneous  
158 colony. Another way to measure single-cell heterogeneity is by conventional genome-wide  
159 techniques for measuring gene expression, such as DNA microarrays and next-generation RNA  
160 sequencing (RNA- seq) or bulk-cell epigenomic methods, such as chromatin  
161 immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq), that provides average profiles of  
162 histone modifications of many cells [14].

163 Overexpression of HDACs I and II on glioblastoma are shown to be correlated with  
164 tumor progression. In the last few decades, HDAC inhibition by different HDACi was emerge  
165 as a promising therapeutic strategy. Here, we demonstrate preliminary results that suggests that  
166 treatment with Saha and TMZ decreased senescence induction compared to TMZ alone,

167 homogenate nuclear area among cells in colonies and have a smaller growth rate. Open  
168 chromatin state caused by HDAC inhibition already shows to be a potent inducer of tumor cell  
169 apoptosis. However, it remains unclear why tumor cells are more sensitive to HDACi-induced  
170 cell death than TMZ induced apoptosis [15]. S-T apparently reduced the intra-CoCV, but the  
171 interpretation of intra-CoCV and especially inter-CoCV requires an careful analysis of outliers  
172 as their presence have enormous impacts in the two values. Therefore, more studies are needed  
173 to evaluate the impact of HDAC inhibition in combination with TMZ on different types of cell  
174 death.

175         The preliminary results obtained suggest that inhibition of KDM5A may potentiate the  
176 cytotoxic and/or cytostatic effect of TMZ, but apparently it increased the intra-CoCV. Zeng et  
177 al., 2010 [16] already shows that depletion of KDM5A induce senescence on gastric and  
178 cervical tumor cells. The combination of CPI-455 and Temozolomide was not explored on the  
179 senescence field, but already shows to inhibit proliferation on resistant glioblastoma cells  
180 [17,9]. Inhibit KDM5A increase gene expression, without taking the H3K4me2/3 off. One  
181 possibility to be explored is that KDM5A increased the expression of senescence genes.

## 182 **Conclusions**

183         Glioblastoma patients prognosis remains poor and new therapeutic approaches are  
184 needed. The variation analysis among cells in a single-cell level is the best way to understand  
185 tumors behavior. Here, we demonstrate the rationale to explore heterogeneity in colonies as a  
186 strategy to analyze the impact of treatments in the variation of response of cells to therapy. The  
187 capacity of homogenization of phenotypes through reversion of epigenetic changes and largest  
188 cell death should be better explored.

189



## 190 **Methods**

### 191 **Cell culture**

192 Human A172 glioblastoma cells (ATCC, CRL-1620) already transduced with 53BP1 plasmid  
193 (Addgene #69531) were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)  
194 supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin and 0,1% amphotericin  
195 B. Cells were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% filtered air.

### 196 **Clonogenic Assays**

197 A172-53BP1 cells were plated on a 6-well Kasvi plate on a density of 300 cells per well  
198 to monitor the colonies formation from a single-cell. Beyond the control group, which remained  
199 with DMEM Low throughout the treatment, there was four groups of treatment: Saha (Sigma-  
200 Aldrich SML0061) 0.5 µM + TMZ 50 µM; CPI-455 (Axon Medchem - 2573) 1 µM + TMZ 50  
201 µM; Temozolomide 50 µM; Saha 0.5 µM + CPI-455 1 µM + TMZ 50 µM. Groups 1 and 2  
202 received the modulators one day after plating and remained in contact with them until the  
203 seventh day. The TMZ was added in combination on day 4 and remained until 7 day too. Group  
204 3 received the chemotherapy on day 4 and the treatment lasted for 3 days. Finally, group 4 was  
205 treated with the epigenetic modulators on day one until day 7, and the TMZ was added in  
206 combination on day 4. Photos are taken on IncuCyte® on days 4, 7 and 10 in 4 and 20 times  
207 magnification on original phase and red phase.

### 208 **Nuclear Area Analysis**

209 The nuclear area was quantified cell by cell through ImageJ®. ImageJ® measures the  
210 nuclear size by pixels and turns into a number. Photos with 4x magnification were used. The  
211 nuclear area quantification provide data to several analysis. The variance of nuclear area in

212 every colony was calculate by the formula  $V = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n-1}$ , which shows how distant each cell is  
213 from the average, while coefficient of variation was calculated by variance of colony divided  
214 by the nuclear area average. Analysis of growth rate 1 and 2 are made to complement the data  
215 obtained by nuclear area analysis.

