

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA NUCLEOLAR À QUIMIOTERAPIA EM
GLIOBLASTOMAS**

Daphne Tórgo de Lemos

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Dr^a. Luana Suéling Lenz

Porto Alegre

2022

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA NUCLEOLAR À QUIMIOTERAPIA EM
GLIOBLASTOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Biologia Celular e Molecular**

Daphne Tórgo de Lemos

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Dr^a. Luana Suéling Lenz

Porto Alegre

Novembro de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

Tórgo de Lemos, Daphne
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA NUCLEOLAR À
QUIMIOTERAPIA EM GLIOBLASTOMAS / Daphne Tórgo de
Lemos. -- 2022.
71 f.
Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Luana Suéling Lenz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,
2022.

1. Glioblastoma. 2. Nucléolo. 3. Temozolomida. 4.
Actinomicina-D. 5. Estresse nucleolar. I. Lenz, Guido,
orient. II. Suéling Lenz, Luana, coorient. III.
Título.

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

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O trabalho a ser apresentado foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (LabSinal) do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer, mais uma vez, a quem sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me incentivando a subir mais um dentre os tantos degraus que ainda pretendo subir durante a minha trajetória.

À minha família e ao meu namorado, por sempre terem sido o incentivo principal que me empurra para frente, e que nunca me deixa sequer pensar em olhar para trás, por mais difícil que o caminho seja.

Aos meus amigos, que estão comigo há tantos anos, e sempre conseguem se fazer presentes e trazer alívio nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do LabSinal, pela parceria diária e cafés pós-almoço que faz os dias serem um pouco mais leves.

À Luana, por ter me orientado desde o início da minha trajetória com muita paciência, atenção e dedicação.

Ao Prof. Guido, pela confiança no meu potencial e no meu trabalho, e por ter sido (e, agora, continuar sendo durante mais quatro anos) parte essencial da minha formação como cientista e pessoa.

À UFRGS e às agências de fomento, por possibilitar o desenvolvimento do trabalho e da minha formação. Pelo privilégio de ser aluna de uma instituição pública, gratuita e de excelência há mais de 6 anos, que valoriza a ciência e que resiste a tantas tentativas de desmonte.

ÍNDICE

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
1. Câncer e glioblastomas.....	14
2. Nucléolo.....	18
2.1 Aspectos gerais.....	18
2.2 Nucléolo e sua relação com câncer.....	22
2.2.1 Estresse nucleolar.....	23
2.2.2 Abordagens terapêuticas com nucléolo.....	27
OBJETIVOS.....	30
1. Objetivo geral.....	30
2. Objetivos específicos.....	30
APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
Nucleolar and nuclear alterations in glioblastomas induced by temozolomide and actinomycin-D treatment.....	32
Abstract.....	30
Introduction.....	33
Results.....	35
Discussion.....	36
Material and Methods.....	40
References.....	44
Figures.....	48
Supplemental information.....	52
DISCUSSÃO GERAL.....	57
PERSPECTIVAS.....	62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 64

CURRICULUM VITAE..... 70

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ActD	Actinomicina-D
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CRISPR	Repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente espaçadas (<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
DFC	Componente denso fibrilar (<i>dense fibrillar component</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETS	Espaçador externo transcrito (<i>External Transcribed Spacer</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FC	Centro fibrilar (<i>fibrillar center</i>)
GBM	Glioblastoma multiforme
GC	Componente granular (<i>granular component</i>)
ITS	Espaçador interno transcrito (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
L	Litro
LB	Caldo lisogênico (<i>Lysogeny broth</i>)
LTS	Sobreviventes a longo prazo (long-term survivors)
M	Concentração molar (mol/L)
m	Mili, fator de 10 ⁻³
m	metro

mApple vermelha	Maçã monomérica (<i>monomeric Apple</i>), proteína fluorescente
mCherry vermelha	Cereja monomérica (<i>monomeric Cherry</i>), proteína fluorescente
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MTIC	5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida
mRNA	RNA mensageiro (<i>messenger RNA</i>)
mVenus amarela	Vênus monomérica (<i>monomeric Venus</i>), proteína fluorescente
n	Nano, fator de 10^{-9}
NMP1	Nucleofosmina 1 (<i>nucleophosmine 1</i>)
NORs	Regiões organizadoras nucleolares (<i>Nucleolar Organizer Regions</i>)
O6-MeG	O6-metilguanina
PEI	Polietilamina (<i>polyethylenimine</i>)
PIC	Complexo de pré-iniciação (<i>preinitiation complex</i>)
rDNA	DNA ribossomal (<i>ribosomal DNA</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA pol I	RNA polimerase I (<i>RNA polymerase I</i>)
RPL	Proteína ribossomal L (<i>ribosome protein L</i>)
RRE	Elemento de resposta REV (<i>Rev Response Element</i>)
rRNA	RNA ribossomal (<i>ribosomal RNA</i>)
TMZ	Temozolomida
WT	Tipo selvagem (<i>wild type</i>)
2-HG	2-hidroxi glutárico (<i>2-hydroxyglutaric</i>)

β -gal	Beta galactosidase
μ	Micro, fator de 10^{-6}
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\text{\textcircled{R}}$	Marca registrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ressonância magnética de um paciente com glioblastoma.....	15
Figura 2 - Representação esquemática das etapas da biogênese ribossomal ...	20
Figura 3 - Representação esquemática da resposta de estresse nucleolar e regulação da p53.....	25
Figura 4 - Ruptura nucleolar caracterizada pela translocação da NPM1 em diferentes condições de estresse nucleolar.....	27

RESUMO

O nucléolo é uma subestrutura nuclear organizada ao redor das regiões cromossomais que codificam os rRNAs, tendo como função principal formar as subunidades ribossomais. Considerando a taxa proliferativa aumentada de células tumorais, o nucléolo tem papel importante no processo de tumorigênese. Uma vez que ele reflete diretamente na capacidade celular de crescimento e proliferação, a necessidade de uma maior síntese proteica vai resultar em uma biogênese ribossomal aumentada. O número e tamanho de nucléolos é uma característica frequentemente alterada em vários tipos tumorais, onde nucléolos maiores e em maior número estão associados com uma superprodução ribossomal. Por conta disso, a morfologia nucleolar é considerada como fator de prognóstico para desfechos clínicos, correlacionado com a taxa proliferativa tumoral. Porém, não existem informações que descrevem qual o papel do nucléolo para a sobrevivência da célula tumoral frente a estresses como a quimioterapia, tampouco se ocorrem mudanças morfológicas nucleolares após o tratamento quimioterápico. O presente trabalho caracterizou a resposta de células de glioblastoma, que carregam uma mutação no gene TP53, submetidas a tratamento quimioterápico agudo com temozolomida (TMZ). O estresse induzido por TMZ resultou em mudanças morfológicas nucleares e nucleolares e no aumento da expressão de Ki67, um marcador de proliferação. Visando entender melhor sobre o papel do nucléolo e da via de estresse nucleolar na resposta à quimioterapia, também caracterizamos e comparamos a resposta entre a mesma linhagem de glioblastoma com outra, que carrega o gene tipo selvagem, em relação à combinação de tratamento de TMZ com Actinomicina-D, um indutor de estresse nucleolar. Foi possível observar diferenças de resposta entre as duas linhagens, onde a linhagem com fenótipo selvagem para p53 respondeu à indução de estresse nucleolar, apresentando diminuição do tamanho nuclear após a combinação de tratamento. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que o nucléolo de células de glioblastoma de alto grau respondem ao tratamento quimioterápico agudo com mudanças morfológicas observáveis. Além disso, foi possível inferir que células que carregam mutação na proteína p53 são menos responsivas à indução de estresse nucleolar. De alguma forma, o nucléolo participa ou é impactado pela resposta de estresse induzida pela quimioterapia, e se isso for investigado mais além, pode nos dar uma perspectiva mais aprofundada da importância da resposta nucleolar para a sobrevivência no câncer.

ABSTRACT

The nucleolus is a nuclear substructure organized around chromosomal regions encoding rRNAs, and its main function is to form ribosomal subunits. Considering the increased proliferative rate of tumor cells, the nucleolus plays an important role in the process of tumorigenesis. Since it reflects directly on the cellular capacity for growth and proliferation, the need for increased protein synthesis will result in increased ribosomal biogenesis. The number and size of nucleoli is a frequently altered characteristic among tumor types, where larger and more numerous nucleoli are associated with ribosomal overproduction. Because of this, nucleolar morphology is considered as a prognostic factor for clinical outcomes, correlating with tumor proliferative rate. However, there is no information describing the role of the nucleolus in tumor cell survival before stresses such as chemotherapy, nor whether nucleolar morphological changes occur after chemotherapy. The present work characterized the response of glioblastoma cells, carrying a mutation in the TP53 gene, subjected to acute chemotherapy treatment with temozolomide (TMZ). TMZ-induced stress resulted in nuclear and nucleolar morphological changes and increased expression of Ki67, a proliferation marker. Aiming to better understand the role of the nucleolus and of the nucleolar stress pathway in response to chemotherapy, we also characterized and compared the response between the same glioblastoma cell line with another one, that carries the wild-type gene, to the combination treatment of TMZ and Actinomycin-D, a nucleolar stress inducer. The two cell lines responded differently, where the cell line with a wild-type phenotype for p53 responded to the nucleolar stress induction, showing a decreased nuclear size after the combination treatment. The results obtained in this work showed that the nucleoli of high-grade glioblastoma cells responded to acute chemotherapy treatment with observable morphological changes. Furthermore, it was possible to imply that cells carrying a mutation in the p53 protein are less responsive to the induction of nucleolar stress. Somehow, the nucleolus participates in or is impacted by the chemotherapy-induced stress response, and if this is further investigated, it may give us insight into the importance of the nucleolar response in the survival of cancer cells.

INTRODUÇÃO

1. Câncer e glioblastomas

Câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento e multiplicação desordenados das células, apresentando a tendência a invadir tecidos e órgãos adjacentes, e podendo se espalhar pelo corpo com a ocorrência de metástase (OPAS/OMS, 2020). É a segunda principal causa de morte prematura no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020), e representa 9,5 milhões das mortes reportadas no mundo em 2018 (OPAS/OMS, 2020).

Dentre os tumores malignos cerebrais, o glioblastoma multiforme (GBM) (**Figura 1**) é o tipo mais comum em adultos (SINGH et al., 2021) e é o tipo de glioma mais grave e mais frequente que acomete o sistema nervoso central (BLEEKER; MOLENAAR; LEENSTRA, 2012; LELLIS BADKE et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014. p. 515). Os gliomas podem ser classificados em astrocitomas, ependimomas e oligodendrogliomas, e todos são formados a partir de células da glia ou a partir de células-tronco que desenvolvem características gliais após a transformação neoplásica (PERRY; WESSELING, 2016). O GBM se encaixa dentro dos astrocitomas, tendo origem a partir dos astrócitos, e é classificado com grau de malignidade histológica 4, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (LOUIS et al., 2007).

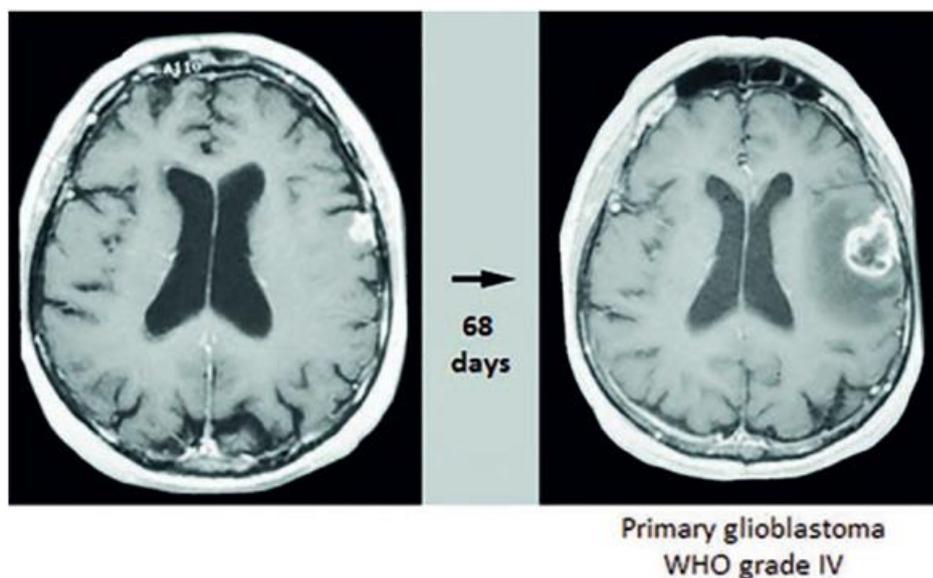


Figura 1. Ressonância magnética de um paciente com glioblastoma. Imagem mostrando uma lesão cortical inicial (esquerda) que evoluiu, em um período de 68 dias, para um foco tumoral de glioblastoma com necrose central (direita). Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014. p. 517.

Apesar da extensa área de pesquisa focando no melhor entendimento e na otimização terapêutica, ainda não existe cura para os glioblastomas e a doença acaba apresentando um desfecho fatal em pouco tempo. Mesmo com tratamento, ela possui o pior prognóstico entre os gliomas, apresentando uma sobrevida média de apenas 15 meses (STUPP et al., 2014), e uma sobrevida livre de progressão de apenas 6 meses (SINGH et al., 2021). Sem tratamento, a sobrevida é em torno de 3 meses (SCHAPIRA, A., 2007. p. 1336). Não existe prevenção conhecida e a etiologia dessa doença ainda não é bem compreendida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014. p. 511), apesar de a exposição à radiação ionizante ser considerada um fator de risco (INCA, 2019. p. 40).

O tratamento dos glioblastomas é baseado em ressecção cirúrgica seguida de terapias adjuvantes, como a quimioterapia e radioterapia (BLEEKER; MOLENAAR; LEENSTRA, 2012). O padrão de tratamento quimioterápico para glioblastomas é feito com o uso de temozolomida (TMZ), que atua como agente alquilante. A melhoria mais significativa já registrada na sobrevida de pacientes

com GBM foi feita com a adição de TMZ ao regime terapêutico com radiação, que resultou em um aumento de 2 meses na mediana de sobrevida (SINGH et al., 2021; STUPP et al., 2005).