216 To validate our findings, we use the tool Nuclear Morphometric Analysis (NMA) (6),  
217 which is able to indicate the proportion of cells in senescence or with normal nuclear size in a  
218 cell population *in vitro* based in nuclear morphology.

## 219 **Statistical Analysis**

220 The statistical analysis was made by Ordinary one-way ANOVA test with Tukey's  
221 multiple comparisons on Prism9®. "p" value under 0,05 was considered significant.

## 222 **Abbreviations**

223 CV – Coefficient of Variation

224 GBM – Glioblastoma

225 HDACs – Histone deacetylases

226 KDM5A – Lysine specific demethylase 5A

227 NMA – Nuclear Morphometric Analysis

228 PTMs – Histone post-translational modifications

229 SAHA - Vorinostat

230 TMZ – Temozolomide

231

## 232 **Declarations**

233 **Ethics approval and consent to participate**

234 Not applicable

235 **Consent for publication**

236 Not applicable

237 **Availability of data and materials**

238 All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary  
239 information files].

240 **Competing interests**

241 The authors declare that they have no competing interests

242 **Funding**

243 This work was supported by FAPERGS-Pronex and FAPERG-FAPESP. G. Lenz receive CNPq fellowship.  
244 and J.A.F. Santos receive CAPES fellowship.

245 **Authors' contributions**

246 CNS wrote the manuscript; JAFS and GL reviewed and edited the manuscript. All authors have read and  
247 agreed to the published version of the manuscript. All figures are original.

248 **Acknowledgments**

249 We wish to thank Julieti Buss for the performance of A172 transduction with 53BP1. The Apple-53BP1trunc  
250 was a gift from Ralph Weissleder (Addgene plasmid #69531).

251 **References**

- 252 1. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical  
253 Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States  
254 in 2013–2017. *Neuro-Oncology* [Internet]. 2020 Oct 30 [cited 2021 Mar  
255 23];22(Supplement\_1):iv1–96. Available from: [https://academic.oup.com/neuro-  
256 oncology/article/22/Supplement\\_1/iv1/5943281](https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/22/Supplement_1/iv1/5943281)