A temozolomida, de nome comercial Temodar ou Temodal, é um fármaco de administração oral, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (PERRY; WESSELING, 2016) e sua concentração plasmática encontrada em pacientes é em torno de 50-70 μM (SILVA et al., 2016). Ele é estável em pHs ácidos e é ativado no pH fisiológico através da sua conversão em 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC). O MTIC é hidrolisado em íons de metildiazó, os quais são capazes de induzir dano no DNA ao transferir seu grupo metil às purinas, resultando em adutos de DNA que induzem o mal pareamento de bases (SINGH et al., 2021; ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). A lesão mais citotóxica induzida pelo TMZ é a O6-metilguanina (O6-MeG), que erroneamente pareia com timina durante a replicação do DNA. O sistema de reparo de bases mal pareadas reconhece a timina mal pareada e a excisa, porém, a O6-MeG persiste na fita molde, resultando em vários ciclos de inserção e excisão de timinas que levam às quebras na fita de DNA (SINGH et al., 2021). Eventualmente se tornando irreparáveis (SINGH et al., 2021), causam colapso na forquilha de replicação (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012) e levam à alguns desfechos, como parada de ciclo em G2/M, autofagia, senescência e apoptose (LEE, 2016; SILVA et al., 2016).

O desenvolvimento de glioblastomas está relacionado com a ocorrência de várias perturbações de origem genética, como a perda de material cromossômico, amplificação da atividade de proteínas transcritas por genes como EGFR, FGFR2, IRS2 e AKT3, e perda de função de proteínas transcritas pelos genes PTEN, TP16, TP53, NF1, entre outros, estando diretamente ligado a problemas no *checkpoint* de ciclo celular (URBANSKA et al., 2014).

O mau prognóstico está relacionado com a alta taxa de fracasso no tratamento, que é causada por vários fatores. Entre eles, a alta capacidade invasiva e proliferativa das células, o que dificulta a ressecção cirúrgica total e resulta em uma rápida recidiva do tumor a partir de células remanescentes. Além disso, a

exposição prolongada ao TMZ e a natureza altamente heterogênea e tendência à alta plasticidade celular e mutação também tem papéis importantes para contribuição do fracasso no tratamento (LEE, 2016; OSUKA; VAN MEIR, 2017; SINGH et al., 2021). O status de metilação do promotor de metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) é um dos principais fatores prognósticos na avaliação clínica de glioblastomas (BUTLER et al., 2020). A MGMT é uma enzima capaz de remover os adutos de metil das purinas, induzidos pelos íons de metildiazo, e reparar a lesão O6-MeG (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). Portanto, uma resposta efetiva ao tratamento com TMZ, e, conseqüentemente, uma maior sobrevida, também dependem do status de metilação do promotor de MGMT, que reflete na atividade da enzima e correlaciona-se com um fenótipo resistente (OSUKA; VAN MEIR, 2017). A metilação do promotor de MGMT é observado em 40-57% dos casos de glioblastomas, sendo mais frequente em glioblastomas secundários, em mulheres e em sobreviventes a longo prazo (LTS) (BLEEKER; MOLENAAR; LEENSTRA, 2012).

O desenvolvimento de resistência ao tratamento com TMZ é um acontecimento muito comum, onde mais de 50% dos pacientes com GBM não respondem à terapia (SINGH et al., 2021). No cultivo *in vitro*, existe muita variabilidade tanto entre linhagens celulares, apresentando diferentes desfechos em resposta ao mesmo regime quimioterápico com TMZ (SILVA et al., 2016), quanto entre subpopulações da mesma linhagem celular, podendo ser observada uma grande heterogeneidade no fitness de colônias e em alguns fenótipos como o de ciclo celular entre células clonais, e de dano no DNA em resposta ao tratamento com TMZ (LENZ et al., 2021).

Boa parte dessa variabilidade pode estar relacionada com a alta incidência de mutações no gene da proteína isocitrato desidrogenase (IDH) em gliomas. Gliomas mutantes para as enzimas IDH1 e IDH2 resultam em ganho de função, produzindo grandes quantidades do ácido 2-hidroxi-glutárico (2-HG), um oncometabólito que afeta o funcionamento de enzimas envolvidas na regulação epigenética. A acumulação e secreção em excesso de 2-HG inibe a atividade catalítica de dioxigenases dependentes de alfa-cetoglutarato, o que prejudica alguns passos importantes nos processos de demetilação de DNA e

modificações de histonas, e pode resultar em uma alta variabilidade fenotípica entre células (HUANG et al., 2019; OSUKA; VAN MEIR, 2017).

2. Nucléolo

2.1 Aspectos gerais

O nucléolo é uma subestrutura nuclear não membranosa, presente em todas as células eucarióticas que possuem núcleo, que pode ser vista como uma região distinguível por microscopia óptica (PEDERSON, 2011). Ele se organiza ao redor das Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) do genoma humano, que contém clusters de genes ribossomais em *tandem* distribuídos nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (CAROTENUTO et al., 2019; ORSOLIC et al., 2016; STEPIŃSKI, 2018), havendo aproximadamente 600-800 cópias de genes ribossomais em um genoma diploide (YAN et al., 2019). Considerando que temos um total de 10 NORs em um genoma diploide (duas NORs para cada cromossomo), esse é o número máximo de nucléolos que uma célula humana saudável pode ter. Apenas NORs com transcrição ativa formam nucléolos (FARLEY et al., 2015). Sua principal função está envolvida com a produção ribossomal, que envolve os processos de transcrição do DNA ribossomal (rDNA), maturação do transcrito de RNA ribossomal (rRNA), montagem das subunidades ribossomais e transporte ao citoplasma (STEPIŃSKI, 2018).

O transcrito primário de rRNA em humanos, o pré-rRNA 47S, é resultado da transcrição pela RNA polimerase I (RNA pol I) das regiões de repetição dos clusters de genes ribossomais. É a síntese dos pré-rRNAs que vai desencadear a automontagem do nucléolo ao redor das NORs, com o recrutamento de várias proteínas e RNAs não codificantes que fazem parte do processamento e maturação dos pré-rRNAs (AUBERT et al., 2018). As regiões nucleolares são organizadas em três compartimentos, responsáveis por diferentes funções dentro do processo de produção ribossomal. O centro fibrilar (FC) é a região onde ocorre a transcrição do rDNA em pré-rRNA 47S. No componente denso

fibrilar (DFC), os pré-rRNAs são processados e modificados com a remoção dos espaçadores transcritos externos (ETSs) e internos (ITSs), resultando nos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 28S. Junto do rRNA 5S, que é transcrito excepcionalmente pela RNA polimerase III no nucleoplasma, o resto dos rRNAs transcritos no DFC migram para o componente granular (GC), onde, junto de aproximadamente 80 proteínas ribossomais, transcritas pela RNA polimerase II, são formadas as pré-subunidades ribossomais 40S (rRNA 18S) e 60S (rRNAs 5.8S, 28S e 5S) (**Figura 2**) (AUBERT et al., 2018; HEIN et al., 2013; HERNANDEZ-VERDUN, 2011; YANG; YANG; YI, 2018; YAN et al., 2019; ZEMP; KUTAY, 2007).

Após a maturação nucleolar e nucleoplasmática, as pré-subunidades ribossomais 40S e 60s são exportadas de forma independente para o citoplasma através do complexo de poro nuclear, onde mais tarde são submetidas às últimas etapas de maturação, onde ocorre a liberação de algumas proteínas antes das subunidades ribossomais serem capazes de realizar o processo de tradução (ZEMP; KUTAY, 2007).

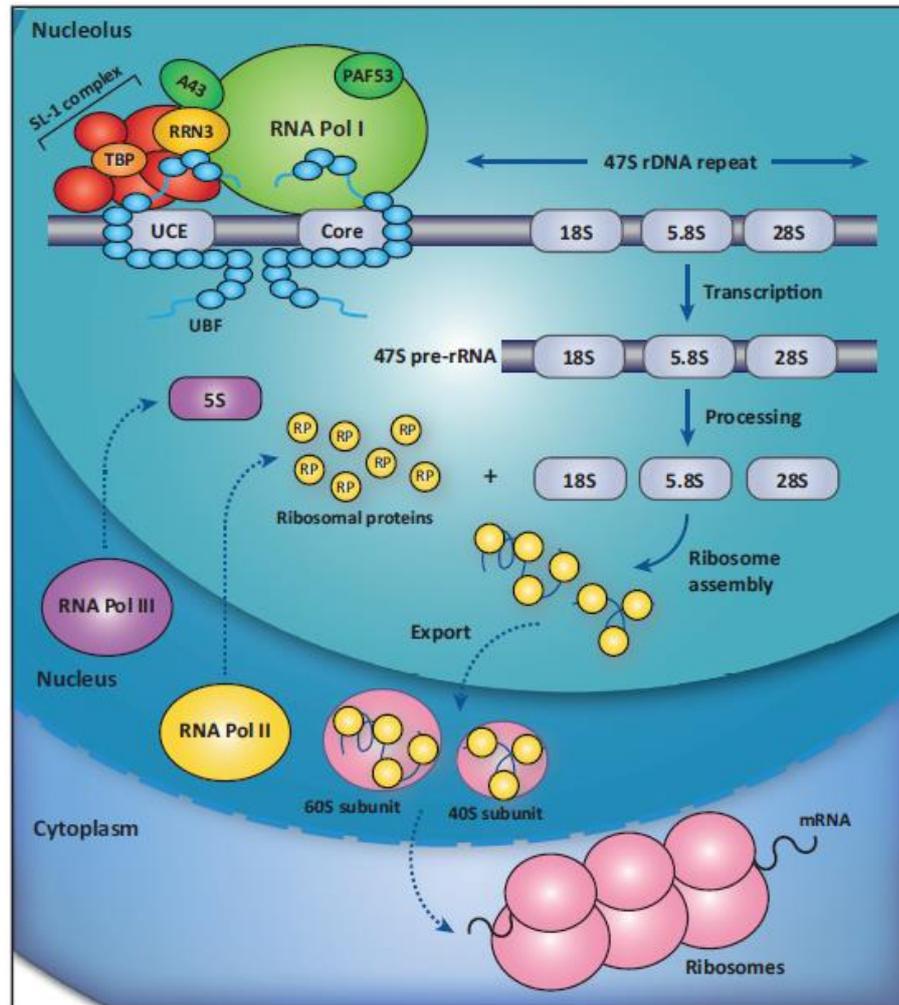


Figura 2. Representação esquemática das etapas da biogênese ribossomal. São representados na figura o aparato de transcrição da RNA polimerase I, interagindo com a região promotora do rDNA, que contém a região *Core* e o *upstream control element* (UCE), onde se forma o complexo de pré-iniciação (PIC) com o *upstream binding factor* (UBF) e o complexo SL-1 (formado por uma proteína ligante ao TATA box, a TBP, e outras 5 proteínas que se associam à RNA polimerase I). O PIC recruta a Pol I com a RRN3, e a síntese e alongação dos transcritos resulta no rRNA 47S, que é processado e modificado nos rRNAs maduros 18S, 5.8S e 28S. Junto do rRNA 5S e das proteínas ribossomais, são montadas as subunidades ribossomais. Fonte: HEIN et al., 2013.

A presença e composição do nucléolo é dinâmica durante o ciclo celular. Em eucariotos, a produção ribossomal inicia no fim da mitose, aumenta gradualmente durante G1, tem pico em G2 e termina com o início da prófase (HERNANDEZ-VERDUN, 2011). Com o término da produção ribossomal na

prófase, o nucléolo se desfaz, e seu formato vai sendo modificado com a liberação de proteínas nucleolares localizadas no GC e DFC. Essas proteínas, incluindo nucleolina, fibrilarina, nucleofosmina, Bop1 e Ki67 migram para compartimentos pericromossomais e são visíveis nas periferias dos cromossomos (HERNANDEZ-VERDUN, 2011).

Ki67 é uma proteína usada, já há muitas décadas, como um marcador de proliferação em células tumorais humanas (SUN; KAUFMAN, 2018). Ela foi primeiramente identificada como um antígeno altamente expresso no núcleo de células ciclantes do linfoma de Hodgkin (SUN; KAUFMAN, 2018), e as biópsias costumavam ser classificadas pelo percentual de células Ki67-positivas ou negativas, estimando seu índice de proliferação (MILLER et al., 2018). Porém, em 2018, Miller et al. mostraram que, na realidade, o Ki67 é um marcador graduado e não binário. A proteína sofre degradação mediada pelo proteassomo, onde ela é degradada continuamente em G1 e G0 e se acumula nas fases S, G2 e M. Portanto, o nível de Ki67 é altamente heterogêneo entre células, já que depende da quantidade de tempo na qual uma célula individual passa em G1/G0, e não reflete unicamente na taxa proliferativa (MILLER et al., 2018). Apesar de ser conhecido principalmente como um marcador de proliferação, o Ki67 também tem outros papéis funcionais moleculares já bem estabelecidos. Já foi mostrado que o Ki67 participa do processo de separação dos cromossomos durante a mitose e da organização da heterocromatina (CUYLEN et al., 2016; MILLER et al., 2018). Ele também participa da biogênese ribossomal, onde a inibição fotoquímica de Ki67 resulta na inibição da síntese de rRNA dependente da RNA pol I (RAHMANZADEH et al., 2007). Além disso, o Ki67 colocaliza com componentes do aparato de transcrição da RNA pol I em células não ciclantes e com regiões ligadas à transcrição de rRNA em células proliferativas, além de colocalizar também com rRNA recém-sintetizado in vivo (BULLWINKEL et al., 2006).