- 257 2. Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won?  
258 Cancer Biology & Therapy [Internet]. 2019 Aug 3 [cited 2020 Aug 10];20(8):1083–90. Available  
259 from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2019.1599662>
- 260 3. Knizhnik AV, Roos WP, Nikolova T, Quiros S, Tomaszowski K-H, Christmann M, et al. Survival  
261 and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a  
262 Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage. Borgmann K, editor. PLoS ONE [Internet].  
263 2013 Jan 30 [cited 2021 Apr 4];8(1):e55665. Available from:  
264 <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055665>
- 265 4. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat Rev Clin  
266 Oncol [Internet]. 2018 Feb [cited 2020 Jan 30];15(2):81–94. Available from:  
267 <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2017.166>
- 268 5. Qian M, Wang DC, Chen H, Cheng Y. Detection of single cell heterogeneity in cancer. Seminars  
269 in Cell & Developmental Biology [Internet]. 2017 Apr [cited 2020 Feb 18];64:143–9. Available  
270 from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952116302877>
- 271 6. Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, Silva VD da, Lenz G.  
272 Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear  
273 Irregularities. Lebedeva IV, editor. PLoS ONE [Internet]. 2012 Aug 8 [cited 2021 Mar  
274 31];7(8):e42522. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042522>
- 275 7. FitzGerald JE, Grenon M, Lowndes NF. 53BP1: function and mechanisms of focal recruitment.  
276 Biochemical Society Transactions [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2020 Jan 30];37(4):897–904.  
277 Available from: [https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/37/4/897/64665/53BP1-](https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/37/4/897/64665/53BP1-function-and-mechanisms-of-focal-recruitment)  
278 [function-and-mechanisms-of-focal-recruitment](https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/37/4/897/64665/53BP1-function-and-mechanisms-of-focal-recruitment)
- 279 8. Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their  
280 implications in cancer therapy. European Journal of Pharmacology [Internet]. 2018 Oct [cited 2020  
281 Aug 18];837:8–24. Available from:  
282 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299918304667>
- 283 9. Miranda Furtado CL, Dos Santos Luciano MC, Silva Santos RD, Furtado GP, Moraes MO, Pessoa  
284 C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. Epigenetics [Internet]. 2019 Dec 2  
285 [cited 2021 Feb 27];14(12):1164–76. Available from:  
286 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15592294.2019.1640546>
- 287 10. Gong L, Yan Q, Zhang Y, Fang X, Liu B, Guan X. Cancer cell reprogramming: a promising  
288 therapy converting malignancy to benignity. Cancer Communications [Internet]. 2019 Dec [cited  
289 2021 Mar 25];39(1):48. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1186/s40880-019-0393-5>
- 290 11. Zhang Z, Wang Y, Chen J, Tan Q, Xie C, Li C, et al. Silencing of histone deacetylase 2 suppresses  
291 malignancy for proliferation, migration, and invasion of glioblastoma cells and enhances  
292 temozolomide sensitivity. Cancer Chemother Pharmacol [Internet]. 2016 Dec [cited 2021 Mar  
293 17];78(6):1289–96. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-016-3188-2>
- 294 12. Banelli B, Daga A, Forlani A, Allemanni G, Marubbi D, Pistillo MP, et al. Small molecules  
295 targeting histone demethylase genes (KDMs) inhibit growth of temozolomide-resistant  
296 glioblastoma cells. Oncotarget [Internet]. 2017 May 23 [cited 2021 Feb 27];8(21):34896–910.  
297 Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.16820>
- 298 13. Lenz LS, Faccioni JL, Bracco PA, Santos JAF, Pereira LC, Buss JH, et al. Cancer Cell Fitness Is  
299 Dynamic. Cancer Res [Internet]. 2021 Feb 15 [cited 2021 Apr 11];81(4):1040–51. Available from:  
300 <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488>
- 301 14. Carter B, Zhao K. The epigenetic basis of cellular heterogeneity. Nat Rev Genet [Internet]. 2021  
302 Apr [cited 2021 Apr 5];22(4):235–50. Available from: [http://www.nature.com/articles/s41576-](http://www.nature.com/articles/s41576-020-00300-0)  
303 [020-00300-0](http://www.nature.com/articles/s41576-020-00300-0)
- 304 15. Bolden JE, Shi W, Jankowski K, Kan C-Y, Cluse L, Martin BP, et al. HDAC inhibitors induce  
305 tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. Cell Death Dis [Internet]. 2013 Feb  
306 [cited 2021 Apr 5];4(2):e519–e519. Available from: <http://www.nature.com/articles/cddis20139>
- 307 16. Zeng J, Ge Z, Wang L, Li Q, Wang N, Björkholm M, et al. The Histone Demethylase RBP2 Is  
308 Overexpressed in Gastric Cancer and Its Inhibition Triggers Senescence of Cancer Cells.  
309 Gastroenterology [Internet]. 2010 Mar [cited 2021 Apr 4];138(3):981–92. Available from:  
310 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509017764>
- 311 17. Romani M, Daga A, Forlani A, Pistillo MP, Banelli B. Targeting of Histone Demethylases  
312 KDM5A and KDM6B Inhibits the Proliferation of Temozolomide-Resistant Glioblastoma Cells.

313 Cancers [Internet]. 2019 Jun 24 [cited 2021 Feb 27];11(6):878. Available from:  
314 <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/6/878>  
315

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente trabalho, foi possível concluir que a análise a nível de células únicas da variância da heterogeneidade de fenótipos é uma importante ferramenta para a compreensão da resposta celular à Temozolomida. Além disso, concluímos que inibidores epigenéticos podem alterar a heterogeneidade da resposta, embora a importância disto na resposta terapêutica ainda está em aberto. Porém, fazem-se necessários estudos em larga escala sobre seus mecanismos de indução de morte celular ou senescência.

Como perspectivas, iremos avaliar os efeitos da inibição de KDM5A e HDACs na homogeneização do fenótipo de tamanho nuclear com um “n” amostral maior, visando aumentar a confiabilidade dos dados obtidos. Em sequência, pretendemos avaliar os efeitos dos inibidores no fenótipo de resposta ao dano ao DNA, buscando obter uma homogeneização de resposta ao dano causado pelo TMZ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLAND, Dorthé *et al.* Temozolomide Induces Senescence and Repression of DNA Repair Pathways in Glioblastoma Cells via Activation of ATR–CHK1, p21, and NF-κB. **Cancer Research**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 99–113, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1733>.

ALBERINI, Cristina M. Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 121–145, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2008>.