2.2 Nucléolo e sua relação com câncer

O tamanho ou área nucleolar, formato e número são parâmetros conhecidos por apresentarem grande variação entre diferentes espécies e tipos celulares. A área do nucléolo de células humanas flutua consideravelmente entre diferentes tecidos, e está relacionado com a sua capacidade proliferativa (FARLEY et al., 2015). A hipertrofia nucleolar e o aumento da biogênese ribossomal são fenômenos que podem ser observados em todas as células normais de mamíferos ao receberem estímulos proliferativos. Essa resposta se dá como consequência da alta demanda biossintética das células ciclantes, de forma que existe a necessidade de duplicação dos constituintes celulares para garantir que ambas as células filhas recebam os complementos necessários para a sua sobrevivência e funcionamento saudável (MONTANARO; TRERÉ; DERENZINI, 2008).

O nucléolo passou a ter sua importância reconhecida no câncer a partir do século 19 quando se notou que células tumorais, em cortes histológicos, tinham como característica nucléolos hipertróficos, com números aumentados e com formatos irregulares (HEIN et al., 2013; MONTANARO; TRERÉ; DERENZINI, 2008). A partir daí, o tamanho nucleolar passou a ser considerado como um bom parâmetro prognóstico para desfechos clínicos, estando relacionado com a taxa de proliferação do tumor (FARLEY et al., 2015) e a hiperativação da transcrição de rDNAs (HEIN et al., 2013). O aumento tanto do tamanho como do número de nucléolos nas células é uma característica frequentemente observada em tumores malignos como câncer de mama, fígado, carcinoma de pulmão de grandes células e no linfoma de Hodgkin (ORSOLIC et al., 2016). Porém, tamanho nucleolar não serve como um bom parâmetro para diagnóstico de câncer, uma vez que nem todos os tipos tumorais se proliferam rapidamente, podendo apresentar também células com nucléolos menores (FARLEY et al., 2015).

Em contraste, nucléolos pequenos são traços característicos de alguns outros tipos tumorais com alta taxa proliferativa, como é o caso de alguns tipos tumorais hematológicos e câncer de pulmão anaplásico de células pequenas

(ORSOLIC et al., 2016), mostrando que tamanho nucleolar aumentado não é um parâmetro universal de prognóstico relacionado à taxa proliferativa. Os mecanismos responsáveis por essas diferenças ainda não são compreendidos. Algumas hipóteses sugerem que, na verdade, essas variações do tamanho e número presentes em diferentes tipos tumorais são resultado de desregulações moleculares que não necessariamente estão relacionadas apenas com a biogênese ribossomal (ORSOLIC et al., 2016).

2.2.1 Estresse nucleolar

Mesmo que a biogênese ribossomal seja a principal função do nucléolo, sabe-se que 70% das proteínas nucleolares possuem funções relacionadas também com outros aspectos celulares, como organização genômica, sensor e reparo de dano no DNA, regulação do ciclo celular, entre outros (DIESCH; HANNAN; SANIJ, 2014).

Uma função secundária do nucléolo, bem estabelecida atualmente, é seu papel na resposta celular ao estresse. As células ativamente monitoram a integridade do nucléolo e a constância da biogênese ribossomal, de forma que a perturbação do seu equilíbrio leva à ativação de alguns *checkpoints* celulares (HEIN et al., 2013). Dessas vias de sinalização, a melhor compreendida é a do estresse nucleolar. O conceito de estresse nucleolar se refere a eventos estressantes na célula que, de alguma maneira, prejudicam a homeostase do nucléolo e a biogênese ribossomal, alterando sua morfologia e funcionamento, e acabam, por fim, ativando a via de sinalização da p53, uma proteína supressora tumoral que está alterada na maioria dos cânceres humanos (HEIN et al., 2013; YANG; YANG; YI, 2018).

Um fenômeno comum em todos os estresses celulares que mobilizam o p53 é a ruptura nucleolar (*nucleolar disruption*) (YANG; YANG; YI, 2018). A indução de estresse causada por radiação, hipóxia, privação de nutrientes, choque térmico ou pela ação de agentes quimioterápicos, resulta na ruptura nucleolar (YANG; YANG; YI, 2018). Importante lembrar que o nucléolo não é um

compartimento membranosos e que o termo “ruptura nucleolar” se refere à translocação de algumas proteínas nucleolares para o nucleoplasma, e não a uma desintegração total desta estrutura. Essas proteínas nucleolares passam a interagir com outras proteínas que não tinham contato antes, como é o caso com a MDM2 (JAMES et al., 2014). A MDM2 (*murine double minute 2*, ou HDM2 em humanos (YANG; YANG; YI, 2018)) é uma oncoproteína que regula a atividade da p53 de duas maneiras principais: a primeira mantém a atividade da p53 atenuada por ubiquitinação e consequente indução de degradação no proteossomo (BOULON et al., 2010); e a segunda é com a MDM2/HDM2 se ligando diretamente ao p53, e perturbando a sua interação com a maquinaria de transcrição da DNA Polimerase II, de forma que ele não consegue agir como fator de transcrição (HEIN et al., 2013).

Atualmente, o modelo com maiores evidências aponta que a mediação da ruptura e estresse nucleolar, e consequente ativação e acúmulo de p53, é feita com a participação das proteínas ribossomais RPL5, RPL11, RPL23, RPS3, RPS7 e os rRNAs 5.8S e 5S, que atuam de maneiras não mutualmente exclusivas (**Figura 3**): a RPL5, RPL11 e os rRNAs podem interagir diretamente com a MDM2 e inibir sua associação com o p53 **(1)**; a RPL26 pode se ligar ao mRNA da p53 e intensificar sua tradução, resultando no acúmulo da proteína **(2)**; e o aumento da tradução do mRNA da RPL11 também resulta no aumento da interação entre a RPL11 e MDM2, levando ao aumento da atividade da p53 **(3)** (HEIN et al., 2013).

O aumento da atividade de p53 permite com que ela atue como fator de transcrição e ative várias vias de resposta ao estresse, como apoptose, parada do ciclo, autofagia, senescência, entre outras (BOULON et al., 2010; YANG; YANG; YI, 2018). Inclusive, já foi reportado que apenas a presença de grandes quantidades de dano do DNA não é suficiente para estabilizar a ativação de p53, a não ser que também ocorra estresse e ruptura nucleolar (RUBBI; MILNER, 2003). Atualmente, a supressão de estresse nucleolar é, inclusive, proposta como sendo um novo *Hallmark of Cancer* (QUIN et al., 2014), que são competências desenvolvidas pelas células durante o processo de

tumorigênese, necessárias para o estabelecimento e desenvolvimento do tumor (HANAHAN, 2022).

Além disso, segundo análises proteômicas de estresse nucleolar, há indícios de que a p53 faz parte de um *loop* positivo onde ela é necessária também para a liberação inicial das RPs do nucléolo para o nucleoplasma após perturbações na síntese de rRNA (BOISVERT; LAMOND, 2010).

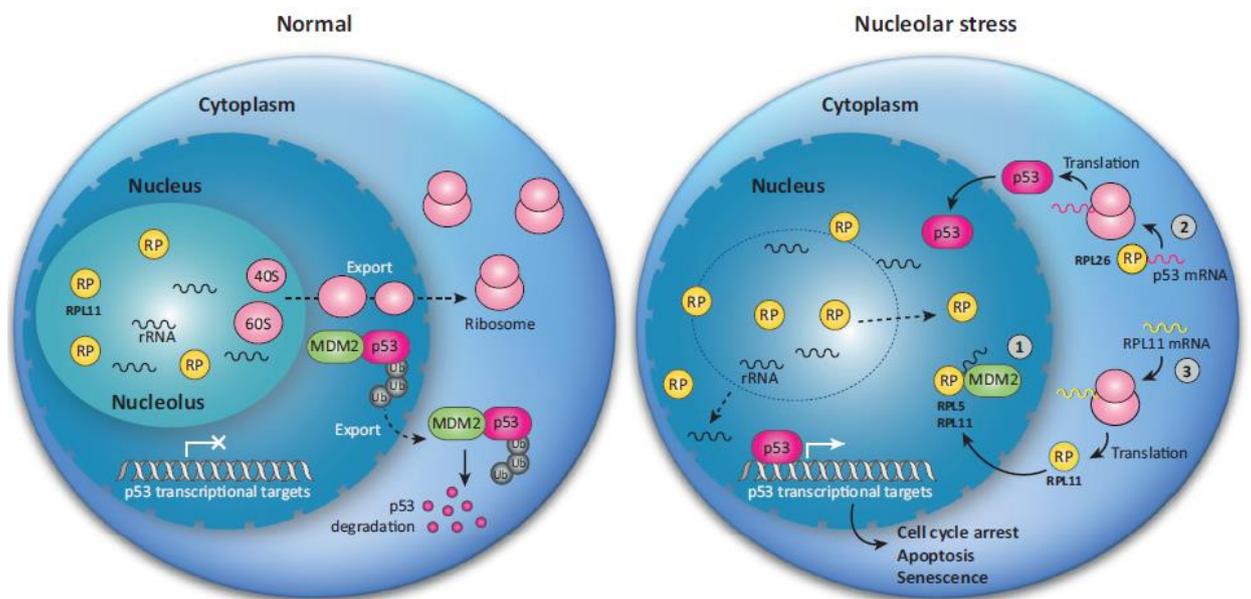


Figura 3. Representação esquemática da resposta de estresse nucleolar e regulação da p53. Adaptado. Fonte: HEIN et al., 2013.

Por outro lado, existem indícios de que a mobilização de p53 não é estritamente necessária para que o estresse nucleolar induza parada no ciclo ou apoptose (RUSSO; RUSSO, 2017). Outras proteínas além do p53 respondem ao estresse, como a c-Myc, uma oncoproteína que controla positivamente o crescimento celular e proliferação (RUSSO; RUSSO, 2017; YANG; YANG; YI, 2018). Alguns alvos transcricionais da c-Myc fazem parte de algumas etapas da biogênese ribossomal, como síntese de rRNA e proteínas ribossomais. Além disso, já foi reportado que as proteínas ribossomais RPL5 e RPL11 controlam

negativamente as funções da c-Myc, reprimindo sua atividade transcricional ou até mesmo induzindo sua degradação. Essas duas proteínas formam complexos com o mRNA da c-Myc e atuam como coadjuvantes para reprimir sua expressão, inibindo também a expressão dos seus genes alvos (RUSSO; RUSSO, 2017), resultando num controle negativo do crescimento e proliferação celular.

Yang et al descreveram, em 2018, os *Hallmarks of Nucleolar Stress*, que são fenômenos observados na célula que caracterizam o estado de estresse nucleolar. Alguns desses fenômenos incluem a translocação de outras proteínas nucleolares (ruptura nucleolar) e mudanças morfológicas. Além das RPs, outras proteínas de localização exclusivamente nucleolar são reportadas como sendo translocadas do nucléolo para o nucleoplasma sob condições de estresse. É preciso reforçar que, pelo nucléolo ser uma região não delimitada por membrana, basalmente qualquer molécula ou proteína pode vagar dentro e fora da região nucleolar de forma relativamente livre. Porém, sob condições de estresse, esse tráfego aumenta de forma significativa (YANG; YANG; YI, 2018).

Um exemplo disso é a nucleofosmina (NMP1 ou B23), a proteína mais abundante do nucléolo, presente no GC (CELA; MATTEO; FEDERICI, 2020). Ela pode ir e voltar de forma dinâmica entre o nucléolo e o nucleoplasma ou citoplasma (YANG; YANG; YI, 2018). A sua translocação, em específico, é considerada um *hallmark* do estresse nucleolar, e ela responde a diversos estímulos estressores diferentes (**Figura 4**). A NMP1 também está envolvida no controle da progressão do ciclo celular e instabilidade genômica. Ela, quando tem sua funcionalidade alterada, pode inclusive contribuir para oncogênese (RUSSO; RUSSO, 2017). A NMP1 se liga diretamente ao MDM2/HDM2, competindo com o p53 e impedindo a sua ubiquitinação (YANG; YANG; YI, 2018).

Além dela, outras proteínas também são utilizadas para descrever alterações morfológicas induzidas por estresse no nucléolo, como é o caso da fibrilarina, uma metiltransferase responsável pelo processamento do pré-rRNA e localizada entre o FC e DFC (RODRIGUEZ-CORONA et al., 2015), e do UBF,

um fator envolvido na montagem do aparato de transcrição da RNA pol I (COMAI, 1999) .

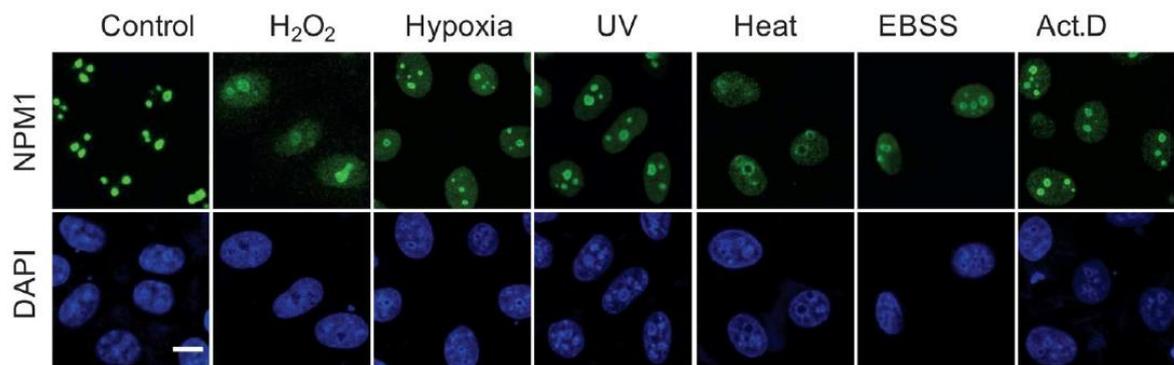


Figura 4. Ruptura nucleolar caracterizada pela translocação da NPM1 em diferentes condições de estresse nucleolar. Células HeLa submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti-NPM1. Estímulos estressores incluem exposição à H₂O₂, hipóxia, exposição à luz ultravioleta, choque por calor, *starvation* em solução EBSS e tratamento com Actinomicina-D, da esquerda para direita. Barra de escala = 5 µm. Fonte: YANG et al., 2016.