AL-DIMASSI, S.; ABOU-ANTOUN, T.; EL-SIBAI, M. Cancer cell resistance mechanisms a mini review. **Clinical and Translational Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 511–516, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12094-014-1162-1>.

APARICIO, Tomas; BAER, Richard; GAUTIER, Jean. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. **DNA Repair**, [s. l.], v. 19, p. 169–175, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.014>.

ARIFUZZAMAN, Sarder; KHATUN, Mst Reshma; KHATUN, Rabeya. Emerging of lysine demethylases (KDMs): From pathophysiological insights to novel therapeutic opportunities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 129, p. 110392, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110392>.

AUBREY, Brandon J *et al.* How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53 mediated tumour suppression? **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 104–113, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.

BANELLI, Barbara *et al.* Small molecules targeting histone demethylase genes (KDMs) inhibit growth of temozolomide-resistant glioblastoma cells. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 21, p. 34896–34910, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16820>.

BANELLI, Barbara *et al.* The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 14, n. 21, p. 3418–3429, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1090063>.

BANNISTER, Andrew J; KOUZARIDES, Tony. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.

BÁRTOVÁ, Eva *et al.* A role of the 53BP1 protein in genome protection: structural and functional characteristics of 53BP1-dependent DNA repair. **Aging**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 2488–2511, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.101917>.

BATASH, Ron *et al.* Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 24, n. 27, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867324666170516123206>.

BEZECNY, Pavel. Histone deacetylase inhibitors in glioblastoma: pre-clinical and clinical

experience. **Medical Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 985, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0985-5>.

BISWAS, Subhankar; RAO, C. Mallikarjuna. Epigenetic tools (The Writers, The Readers an The Erasers) and their implications in cancer therapy. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 837, p. 8–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/arr>.

BOCHTLER, Matthias; KOLANO, Agnieszka; XU, Guo-Liang. DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. **BioEssays**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. e201600178, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bies.201600178>.

BURKHART, Deborah L.; SAGE, Julien. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 671–682, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2399>.

CHEN, Ricky *et al.* Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 284–297, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0519x>.

DAGOGO-JACK, Ibiayi; SHAW, Alice T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 81–94, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>.

DAMIANI, Elisabetta *et al.* Targeting Epigenetic ‘Readers’ with Natural Compounds for Cancer Interception. **Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 189–203, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15430/JCP.2020.25.4.189>

DAWSON, Mark A.; KOUZARIDES, Tony. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. **Cell**, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 12–27, 2012. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.

DU, Zhenfang; LOVLY, Christine M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 58, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.

ELLIS, L.; ATADJA, P. W.; JOHNSTONE, R. W. Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1409–1420, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0860>.

FORTE, Iris *et al.* Targeted therapy based on p53 reactivation reduces both glioblastoma cell growth and resistance to temozolomide. **International Journal of Oncology**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4788>.

GIACINTI, C; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, [s. l.], v. 25, n. 38, p. 5220–5227, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>.

HAGELKRUY, Astrid *et al.* The Biology of HDAC in Cancer: The Nuclear and Epigenetic Components. In: YAO, Tso-Pang; SETO, Edward (org.). **Histone Deacetylases: the Biology**



**and Clinical Implication.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. (Handbook of Experimental Pharmacology). v. 206, p. 13–37. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/9783-642-21631-2\\_2](https://doi.org/10.1007/9783-642-21631-2_2).

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HASHIMOTO, Hideharu; VERTINO, Paula M; CHENG, Xiaodong. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. **Epigenomics**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 657–669, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/epi.10.44>.

HERNANDEZ-SEGURA, Alejandra; NEHME, Jamil; DEMARIA, Marco. Hallmarks of Cellular Senescence. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 436–453, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.

HERRANZ, Nicolás; GIL, Jesús. Mechanisms and functions of cellular senescence. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 1238–1246, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI95148>.

HICKMAN, E. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 60–66, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(01\)00265-9](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(01)00265-9).

HIRATA, Eishu; SAHAI, Erik. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. a026781, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026781>.

HOEIJMAKERS, Jan H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, [s.l.], v. 411, n. 6835, p. 366–374, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35077232>. HORNE, Steven D.; POLLICK, Sarah A.; HENG, Henry H.Q. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer: Hallmarks of cancer. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 136, n. 9, p. 2012–2021, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.29031>.

HUNTER, Kent W. *et al.* Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 211–223, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.126>.