A ruptura nucleolar pode ser acompanhada de forma simultânea ou não de outras mudanças morfológicas visíveis, como é o caso da diminuição do tamanho nucleolar, da formação de *caps* nucleolares, que são agregados proteicos que migram para a periferia do nucléolo, e da presença de *focis* espalhados pelo nucleoplasma (YANG; YANG; YI, 2018).

2.2.2 Abordagens terapêuticas com nucléolo

A transcrição aberrante pela RNA Polimerase I e o aumento da biogênese ribossomal são traços generalizados no câncer. Porém, essas características não são resultado de mutações com ganho de função. Na verdade, são consequências de vias de sinalização alteradas de oncogenes e proteínas supressoras tumorais, e de vias que modulam o aparato de transcrição da Pol I (BYWATER et al., 2013; HEIN et al., 2013). Induzir o estresse nucleolar visando

perturbar a hiperativação da biogênese ribossomal é considerada uma nova estratégia terapêutica para o câncer (YANG; YANG; YI, 2018).

Mirando nisso, existem abordagens terapêuticas que focam em seletivamente inibir a síntese de rRNA e desestabilizar a biogênese ribossomal (HEIN et al., 2013). Já existem fármacos clinicamente aprovadas que ocasionam a inibição da síntese ribossomal pela transcrição da RNA pol, como cisplatina, doxorubicina, oxaliplatina, e outras que interferem nos passos iniciais do processamento de rRNA, como flavopiridol e roscovitina (BURGER et al., 2010). Porém, nenhum desses fármacos é específico o suficiente para interferir apenas na transcrição da RNA pol I e poder refletir em o quanto sua eficiência terapêutica está relacionada com a alteração da biogênese ribossomal (HEIN et al., 2013).

A Actinomicina-D (ActD) é o agente quimioterápico mais utilizado como indutor de estresse nucleolar atualmente (YANG; YANG; YI, 2018). Seu mecanismo de ação consiste em formar um complexo estável com o DNA dupla fita em resíduos de guanina, inibindo o acoplamento do aparato de transcrição da RNA polimerase e, conseqüentemente, inibindo a iniciação da transcrição. Ela é amplamente usada como indutor de apoptose contra uma variedade de cânceres, principalmente no tratamento de tumor de Wilms (DAI-FENG et al., 2015). Seu uso, entretanto, é dificultado pela sua toxicidade em altas concentrações, quando ela inibe a transcrição de forma generalizada (CHOONG et al., 2009). Em concentrações muito baixas, na faixa dos 5nM, ela é capaz de inibir seletivamente a atividade da RNA Polimerase I e induzir estresse nucleolar (YANG; YANG; YI, 2018), uma vez que os genes dos rRNAs, transcritos pela RNA Pol I, são ricos em GC (CHOONG et al., 2009). Além disso, CHOONG et al (2009) também mostraram que baixas doses de ActD, entre 1 e 100 nM, especificamente ativam a via de sinalização da p53 em células de adenocarcinoma humano.

Considerando os pontos discutidos, apesar de as características morfológicas nucleolares já serem bem estabelecidas como fator de prognóstico de alguns tipos tumorais, pouco se sabe a respeito do comportamento do nucléolo de

glioblastomas, principalmente após o tratamento. Até o momento, não existem trabalhos reportando as características nucleolares de células submetidas ao tratamento com temozolomida, nem se essas características se relacionam com a capacidade de tolerância e sobrevivência celular frente à quimioterapia. Além disso, também não é explorado como a resposta de estresse nucleolar pode participar da resposta de sobrevivência à quimioterapia, e se a combinação de tratamentos com indutores de estresse nucleolar pode ser benéfica de alguma forma no caso de glioblastomas.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Caracterização da resposta nucleolar de células de glioblastoma ao tratamento quimioterápico com temozolomida.

2. Objetivos específicos

1. Descrever e caracterizar em células da linhagem U251:
 - A morfologia do nucléolo, em tamanho e número, em condições normais e após o tratamento com temozolomida;
 - A expressão do marcador de proliferação Ki67, em condições normais e após o tratamento com temozolomida;
 - As alterações morfológicas nucleares induzidas pela combinação de temozolomida com actinomicina-D;

2. Comparar as respostas de morfologia nuclear, induzidas pelo tratamento combinado de temozolomida com actinomicina-D, encontradas entre linhagens de glioblastoma com diferentes genótipos de TP53 (A172 e U251);

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “Nucleolar and nuclear alterations in glioblastomas induced by temozolomide and actinomycin-D treatment” foi resultado do trabalho desenvolvido durante todo o período do curso de Mestrado, e foi formatado seguindo normas do periódico Journal of Cell Science. A discussão geral do trabalho será feita com base nos resultados apresentados aqui.

Minha participação na construção do artigo foi plena, onde desenhei e realizei os experimentos com ferramentas já disponíveis para o uso (linhagens celulares U251 Ki67-53bp1, U251 FastFUCCI, U251 H2B, A172 H2B), analisei os dados e desenvolvi a redação do manuscrito. Com esse trabalho tive a oportunidade de desenvolver pensamento crítico e autonomia, essenciais para a minha formação na pesquisa científica.

Alguns dados apresentados aqui são preliminares e é necessária a realização de novos experimentos complementares para a confirmação das hipóteses. Meu curso de Mestrado foi realizado em apenas 18 meses, de forma que o tempo para a realização de novos experimentos foi uma limitação.

1 Nucleolar and nuclear alterations in glioblastomas induced by
2 temozolomide and actinomycin-D treatment

3
4 Daphne Tórgo^{1,2}, Luana S. Lenz³, Luiza C. Pereira^{1,2} and Guido Lenz^{1,2}

5 ¹ Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Departamento de Biofísica,
6 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS, Brasil.

7 ² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
8 Porto Alegre – RS, Brasil.

9 ³ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA), Porto
10 Alegre – RS, Brasil.

11 * Corresponding Author: lenz@ufrgs.br

12 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

13 Av. Bento Gonçalves, 9500

14 Prédio 43431, Lab 115, Porto Alegre, Rio Grande do Sul - 91501-970, Brazil.

15
16 **Keywords:**

17 Nucleolus, nucleus, glioblastoma, Ki67, actinomycin-D, temozolomide, nucleolar
18 stress

19
20 **Abstract**

21 The main function of nucleoli is to form the ribosomal subunits. Failure of proper
22 ribosomal biogenesis under favorable conditions or under cellular stress can create
23 an environment that may favors cancer development. The number and size of
24 nucleoli are commonly altered in almost all cancers and can be considered a
25 prognostic factor due to its influence on cell growth. However, whether nucleolar
26 changes occur after chemotherapy treatment and whether these changes are
27 relevant for tumor cell survival is unclear. Here, we characterized the response of

28 glioblastoma cells to acute temozolomide (TMZ) treatment. The stress induced by
29 TMZ resulted in nuclear and nucleolar morphological changes and increased Ki67
30 localization, a proliferation marker. We also characterized the response of two
31 glioblastoma cell lines with different p53 status to a combination of treatment with
32 temozolomide and actinomycin-D, an inducer of nucleolar stress. The cell line that
33 contains the WT p53 allele responded to the induction of nuclear stress and showed
34 a decrease in nuclear size after the combination treatment. The results support the
35 relevance of p53 in the nucleolar stress response combined to TMZ treatment.

36

37

INTRODUCTION

38 Nucleoli are non-membranous nuclear substructures, present in all eukaryotic cells
39 that have a nucleus, which can be seen as a distinguishable compartment by phase
40 contrast microscopy (PEDERSON, 2011). Its main function is associated with
41 ribosomal biosynthesis, which involves the processes of ribosomal rRNA
42 transcription and maturation, ribosomal subunit assembly, and transport to the
43 cytoplasm (STĘPIŃSKI, 2018). The nucleolus directly reflects the cellular capacity
44 for growth and proliferation, as increased ribosomal biogenesis correlates with
45 greater protein synthesis (ORSOLIC et al., 2016). Altered nucleolar morphology is
46 considered a hallmark feature of many tumor types. Intuitively, larger nucleolar size
47 and number are related to a ribosomal overproduction state, which will ultimately
48 support the tumor growth. But smaller nucleolar size and number were also recently
49 suggested to contribute to tumor initiation and progression (ORSOLIC et al., 2016).
50 The molecular causes and mechanisms involved in both situations are still poorly
51 understood. Key open questions are (i) whether there is a response and change in
52 nucleolar morphology induced by chemotherapy treatments, and (ii) how this might
53 impact on cell tolerance and survival.

54 The molecular profile of glioblastomas converges with changes within nucleoli since
55 most of these tumors carry mutations in tumor suppressor genes such as TP53
56 (LEE, 2016), which is directly involved in nucleolar response to stress (BOULON et
57 al., 2010; RUBBI; MILNER, 2003). The nucleolus responds to induction of stress
58 from radiation, hypoxia, or chemotherapeutic agents, resulting in morphological and

59 functional changes (Yang et al., 2018). These changes, especially the induction of
60 nucleolar disruption, result in translocation of nucleolar proteins. Once outside the
61 nucleolus, such proteins interact with and decrease the activity of MDM2, a negative
62 regulator of p53 (Boulon et al., 2010). This nucleolar activation of the p53 signaling
63 pathway induces many responses, such as cell cycle arrest and apoptosis
64 (BOULON et al., 2010; YANG; YANG; YI, 2018). Accordingly, large amounts of DNA
65 damage are not sufficient to stabilize p53 alone unless there is also nucleolar
66 disruption (Rubbi and Milner, 2003). So, nucleoli are directly associated to cell
67 response to stress in addition to also be related to the proliferative capacity of the
68 tumor.

69 Considering that the nucleolus is a protein depot, it harbors several proteins
70 including Ki67, which is best known as a proliferation marker used in biopsies from
71 patients with cancer (DE AZAMBUJA et al., 2007). Ki67 is continuously degraded in
72 G0 and G1 phases and accumulates from S to M phases (MILLER et al., 2018).
73 Ki67 locates at the dense fibrillar component of the nucleolus during interphase
74 (KILL, 1996), is physically associated to rDNA regions and co-localizes with the Pol
75 I transcription apparatus (Bullwinkel et al., 2006). In this sense, Ki67 is a double
76 marker, which can identify the nucleolar region within the nucleus through its
77 localization and provide an insight into the cell cycle stage of the cell through its
78 intensity.

79 To understand more about the role of nucleoli and of the nucleolar stress pathway
80 in response to chemotherapy, we characterized the nucleolar morphological
81 changes of glioblastoma cells carrying a fluorescent tag at the Ki67 locus, that were
82 subjected to temozolomide treatment. Moreover, we analyzed the different
83 responses of two glioblastoma cell lines, one of them carrying a TP53 mutation, that
84 received the treatment combination of temozolomide, first-line drug used in the
85 treatment of glioblastomas (BELTZIG et al., 2022), and actinomycin-D as a
86 nucleolar stress inducer.

87

88

89

RESULTS

90

Increase of nucleolar area and number

91 In order to analyze the nucleolar and nuclear morphologies, U251 cells had the
92 sequence of a fluorescent protein inserted by CRISPR-Cas9 at the C-terminal of the
93 MKI67 endogenous locus to generate Ki67-mVenus fusion protein. These cells also
94 were transduced with lentiviral vector with the truncated 53BP1 fused to mApple at
95 the N-terminal that serves as a marker of nuclear morphology and an indicator of
96 double strand breaks. Considering the interphasic nucleolar localization of Ki67
97 (KILL, 1996), fluorescent labeling of this protein only enables a clean analysis of
98 nucleolar morphology in cells that are at the S and G2 phases of the cell cycle. This
99 happens because during G1 phase Ki67 is not exclusively nucleolar, and it localizes
100 at foci scattered throughout the nucleoplasm (**Fig. 1A**). In this way, we select cells
101 to analyze in which a nucleolar localization of Ki67 was clear, thus being in S/G2
102 phase. All cells exhibiting the G1-like morphology were not considered for nucleolar
103 morphological analysis.

104 U251 Ki67-53bp1 cells were treated with 50 μ M temozolomide (TMZ) for 3 hours
105 and incubated in fresh media for up to six days, a condition that induces chronic
106 responses such as cell cycle arrest, autophagy, and senescence (FILIPPI-CHIELA
107 et al., 2015). Images of the untreated and treated populations were taken at times
108 immediately (0 h), three days (72 h) and six days (144 h) after the end of treatment
109 (**Fig. 1B**). Changes in nucleolar morphological characteristics could be observed in
110 glioblastoma cells three days after acute treatment with TMZ. There was an increase
111 in the sum of nucleolar area per cell, with a significant difference at three and six
112 days compared to time zero. However, untreated cells showed a decrease in the
113 sum of nucleolar area per cell with the increase of cell confluency (**Fig. 1C, 1D**).

114 Also, changes in total number of nucleoli per cell could be observed, in both groups,
115 but mainly in treated group (**Fig. 1D, 1E, S1A, Table S1**), suggesting that the sum
116 of the total area is a better indicator of stress than the number of nucleoli, since only
117 treated cells had increased in the sum of total area. The number of nucleoli per cell
118 increased after TMZ treatment, starting right after the 3h treatment, but reaching up

119 to 7 nucleoli per cell after 3 and 6 days (**Fig. 1E, S1A**). These data suggest that both
120 the number and the total area occupied by nucleoli increase after a pulse of TMZ.

121 **Increase of Ki67 expression in S/G2 treated cells**

122 Cells that underwent TMZ treatment also had a significant increase in Ki67
123 expression at days three and six compared to time zero ($p < 0.0001$). The protein
124 expression in the untreated group showed a small decrease at day six compared to
125 time zero, when cells were highly confluent (**Fig. 1F**). Ki67 is a proliferation marker
126 that has its expression peak at G2 phase in interphase (MILLER et al., 2018).
127 Considering that U251 cells have a longer G2 phase than S phase (**Fig. S1B**), it
128 should not naturally exist a large time-dependent expression difference, since most
129 of the quantified cells would be in the G2 phase. Also, as this increase does not
130 exist in the untreated group, this result indicates that the alteration in expression
131 was caused after the treatment.