HYUN, Kwangbeom *et al.* Writing, erasing and reading histone lysine methylations. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. e324–e324, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>.

JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, [s. l.], v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature08467>.

JAMBHEKAR, Ashwini; ANASTAS, Jamie N.; SHI, Yang. Histone Lysine Demethylase Inhibitors. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. a026484, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026484>.

JIAPAER, Shabierjiang *et al.* Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. **Neurologia medico-chirurgica**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 405–421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>.

JONES, Peter A.; BAYLIN, Stephen B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 128, n. 4, p.683–692, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>.

JONES, Peter A.; ISSA, Jean-Pierre J.; BAYLIN, Stephen. Targeting the cancer epigenome for therapy. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 630–641, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93>.

KANWAL, Rajnee; GUPTA, Karishma; GUPTA, Sanjay. Cancer Epigenetics: An Introduction. In: VERMA, Mukesh (org.). **Cancer Epigenetics**. New York, NY: Springer New York, 2015. v. 1238, p. 3–25. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1).

KELLY, Andrew D; ISSA, Jean-Pierre J. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. **Current Opinion in Genetics & Development**, [s. l.], v. 42, p. 68–77, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.015>.

KIRTANA, R.; MANNA, Soumen; PATRA, Samir Kumar. Molecular mechanisms of KDM5A in cellular functions: Facets during development and disease. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 396, n. 2, p. 112314, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112314>.

KUNADIS, Elena *et al.* Targeting post-translational histone modifying enzymes in glioblastoma. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 220, p. 107721, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107721>.

LEE, Minyoung; LEE, Jae-Seon. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. **BMB Reports**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 51–59, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.2.005>.

LENZ, Luana S. *et al.* Cancer Cell Fitness Is Dynamic. **Cancer Research**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 1040–1051, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488>.

LI, Yixuan; SETO, Edward. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. a026831, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>.

LIVSHITS, Zhanna; RAO, Rama B.; SMITH, Silas W. An Approach to Chemotherapy Associated Toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 167–203, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.emc.2013.09.002>.

LYSSIOTIS, Costas A.; KIMMELMAN, Alec C. Metabolic Interactions in the Tumor

Microenvironment. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 863–875, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>.

MANZO, Fabio *et al.* Histone acetyltransferase inhibitors and preclinical studies. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 761–774, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/13543770902895727>.

MARKS, Paul A. *et al.* Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 194–202, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35106079>.

MARMORSTEIN, R.; ZHOU, M.-M. Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. a018762–a018762, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>.

MATT, Sonja; HOFMANN, Thomas G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 73, n. 15, p. 2829–2850, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2130-4>.

MAZOR, Tali *et al.* Intratumoral Heterogeneity of the Epigenome. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 29, n.4, p. 440–451, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.009>.

MILAZZO, Giorgio *et al.* Histone Deacetylases (HDACs): Evolution, Specificity, Role in Transcriptional Complexes, and Pharmacological Actionability. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 556, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes11050556>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. [S. l.: s. n.] [s. d.]. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS; DEPARTAMENTO DE GESTÃO E INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS EM SAÚDE. **Temozolomida para o tratamento adjuvante de pacientes portadores de Gliomas de Alto Grau**. [S. l.: s. n.], 2014.

MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI, Mohammad *et al.* 53BP1: A key player of DNA damage response with critical functions in cancer. **DNA Repair**, [s. l.], v. 73, p. 110–119, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.11.008>.

PANDITH, Arshad A. *et al.* Concordant association validates MGMT methylation and protein expression as favorable prognostic factors in glioma patients on alkylating chemotherapy (Temozolomide). **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 6704, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25169-2>.

PAWLOWSKA, Elzbieta *et al.* An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme—Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 889, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19030889>.

QIAN, Mengjia *et al.* Detection of single cell heterogeneity in cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [s. l.], v. 64, p. 143–149, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.09.003>.