132

133 **Changes in nuclear area accompanies the morphological change of** 134 **nucleolus**

135 Along with the increase in size of nucleoli, only in treated cells, the nuclear area also
136 changed (**Fig. S1C, S1D**). It was possible to note a significant enlargement of the
137 nuclear area of cells throughout the days compared to time zero. This increase in
138 size did not occur in the untreated group of cells (**Fig. 1G, 1H**). Also, in the treated
139 group, most of the cells at times 72h (65%) and 144h (88%) exceeded the average
140 Large threshold value (FILIPPI-CHIELA et al., 2012), that suggests a senescent
141 state or nuclear damaging event due a larger nuclei size.

142

143 **Nucleolar stress prevents enlargement of nuclei after temozolomide** 144 **treatment in TP53 WT cells**

145 Since the nuclear and nucleolar area increased after TMZ treatment in U251 cells,
146 we evaluated the combination treatment of ActD with TMZ, aiming to disrupt cell
147 growth response and possible increase in ribosomal synthesis seen with TMZ

148 treatment alone. ActD is currently the most widely used nucleolar stress inducing
149 agent (YANG; YANG; YI, 2018). To do this, we also used a lineage that does not
150 carry a TP53 mutation, the A172 cell line (LEE, 2016), aiming to see if there is a
151 difference in response between these cell lines.

152 After a 50 μ M TMZ treatment for 3 hours (day 1), we further incubated cells in
153 absence of TMZ for five days to observe the enlargement of cells and treated both
154 U251 and A172 cells with 5 nM ActD for 24h hours (day 6). ActD treatment induced
155 a reduction in nuclear size in the p53 WT A172 cells (LEE, 2016) treated with TMZ
156 (**Fig. 2A, S2A**), but not in TMZ-only or ActD-only groups, which kept increasing the
157 average nuclear size (**Fig. 2A**). In the p53 mutated U251 cell line, TMZ induced only
158 a transient increase in nuclear area and ActD had little to no effect (**Fig. 2C, S2B**).
159 This response matches previous data of the U251 cell line with fluorescent markers
160 of nucleus (53bp1-mApple) and nucleolus (Ki67-mVenus) (**Fig. 1**), where there was
161 also an increase in nuclear size seen between day three and six. The spontaneous
162 decrease that occurred is probably due to the induction of cell death in larger cells,
163 which happened faster in U251 than in A172 (**Fig. 2B, 2D**), thus reducing average
164 number of the population.

165 Treatment with ActD alone showed no statistically relevant difference relative to any
166 of the groups on any of the days, except to the Untreated group, and this is the case
167 for both cell lines (**Fig. 2B, 2D**). Also, there was no statistically relevant difference
168 between TMZ and TMZ + ActD groups ($p>0.05$), suggesting that the combination of
169 TMZ and ActD does not reflect in a higher treatment efficiency (**Fig. 2B, 2D**).

170

171

DISCUSSION

172 To date, there is no reports in literature about the characterization of nucleolar
173 response of cells subjected to temozolomide treatment. Using a TP53 mutated
174 glioblastoma cell line, we could see morphological changes in the nucleus and
175 nucleolus induced by temozolomide treatment. Temozolomide treatment induces
176 DNA acetylation, in a way that it can cause cell cycle arrest at G2/M phases and
177 senescence (AASLAND et al., 2019). This could explain the change in nuclear size,

178 and in whole cell size (Fig. S1E), but U251 cell line is already reported as a lineage
179 that does not undergo a senescence state, due its TP53 mutation (LEE, 2016;
180 SILVA et al., 2016). Also, nucleolar morphology of senescent cells is described as
181 one single large nucleolus derived from the fusion of multiple smaller nucleoli
182 (characteristic of cycling cells) that existed before entering the senescent state
183 (YANG et al., 2015), different of what was seen in the results obtained from the
184 nucleolar area analysis (Fig. 1C, 1D, 1E). Given these factors, we can suggest that
185 the increase in nuclear and nucleolar area probably occurs as a response to TMZ-
186 induced stress, and the enlargement of structures is not due a senescence
187 phenotype.

188 Also, although most of treated cells at times 72h (65%) and 144h (88%) exceeded
189 the average Large threshold value, suggesting a senescent state or nuclear
190 damaging event, it is already reported that U251 cell line, after receiving 50 μ M TMZ,
191 shows an increase in nuclear area, that also exceeds the average Large threshold
192 value, but spontaneously decreases in the following days (LENZ et al., 2021). This
193 suggests that the U251 cell line starts but is not capable of maintaining a senescent
194 state, and perhaps we could observe the same behavior in our data if the analysis
195 lasted longer than just 6 days.

196 Szaflarski et al. (2022) showed that some types of stress can inhibit the initial steps
197 of rRNA processing in a way that unprocessed rRNA can be retained within the
198 nucleolus until stress resolves. This could explain the enlargement of nucleolar area
199 that occurred only in treated cells. However, the enlargement of the nucleolar size
200 is also related to an increased ribosomal biogenesis rate, and this also could be a
201 response to stress and survival. This is an issue not yet explored in other reports,
202 and it would be interesting to determine if this is in fact a fundamental response and
203 is needed to survival of cancer cells.

204 In a normal context, we could expect that the genotoxic stress induced by TMZ
205 would cause nucleolar stress and mobilization of p53, resulting in senescence or
206 apoptosis. Nucleolar stress causes nucleolar disruption, which presents itself as the
207 loss of the normal morphology of the nucleolus, where its normal spherical shape
208 turns into a thinner, less condensed structure, spread throughout the nucleus

209 (Stimpson et al., 2014). In our data this did not happen, suggesting that the TMZ-
210 induced stress in U251 does not necessarily induce a nucleolar stress response,
211 probably due its p53 mutation, although impacts the nucleolar environment
212 somehow.

213 Also, the TMZ stress enhanced Ki67 signal in these cells. Considering that all cells
214 quantified were at the same phase of cell cycle, it was not expected to find an
215 increased expression of a protein that is considered a marker of proliferation, only
216 in treated cells. Currently, there is nothing in literature that reports the behavior of
217 Ki67 under chemotherapy-induced stress. The increase of Ki67 expression in G2
218 cells that received temozolomide may indicate that accumulation of Ki67 under
219 stress occurs. Bullwinkel et al. (2006) showed that Ki67 is physically associated to
220 rDNA clusters, co-localizing with the Pol I transcription apparatus and newly
221 synthesized rRNA. This emphasizes the role of Ki67 in early steps of rRNA
222 synthesis and that rRNA synthesis occurs as a response to TMZ-induced stress,
223 either in a situation where it is not processed and accumulates, or where increased
224 ribosomal biogenesis rate takes place.

225 Besides that, we also saw different responses to TMZ and ActD treatments between
226 A172 and U251 cell lines. Actinomycin-D (ActD) is an antibiotic molecule with
227 cytotoxic action used as an antineoplastic agent in the treatment of a range of cancer
228 types (CHOONG et al., 2009). The use of extremely low dosages of ActD, such as
229 5 nM (YANG; YANG; YI, 2018), can specifically inhibit the activity of RNA
230 polymerase I (RNA pol I), the RNA pol responsible for transcribing the ribosomal
231 DNA (GRUMMT, 2003). Therefore, its use at this low concentration inhibits the
232 transcription of ribosomal genes and the ribosomal biogenesis, inducing a nucleolar
233 stress state which leads to a cellular stress response that activates the p53 signaling
234 pathway (BOULON et al., 2010; YANG; YANG; YI, 2018). A172 cells that receive
235 combination treatment (TMZ + ActD) did not grow as large as cells that receive only
236 TMZ. In fact, by day 11, combination treatment group appeared to show a smaller
237 average nuclear area than every other experimental group except untreated group.
238 This difference between groups was not seen in U251 cells. This raises a discussion
239 on the importance of the possible role that p53 functionality plays in the nucleolar
240 stress signaling pathway, and how this may be linked to a senescent state. In cells

241 that carries a mutation in this protein, the induction of nucleolar stress showed no
242 difference between groups: cells that received TMZ treatment showed a similar
243 behavior, regardless of whether they received ActD afterwards. And the cells that
244 received only ActD showed the same behavior as the untreated group.

245 It needs to be further investigated whether in A172 cells the apparent decrease in
246 nuclear area of cells that received combination treatment is a senolytic response,
247 i.e., receiving ActD after TMZ treatment induces senolysis in surviving cells and
248 because of that only non-senescent cells were quantified; or whether the cells stop
249 growing or even decrease in size after ActD treatment. The combination of treatment
250 did not reflect in a higher treatment efficiency; however, it is necessary to test if a
251 TMZ retreatment after the ActD application sensibilizes the cells, to investigate if the
252 remaining smaller cells could die with a new round of TMZ treatment. It is also
253 necessary to evaluate nucleolar behavior with the combination of treatments.

254 In short, the results obtained in this work show that it is possible to observe changes
255 in nucleolar morphology in response to chemotherapy treatment with temozolomide.
256 Somehow, the nucleolus participates or is impacted by the chemotherapy-induced
257 stress response, and if this is investigated further, it may give us insight into how
258 important the nucleolar response is for cancer survival. Furthermore, preliminary
259 results shown here suggest that the combination of TMZ treatment with ActD inhibits
260 the development of a senescence-like phenotype only in TP53 WT cells, reinforcing
261 the participation of p53 in the nucleolar stress signaling pathway and opening up a
262 treatment possibility where ActD impacts the senescent phenotype.

263

264

MATERIAL AND METHODS

265

Cell Culture

266 U251 cell line (human glioblastoma, ATCC) stably expressing Ki67 (mVenus
267 CRISPR-Cas9-tagging (LENZ et al., 2021)) and 53bp1 (Addgene #69531)
268 fluorescent markers, A172 (human glioblastoma, ATCC) and U251 (human
269 glioblastoma, ATCC) cell lines stably expressing H2B-mCherry (Addgene #89766)
270 fluorescent marker, and U251 cell line stably expressing FastFUCCI fluorescent

271 marker (Addgene #86849) were maintained in Gibco Dulbecco's Modified Eagle
272 Medium (DMEM) Low Glucose (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10%
273 Fetal Bovine Serum (FBS) in flasks, and HEK-293T (human kidney embryonic cell,
274 ATCC) was maintained in DMEM High Glucose (Thermo Fisher Scientific) medium
275 supplemented with 10% FBS in flasks. All lineages were kept at 37°C and 5% CO₂
276 incubator. Penicillin/streptomycin and fungizone were used to avoid contamination.
277 DMSO-diluted stock concentration of temozolomide (Sigma-Aldrich) (100mM) and
278 actinomycin-D (Sigma-Aldrich) (7,9 µM) were diluted in 10% FBS supplemented
279 DMEM Low Glucose medium to the 50 µM and 5 nM concentrations, respectively.

280

281

Lentiviral Transduction

282 Stable expression of Apple53BP1trunc plasmid (Addgene #69531) was achieved by
283 lentiviral transduction of U251 cells already selected by geneticin and expressing
284 Ki67-mVenus tagging. Stable expression of FastFUCCI plasmid (Addgene #86849)
285 was achieved by lentiviral transduction of U251 WT cells. Stable expression of H2B-
286 mCherry (Addgene #89766) was achieved by lentiviral transduction of U251 WT and
287 A172 WT cells. *E.coli* bacteria were heat shock transformed with the plasmids and
288 the inoculum containing the transformed bacteria was incubated in 5 mL of liquid LB
289 medium containing 0,1 mg/mL ampicillin, kept in an incubator at 37°C overnight,
290 along with a negative control and a positive control. The next day, plasmid was
291 purified using the PureLink HiPure Plasmid Miniprep kit (Invitrogen), following the
292 manufacturer's recommendations. Virus production was performed on HEK-293T
293 cells plated at a density of 250,000 cells per well in a 6-well plate. A mix was made
294 in the ratio plasmid of interest : 2 RRE plasmid : 1 REV plasmid : 1,5 VSVG plasmid.
295 A ratio of 3 polyethyleneimine (PEI) : 1 plasmid of interest was added to the mix and
296 was incubated for 15 minutes. After the incubation time the mix was dripped onto
297 the plate, which contained 800 µL of DMEM High Glucose without FBS and without
298 penicillin/streptomycin and fungizone. After 4 days the viral supernatant was filtered,
299 collected, and reserved in microtubes that were kept in an ultra-freezer at -80°C.
300 Viral transduction was performed in the lineages at 50% confluence. A mix at the
301 ratio of 1 µL polybrene for every 1 mL of viral supernatant was placed in the wells.

302 The plate was centrifuged for 45 minutes at 700xg at 25°C and the medium was
303 changed the next day. After all, the lineages were tested for Mycoplasma infection
304 using the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

305

306 **Fluorescence Microscopy**

307 Images captured by optical microscopy at 100 x magnification were taken using the
308 AxioVert 200 inverted microscope with the green filter (510-560 nm) and red filter
309 (590-650 nm) with 600 ms of exposure. After puromycin selection, U251 Ki67-53bp1
310 tagged cells were plated at a density of 5,000 cells per chamber in a 4-chamber
311 glass bottom dish previously treated with 0,1 mg/mL polylysine for 4 hours.

312 A172 and U251 H2B-mCherry images were captured every 3 hours by Incucyte®
313 Live-Cell Analysis System at 20x magnification with the green and red channels
314 (S3/SX1 G/R Optical Module) with 100 ms of exposure. After blasticidin selection,
315 cells were plated at a density of 15000 cells per well in a 12-well plate. Imaging
316 started immediately after the end of 50 µM temozolomide treatment (3 hours) of the
317 TMZ and TMZ+ActD groups and after the end of 5 nM actinomycin-D treatment (24
318 hours) of the ActD group, that were synchronized to finish at the same time. Cells
319 from TMZ and untreated groups from both cell lines underwent trypsinization at day
320 7 (50% of cells were disposed) due high confluence.