- REN, Xianwen; KANG, Boxi; ZHANG, Zemin. Understanding tumor ecosystems by single cell sequencing: promises and limitations. **Genome Biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 211, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1593-z>.
- RICHON, V M. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 95, n. S1, p. S2–S6, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603463>.
- ROMANI, Massimo *et al.* Targeting of Histone Demethylases KDM5A and KDM6B Inhibits the Proliferation of Temozolomide-Resistant Glioblastoma Cells. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 878, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers11060878>.
- RONINSON, Igor B.; BROUDE, Eugenia V.; CHANG, Bey-Dih. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resistance Updates**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 303–313, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1054/drup.2001.0213>.
- SALGIA, Ravi; KULKARNI, Prakash. The Genetic/Non-genetic Duality of Drug ‘Resistance’ in Cancer. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 110–118, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.01.001>.
- SANTUCCI, Roberto *et al.* Cytochrome c: An extreme multifunctional protein with a key role in cell fate. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 136, p. 1237–1246, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.180>.
- SILVA, Andrew Oliveira *et al.* The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 348, n. 2, p. 177–183, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.014>.
- SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 27–36, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
- STERLING, Jayden *et al.* Histone lysine demethylases and their functions in cancer. **International Journal of Cancer**, [s. l.], p. ijc.33375, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.33375>.
- STRASSER, Andreas; VAUX, David L. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 1045–1054, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014>.
- STUPP, Roger *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 352, n. 10, p. 987–996, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- VAN DEN BERG, Jeroen *et al.* A limited number of double-strand DNA breaks is sufficient to delay cell cycle progression. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. 19, p. 10132–10144, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky786>.

VIELER, Maximilian; SANYAL, Suparna. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 288, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers10090288>.

VINOGRADOVA, Maia *et al.* An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug tolerant cancer cells. **Nature Chemical Biology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 531–538, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.2085>.

WEBER, Cynthia E.; KUO, Paul C. The tumor microenvironment. **Surgical Oncology**, [s. l.], v.21, n. 3, p. 172–177, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2011.09.001>.

WHITESIDE, T L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, [s. l.], v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>.

WU, Ting; DAI, Yun. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 387, p. 61–68, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>.

YUAN, Lifeng; ALEXANDER, Peter B.; WANG, Xiao-Fan. Cellular senescence: from anti-cancer weapon to anti-aging target. **Science China Life Sciences**, [s. l.], v. 63, n. 3, p. 332–342, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1629-6>.

ZHANG, Zhiqiang *et al.* Silencing of histone deacetylase 2 suppresses malignancy for proliferation, migration, and invasion of glioblastoma cells and enhances temozolomide sensitivity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], v. 78, n. 6, p. 1289–1296, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3188-2>.

## NORMAS DE PUBLICAÇÃO DO PERIÓDICO *CLINICAL EPIGENETICS*

### Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

### Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design
- list the full names and institutional addresses for all authors
  - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

### Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** a brief summary and potential implications

### Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

### Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary.

### Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

## **Discussion**

For research articles this section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study. For study protocols and methodology manuscripts this section should include a discussion of any practical or operational issues involved in performing the study and any issues not covered in other sections.

## **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study to the field.

## **Methods**

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

## **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided.

## **Revisions**

**Please note:** if your submission is sent back to you for further revision, in addition to a clean version of the revised manuscript, our submission system will require you to submit a version with tracked changes, so the new changes are easier to identify for our peer reviewers.

## **Declarations**

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and materials
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

### ***Ethics approval and consent to participate***

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval and for experimental studies involving client-owned animals, authors must also include a statement on informed consent from the client or owner.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

### ***Consent for publication***

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including any individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

### ***Availability of data and materials***

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.



Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].<sup>[Reference number]</sup>

If you wish to co-submit a data note describing your data to be published in *BMC Research Notes*, you can do so by visiting our [submission portal](#). Data notes support [open data](#) and help authors to comply with funder policies on data sharing. Co-published data notes will be linked to the research article the data support ([example](#)).

***Competing interests***

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each authors' competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

### ***Funding***

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

### ***Authors' contributions***

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

### ***Acknowledgements***

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

### ***Authors' information***

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

### ***Footnotes***

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## **References**

Examples of the Vancouver reference style are shown below.

See our [editorial policies](#) for author guidance on good citation practice

**Web links and URLs:** All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

### **Example reference style:**

*Article within a journal*

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

*Article within a journal (no page numbers)*

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Medicine.* 2013;11:63.

*Article within a journal by DOI*

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

*Article within a journal supplement*

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

*Book chapter, or an article within a book*

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. p. 251-306.

*OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)*

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

*Complete book, authored*

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness.* 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

*Online document*

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

*Online database*

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia,* Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

*Supplementary material/private homepage*

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

*University site*

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

*FTP site*

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

*Organization site*

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

*Dataset with persistent identifier*

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). GigaScience Database. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

**Figures, tables and additional files**

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.