321 U251 FastFUCCI images were captured every 1 hour during 24h by InCell Analyzer
322 2200 (GE Healthcare) using FITC (green) and Cy3 (red) lasers. After puromycin
323 selection, cells were plated at a density of 500 cells per well in a 96-well plate.

324 All the experiments were made using n = 1 well per condition.

325

326 **Image Analysis**

327 All the image analysis for U251 Ki67-53bp1 cell line quantification was made using
328 ImageJ Fiji software by manually outlining the objects using polygon selections
329 option. The Ki67 fluorescent mark was used to outline nucleoli whereas the 53bp1
330 fluorescent mark was used to outline nucleus. The background mean intensity were

331 discounted in all the objects analysis. Field confluency percentage of untreated
332 group was quantified by the area in pixels that the cells occupied within the photo
333 field in relation to the total area of the photo. For statistics GraphPad Prism 8 was
334 used with data analyzed by unpaired t test relative to time zero for each group.
335 Average Large threshold value was calculated by the Nuclear Morphometric
336 Analysis (FILIPPI-CHIELA et al., 2012),

337 The image analysis for A172 H2B-mCherry and U251 H2B-mCherry nuclear size
338 quantification was made using ForNMA automated quantification, a software
339 developed by our group. For statistics and removal of outliers GraphPad Prism 8
340 was used with ROUT method (Q = 5%), with data analyzed by unpaired t test
341 between groups. Cell number quantification was calculated by the average cell
342 number per field of each well (4 fields by well) using manual counting and Find
343 Maxima option in ImageJ Fiji software. Wells that were subjected to trypsinization
344 had the cell count multiplied by the percentage removed.

345 The image analysis for U251 FastFUCCI was done by quantifying the total time in
346 which the cells showed green, red or both fluorescence. Red cells were considered
347 to be in G1 phase, green cells were considered to be in G2 phase, and cells that
348 showed both (yellow) fluorescence were considered to be in S phase (KOH et al.,
349 2017). The graph was made based on the calculation of the average time that the
350 cells remained in each phase.

351

352

ACKNOWLEDGEMENTS

353 We would like to thank Ralph Weissleder for the Apple-53BP1trunc (Addgene
354 plasmid #69531; <http://n2t.net/addgene:69531>; RRID: Addgene_69531), Torsten
355 Wittmann for the pLenti6-H2B-mCherry (Addgene plasmid #89766;
356 <http://n2t.net/addgene:89766>; RRID: Addgene_89766) and Kevin Brindle & Duncan
357 Jodrell for the pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro (Addgene plasmid #86849;
358 <http://n2t.net/addgene:86849> ; RRID: Addgene_86849). We also wish to thank Dr.
359 Gallit Lahav (Harvard University) for the plasmid for Ki67 CRISPR tagging.

360

COMPETING INTERESTS

361

362 The authors declare no competing or financial interests.

363

FUNDING

364

365 This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
366 Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande
367 do Sul (FAPERGS) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
368 Superior (Capes) funding agencies. DT and LCP received CAPES fellowship. LSL
369 and GL received CNPQ fellowships.

370

REFERENCES

371

372 **Aasland, D., Gotzinger, L., Hauck, L., Berte, N., Meyer, J., Effenberger, M.,**
373 **Schneider, S., Reuber, E. E., Roos, W. P., Tomicic, M. T., et al. (2019).**
374 Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in
375 glioblastoma cells via activation of ATR–Chk1, p21, and NF-κB. *Cancer Res* **79**, 99–
376 113.

377 **Beltzig, L., Schwarzenbach, C., Leukel, P., Frauenknecht, K. B. M., Sommer,**
378 **C., Tancredi, A., Hegi, M. E., Christmann, M. and Kaina, B. (2022).** Senescence
379 Is the Main Trait Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells. *Cancers* **14**.

380 **Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F. M. and Lamond, A. I. (2010).**
381 The Nucleolus under Stress. *Mol Cell* **40**, 216–227.

382 **Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J. and**
383 **Scholzen, T. (2006).** Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription
384 in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* **206**, 624–635.

385 **Campaner, S., Doni, M., Verrecchia, A., Fagà, G., Bianchi, L. and Amati, B.**
386 (2010). Myc, Cdk2 and cellular senescence: Old players, new game. *Cell Cycle* **9**,
387 3679–3685.

388 **Choong, M. L., Yang, H., Lee, M. A. and Lane, D. P.** (2009). Specific activation of
389 the p53 pathway by low dose actinomycin D: A new route to p53 based cyclotherapy.
390 *Cell Cycle* **8**, 2810–2818.

391 **de Azambuja, E., Cardoso, F., de Castro, G., Colozza, M., Mano, M. S., Durbecq,**
392 **V., Sotiriou, C., Larsimont, D., Piccart-Gebhart, M. J. and Paesmans, M.** (2007).
393 Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published
394 studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* **96**, 1504–1513.

395 **Filippi-Chiela, E., Oliveira, M., Jurkovski, B., Callegari-Jacques, S., da Silva V.,**
396 **Lenz G.** (2012) Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence,
397 apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8.

398 **Filippi-Chiela, E., Silva, M., Thomé, M., Lenz G.** (2015) Single-cell analysis
399 challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA
400 damage. *Autophagy*, v. 11, n. 7, p. 1099–1113.

401 **Grummt, I.** (2003). Life on a planet of its own: Regulation of RNA polymerase I
402 transcription in the nucleolus. *Genes Dev* **17**, 1691–1702.

403 **Kill, I. R.** (1996). Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. *J Cell Sci*
404 **109**, 1253–1263.

405 **Lee, S. Y.** (2016). Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis*
406 **3**, 198–210.

407 **Lenz, L. S., Faccioni, J. L., Bracco, P. A., Santos, J. A. F., Pereira, L. C., Buss,**
408 **J. H., Tamborindeguy, M. T., Torgo, D., Monteiro, T., Mantovani, G. B., et al.**
409 (2021). Cancer cell fitness is dynamic. *Cancer Res* **81**, 1040–1051.

410 **Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D. and Spencer, S. L.**
411 (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus
412 Quiescence. *Cell Rep* **24**, 1105-1112.e5.

413 **Orsolich, I., Jurada, D., Pullen, N., Oren, M., Eliopoulos, A. G. and Volarevic, S.**
414 (2016). The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and
415 emerging paradigms. *Semin Cancer Biol* **37–38**, 36–50.

416 **P. Rubbi, C. and Milner, J.** (2003). Disruption of the nucleolus mediates
417 stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.*

418 **Pederson, T.** (2011). The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–15.

419 **Petrova, N. v., Velichko, A. K., Razin, S. v. and Kantidze, O. L.** (2016). Small
420 molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* **15**, 999–1017.

421 **Roos, W. P., Nikolova, T., Quiros, S., Naumann, S. C., Kiedron, O., Zdzenicka,**
422 **M. Z. and Kaina, B.** (2009). Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required
423 for protection against O6-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and
424 chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair (Amst)* **8**, 72–
425 86.

426 **Rubbi, C. P. and Milner, J.** (2003). Disruption of the nucleolus mediates
427 stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO Journal*
428 **22**, 6068–6077.

429 **Silva, A. O., Dalsin, E., Onzi, G. R., Filippi-Chiela, E. C. and Lenz, G.** (2016). The
430 regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic
431 responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* **348**, 177–183.

432 **Stępiński, D.** (2018). The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells.
433 *Histochem Cell Biol* **150**, 607–629.

434 **Stimpson, K. M., Sullivan, L. L., Kuo, M. E. and Sullivan, B. A.** (2014). Nucleolar
435 Organization, ribosomal DNA array stability, and acrocentric chromosome integrity
436 are linked to telomere function. *PLoS One* **9**.

437 **Szaflarski, W., Leśniczak-Staszak, M., Sowiński, M., Ojha, S., Aulas, A., Dave,**
438 **D., Malla, S., Anderson, P., Ivanov, P. and Lyons, S. M.** (2022). Early rRNA
439 processing is a stress-dependent regulatory event whose inhibition maintains
440 nucleolar integrity. *Nucleic Acids Res* **50**, 1033–1051.

441 **Yang, L., Song, T., Chen, L., Soliman, H. and Chen, J.** (2015). Nucleolar
442 repression facilitates initiation and maintenance of senescence. *Cell Cycle* **14**,
443 3613–3623.

444 **Yang, K., Yang, J. and Yi, J.** (2018). Nucleolar stress: Hallmarks, sensing
445 mechanism and diseases. *Cell Stress* **2**, 125–140.

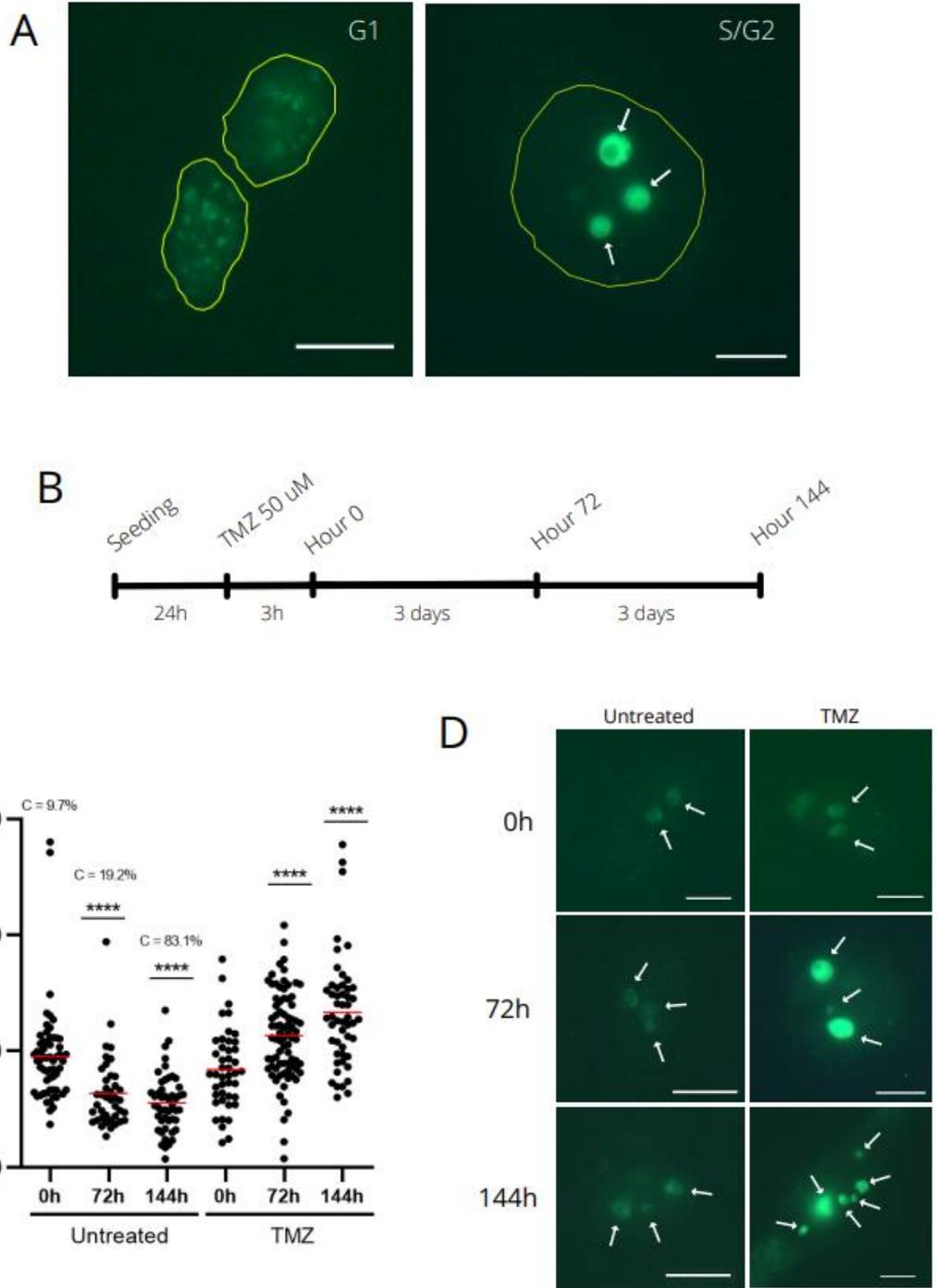
446

447

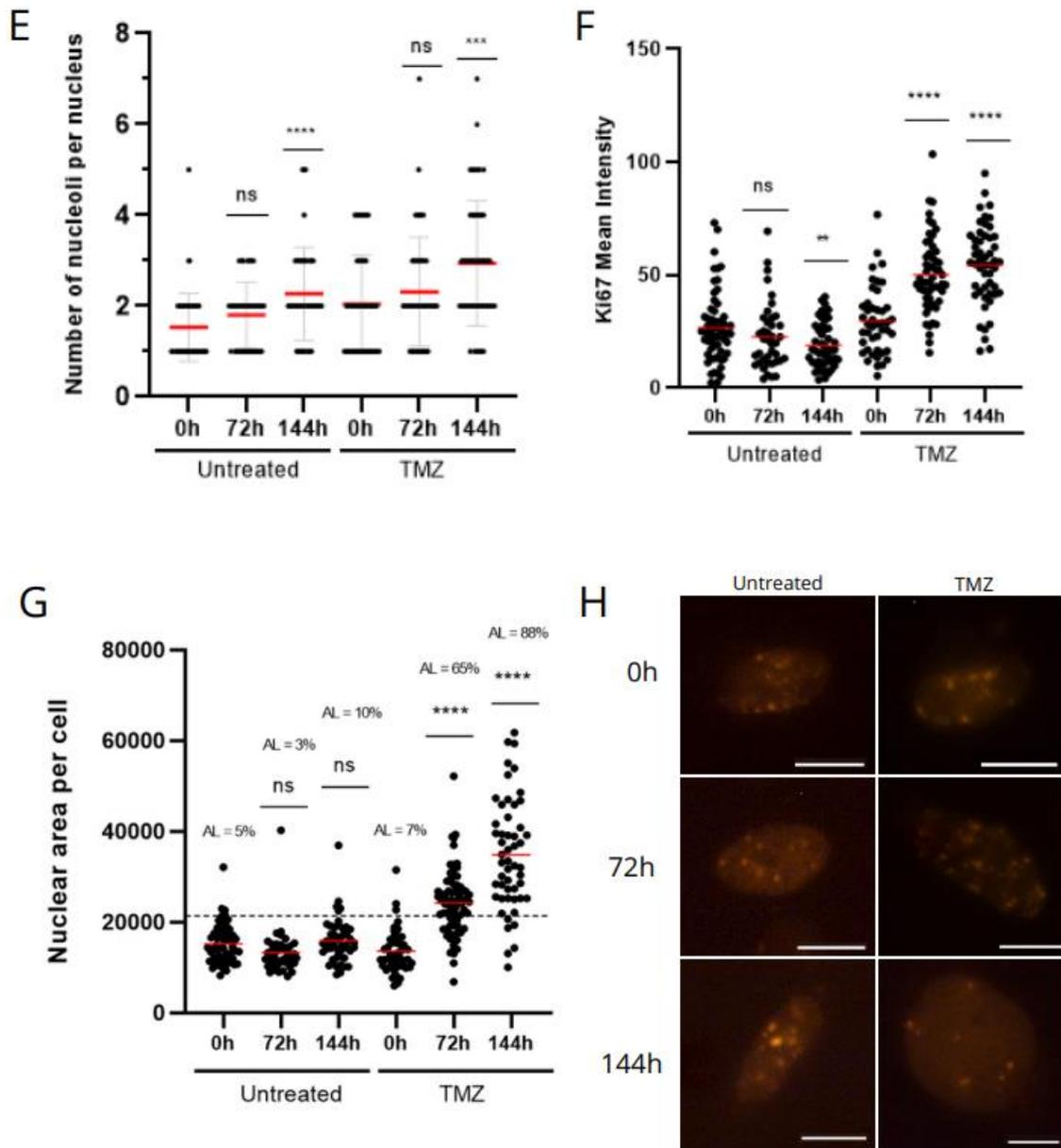
448

FIGURES

449



450



452

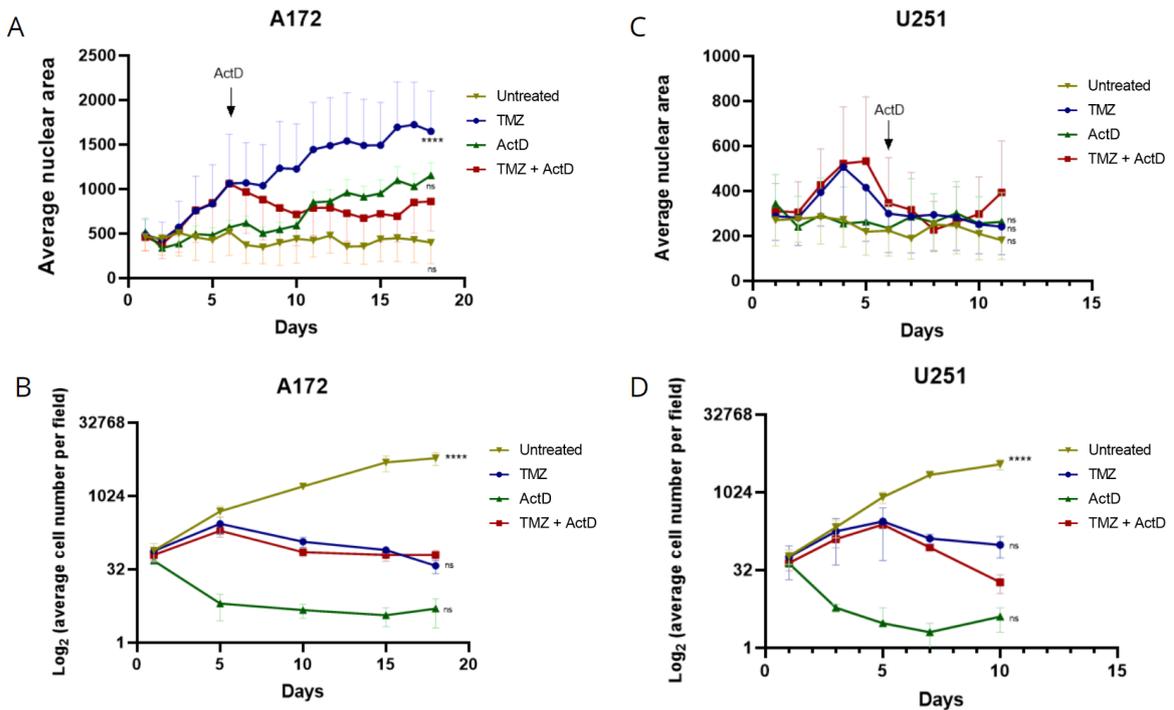
453

454 **Figure 1: Characterization of nuclear and nucleolar responses of U251 Ki67-**
 455 **53bp1 cell line to temozolomide**

456 **A.** Fluorescence microscopy image of two cells with G1-like morphology (left) and
 457 one cell with S/G2-like morphology (right). Yellow line representing the nuclear area.
 458 Arrows showing each nucleolus in the focus of the image. Scale bar = 10 μ m. **B.**
 459 Timeline showing the treatment moment, in case of treated condition, and the
 460 moments where the pictures were taken. Untreated condition did not receive any

461 treatment. **C.** Dot plot showing the sum of area of all the nucleoli within each cell at
462 different times after treatment. Field confluency percentage (C%) of each time in
463 untreated condition presented above groups. **D.** Microscopy images of Ki67-
464 mVenus tag at nucleoli of untreated and treated conditions at different times after
465 treatment. Arrows showing each nucleolus in the focus of the image. Scale bar = 10
466 μm . **E.** Dot plot showing the number of nucleoli per nucleus of untreated and treated
467 conditions at different times after treatment. **F.** Dot plot of nucleolar Ki67-mVenus
468 mean intensity of each cell at different times after treatment. Values normalized by
469 the background intensity. **G.** Dot plot showing the area of the nucleus of each cell
470 at different times after treatment. Dot line representing the average Large threshold
471 value ($=21721.2$) of the population with normal nuclei. AL (above large) representing
472 the percentage of cells above the line of each group. Cells with values above the
473 threshold suggests a senescence state or nuclear damaging event according to the
474 Nuclear Morphometric Analysis (FILIPPI-CHIELA et al., 2012). **H.** Microscopy
475 images of 53bp1-mApple tag at nucleus of untreated and treated conditions at
476 different times after treatment. Scale bar = 10 μm . Data analyzed by two-tailed
477 unpaired t test relative to time zero for each group in 1C, 1E, 1F and 1G with the
478 significance values shown in the graph as their respective p value summaries. Red
479 lines representing the average value for each group in 1C, 1E, 1F and 1G.

480



481

482 **Figure 2: Changes of A172 H2B-mCherry and U251 H2B-mCherry in average**
 483 **nuclear area and remaining cell number with different treatments**

484 Average nuclear area of A172 **(A)** and U251 **(C)** cells by time in days. Actinomycin-
 485 D 5 nM treatment of the treatment combination group (TMZ + ActD) was added on
 486 day 6. Average cell number per field (Log₂) of A172 **(B)** and U251 **(D)** cells by time.
 487 Data analyzed by two-way ANOVA between groups. Significance values shown in
 488 the graph as their respective p value summaries relative to treatment combination
 489 group (TMZ + ActD) on the last day.

490

491

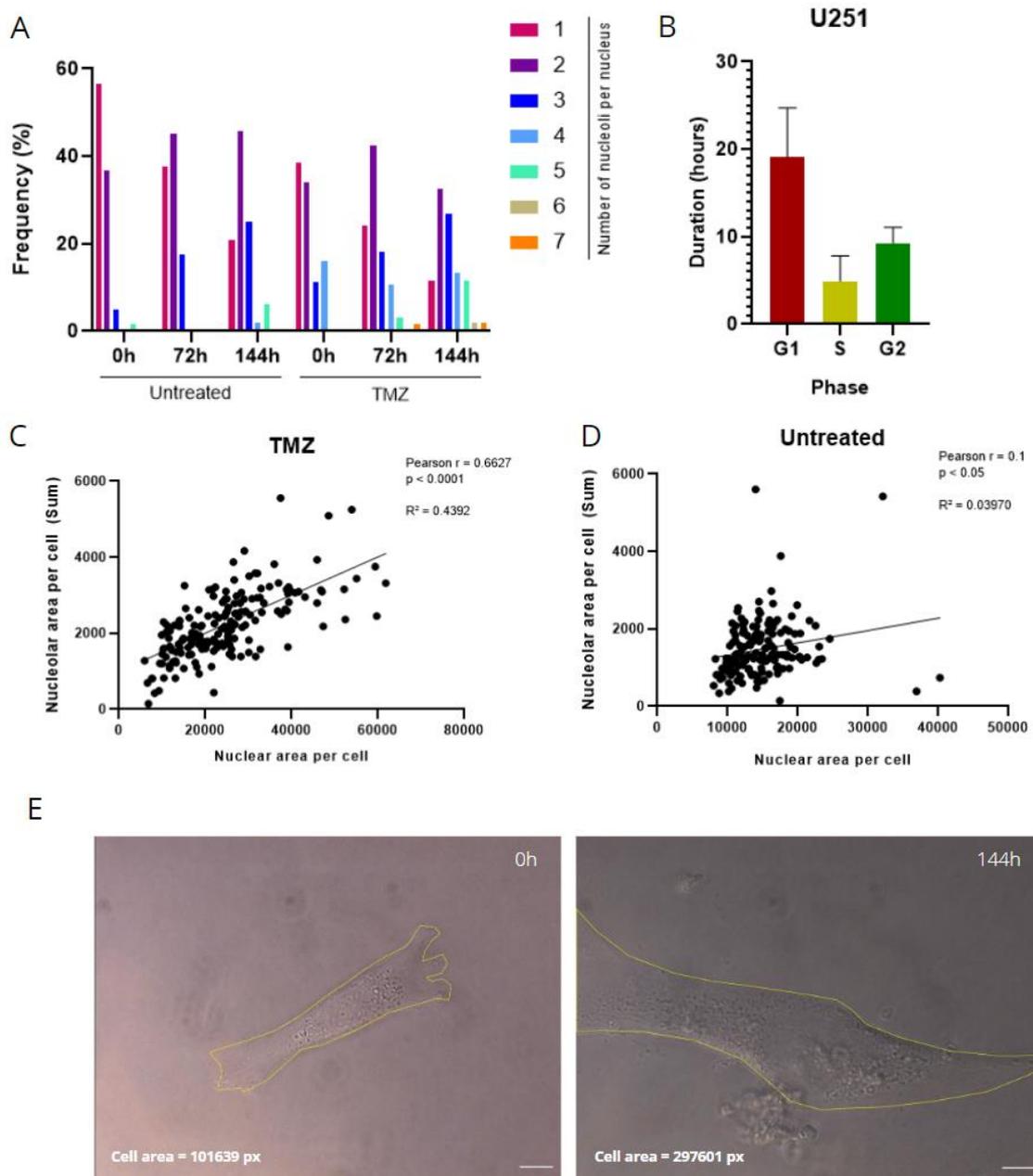
Supplemental information for:

492 Nucleolar and nuclear alterations in glioblastomas induced by temozolomide and
493 actinomycin-D treatment

494

495 Daphne Tórgo^{1,2}, Luana S. Lenz³, Luiza C. Pereira^{1,2} and Guido Lenz^{1,2}

496

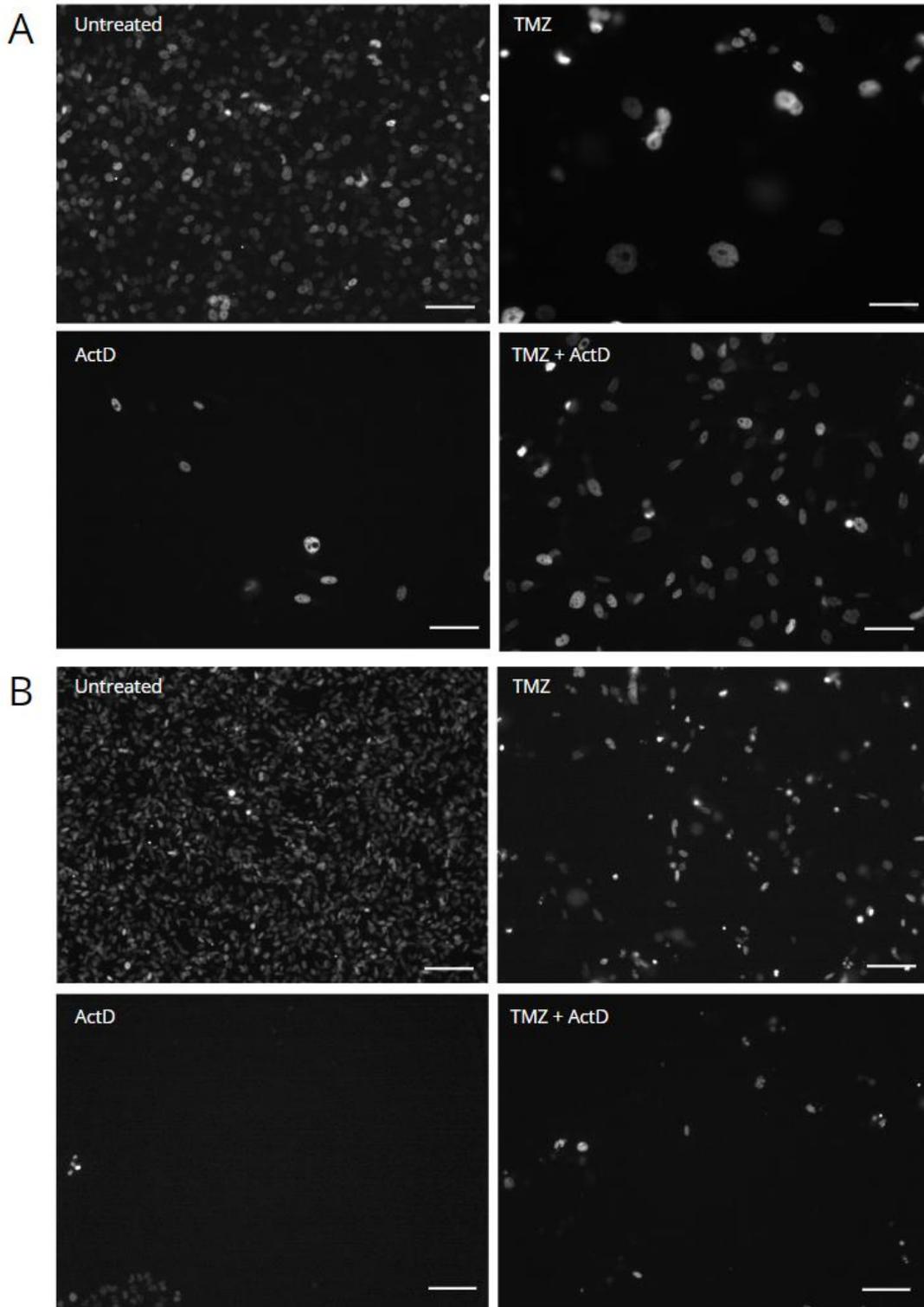


497

498

499 **Supplementary Figure 1. A.** Frequency of the number of nucleoli per cell present
500 in each condition at different times after treatment. **B.** Average duration in hours of
501 each cell cycle phase in the U251 cell line. Bars representing the standard deviation
502 of each phase. G1 (n=10), S (n=15), G2 (n=7). **C.** Correlation between nucleolar
503 and nuclear areas per cell of treated group. **D.** Correlation between nucleolar and
504 nuclear areas per cell of untreated group. **E.** Bright field microscopy image of cells
505 in treated group at times 0 (left) and 144h (right) after the temozolomide treatment.
506 Yellow lines representing the cell boundary. Area values in pixels of each cell in the
507 respective images. Scale bar = 10 μm . Data analyzed by Pearson correlation in S1C
508 and S1D.

509



510

511 **Supplementary Figure 2. A.** Fluorescence microscopy images (red channel) of
 512 each condition of A172 cells by day 18. **B.** Fluorescence microscopy images (red
 513 channel) of each condition of U251 cells by day 11. Cell count should not be

514 considered as real number in these images due previous trypsinization. Scale bar
515 = 100 μ m

516

	CT 0h	TMZ 0h	CT 72h	TMZ 72h	CT 144h	TMZ 144h
CT 0h	-	0,0051 (**)	0.0797 (ns)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)	<0,0001 (****)
TMZ 0h	0,0051 (**)	-	0.2285 (ns)	0.2247 (ns)	0.3069 (ns)	0.0007 (***)
CT 72h	0.0797 (ns)	0.2285 (ns)	-	0.0146 (*)	0.0167 (*)	<0,0001 (****)
TMZ 72h	<0,0001 (****)	0.2247 (ns)	0.0146 (*)	-	0.8248 (ns)	0.0095 (**)
CT 144h	<0,0001 (****)	0.3069 (ns)	0.0167 (*)	0.8248 (ns)	-	0.0072 (**)
TMZ 144h	<0,0001 (****)	0.0007 (***)	<0,0001 (****)	0.0095 (**)	0.0072 (**)	-

517

518 **Supplementary Table 1.** Table containing two-tailed unpaired t test p values
519 relative to Figures 1E and S1A.

DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação teve como objetivo principal caracterizar a resposta de células de glioblastoma à quimioterapia, visando investigar a participação do nucléolo na tolerância ao estresse. Apesar de a morfologia nucleolar ser um parâmetro considerado no prognóstico de vários tipos tumorais, não havia, até o momento, nenhuma informação a respeito da indução de mudanças morfológicas nucleolares em resposta ao tratamento com TMZ.

Com os resultados obtidos nesse trabalho, pudemos ver que o nucléolo, o núcleo e a expressão de Ki67 apresentam mudanças induzidas pelo tratamento, em células mutadas para o gene TP53. Com base em informações encontradas na literatura, que serão discutidas adiante, é possível sugerir a hipótese de que o estresse causado pelo TMZ induz o acúmulo e/ou aumento da síntese de rRNA nessas células. Apesar de os resultados obtidos aqui não explorarem se esse comportamento, de fato, contribui para a sobrevivência da célula, foi possível obter novas informações em relação ao fenótipo de resposta ao tratamento em células de glioblastoma e como elas podem estar ligadas ao fato de a célula ser deficiente para uma proteína que possui papel essencial na resposta ao estresse.

O tratamento agudo de TMZ em glioblastomas resultou no aumento das áreas nuclear e nucleolar em uma linhagem celular conhecida por não entrar em senescência, devido à sua mutação em p53 (LEE, 2016; SILVA et al., 2016). Silva et al. (2016) mostraram que, entre várias linhagens de glioblastoma, a linhagem U251, após tratamento com TMZ (50 μ M) por 5 dias, foi a única que mostrou uma resposta apoptótica, onde as células que sobreviveram não entraram em senescência. Todas as outras linhagens, que possuíam um fenótipo selvagem para p53, incluindo a A172, tiveram parada de ciclo precoce seguida de indução de senescência, sugerindo que o p53 não é necessário para apoptose induzida por TMZ, mas é importante para a indução de senescência em glioblastomas.

Portanto, a resposta observada na U251 sugere que o aumento dessas estruturas é induzido pela resposta ao estresse, e não devido ao desenvolvimento de um fenótipo senescente. Para que uma célula seja capaz de aumentar em tamanho, existe a necessidade do aumento da síntese proteica, que vem acompanhada do

aumento da biogênese ribossomal. Szaflarski et al. (2022) mostraram que alguns tipos de estresse celular são capazes de inibir as etapas iniciais do processamento de pré-rRNAs, de forma que eles possam ficar retidos dentro do nucléolo. Com o acúmulo de pré-rRNAs, pode haver o acúmulo de proteínas envolvidas no processamento destes rRNAs imaturos, de modo que isso possa impactar também na área total do núcleo, já que, apesar de a maioria das etapas de processamento acontecerem no nucléolo, alguns eventos adicionais ocorrem no nucleoplasma em eucariotos (HENRAS et al., 2015). Apesar disso, já foi mostrado também que o aumento na área nucleolar está diretamente relacionado com o aumento da atividade da RNA Pol I, da expressão de proteínas envolvidas no processamento de pré-rRNA, como a fibrilarina, e aumento da expressão de proteínas envolvidas no aparato de transcrição da RNA Pol I, como a UBF (FARLEY et al., 2015), sugerindo que o aumento da área também pode estar relacionado diretamente com o aumento da biogênese ribossomal.

Como esses resultados só englobam a resposta aguda de 6 dias após o tratamento, é possível que o aumento da área nuclear visto nessas células não continue acontecendo, e até mesmo reduza com o passar do tempo. Outros trabalhos experimentais (SILVA et al., 2016) já mostraram que o tratamento com TMZ, seguindo o regime terapêutico padrão de 5 dias usado na clínica, não resulta no aumento significativo do tamanho nuclear de células U251 e não apresenta marcação de β -gal, reforçando que esse não seria o caso de um fenótipo senescente. Além disso, é possível ver na **Figura 2C**, usando uma administração terapêutica aguda, que não ocorre aumento da área nuclear nas células U251 após o 6º dia. Considerando que, provavelmente, a diminuição espontânea da média da área nuclear é em decorrência da indução de morte celular - o que faz com que as células comecem a perder aderência ao fundo da placa e apresentem uma morfologia diminuída que impacta na média populacional -, se a área nuclear das células vivas continuasse aumentando, veríamos uma linha constante perto dos dias 4/5, e não uma diminuição.

O número de nucléolos também apresentou mudanças após a administração aguda de TMZ. Foi possível ver que, em relação ao grupo não tratado, as células que receberam TMZ imediatamente já apresentaram um número médio maior de

nucléolos por célula após o tratamento. Porém, no sexto dia, os grupos de ambas as condições apresentaram um aumento no número médio de nucléolos. De forma inversamente proporcional, a soma total nucleolar das células não tratadas diminuiu com o passar dos dias, enquanto o número médio de nucléolo por células aumenta no sexto dia. Considerando que os nucléolos só se formam em NORs com transcrição ativa (FARLEY et al., 2015), existe a possibilidade de, em condições normais, as células aumentarem sua biogênese ribossomal em decorrência da alta taxa proliferativa, e isso ser refletido no aumento de NORs ativas e no aumento do número de nucléolos. Diferente do que pudemos ver nas células tratadas, não há aumento da área nucleolar nas células não tratadas, indicando que esse aumento das células que receberam TMZ pode ser em função do acúmulo de rRNAs não processados resultantes da indução de estresse e não apenas do aumento da taxa de biogênese ribossomal.

Porém, o número nucleolar é altamente dinâmico, e varia por razões ainda não totalmente elucidadas. Por isso, é difícil concluir o quão significativo é esse parâmetro na resposta ao tratamento. Em 2015, Farley et al. mostraram que o número de nucléolos por célula é muito variável dentro de uma mesma população de células, e também varia muito entre linhagens celulares. Existem várias situações que podem alterar o número de nucléolos de uma célula. Por exemplo, já foi mostrado que a depleção de proteínas envolvidas na regulação transcricional da RNA pol I está diretamente relacionada com o aumento do número de nucléolos em células epiteliais de mama humanas (OGAWA et al., 2021). Além disso, a depleção de proteínas necessárias para a biogênese ribossomal resulta na redução do número de nucléolos (FARLEY-BARNES et al., 2018). Portanto, a alteração do número nucleolar não é um parâmetro tão interessante quanto a área nucleolar total para associação com a resposta ao estresse causado pelo tratamento.

Ainda, a expressão de Ki67 também aumentou após a administração aguda de TMZ. UXA et al. (2021) analisaram a resposta de Ki67 frente ao dano no DNA, onde a expressão de mRNA da proteína é diminuída com a indução de dano, e isso depende da ativação de p53. Em células de carcinoma colorretal humano, deficientes para p53, a expressão de mRNA do Ki67 não é diminuída com a indução de dano por doxorubicina (UXA et al., 2021). Considerando que a linhagem U251

tem mutação em p53, esse fato pode estar relacionado com o aumento da intensidade de Ki67 nas células tratadas. Uma vez que um dos efeitos do tratamento com TMZ é a parada do ciclo em G2 (LEE, 2016; SILVA et al., 2016; AASLAND et al., 2019), esse aumento pode ser em decorrência disso. Apesar de Miller et al. (2018) terem mostrado que o bloqueio em G2 das células resulta em um *plateau* do sinal de Ki67, esse resultado foi obtido considerando um período extremamente curto, em torno de 15 horas. Os dados analisados das células U251 vão até 144h, de forma que, possivelmente, o aumento da intensidade de fluorescência da marcação do Ki67 seja resultado de um acúmulo da síntese de Ki67 ao longo dos dias, onde sua síntese não foi inibida pela parada do ciclo e passou a acumular lentamente, uma vez que o pico da expressão de Ki67 ocorre durante a fase G2 (MILLER et al., 2018). A não-inibição da síntese de Ki67 pode ter a ver com um sequestro da proteína no nucléolo. Como o Ki67 localiza em regiões entre o DGF e o FC (KILL, 1996), onde ocorre o processamento dos rRNAs, e ele também colocaliza com regiões ligadas à transcrição (BULLWINKEL et al., 2006), o acúmulo de Ki67 visto apenas em células tratadas também pode corroborar para a hipótese de que ocorre aumento da síntese e/ou acúmulo de rRNA não processado após o estresse induzido por TMZ. Mais experimentos precisam ser feitos para confirmar qual hipótese é correta.

No caso das células não tratadas, houve uma pequena diminuição na expressão de Ki67 no sexto dia. Considerando que, no sexto dia, a confluência das células na condição não tratada era de 83,1%, há uma maior variabilidade de células em fases diferentes. Isso pode ser, portanto, artefato resultado de uma quantificação onde a maioria das células estaria em momentos anteriores ao pico de Ki67 em G2, como na fase S.

Após os primeiros dados indicarem que ocorre um aumento da área nuclear e nucleolar das células tratadas com TMZ, nós testamos a combinação de TMZ e um indutor de estresse nucleolar, a ActD. Com o intuito de perturbar a biogênese ribossomal e a síntese proteica, pudemos ver diferentes respostas entre a U251 e a A172, que tem um fenótipo selvagem para TP53 (LEE, 2016). Na linhagem A172, o tratamento combinado de TMZ e ActD reduziu imediatamente o tamanho nuclear médio das células após a adição de ActD no meio. Entre os grupos, esse foi o único

a mostrar uma redução da medida: as células que receberam apenas TMZ ou apenas ActD continuaram aumentando seu tamanho nuclear com o passar dos dias. Isso é esperado, considerando que o TMZ induz senescência de uma maneira dependente de p53, via quebra de fitas duplas (BELTZIG et al., 2022; ROOS et al., 2009; SILVA et al., 2016). Além disso, altas doses de ActD já foram reportadas como também sendo indutores de senescência (PETROVA et al., 2016), o que explica o porquê do grupo ActD ter apresentado um aumento da área, porém menos intenso do que foi visto no grupo TMZ, uma vez que foi usada uma concentração quase mil vezes menor que a usada na literatura para a indução de senescência com ActD. Todavia, uma vez que não foram feitos testes confirmatórios, não podemos confirmar que apenas o aumento da área nuclear indica um estado senescente.

No caso da U251, isso não ocorreu. As células dos grupos não tratado e ActD não aumentaram sua área nuclear em nenhum momento. E, nos grupos que receberam TMZ (TMZ e TMZ + ActD), houve um leve aumento na área que não se manteve, semelhante ao que já é reportado na literatura (LENZ et al., 2021): células da linhagem U251, tratadas com 50 μ M TMZ, também apresentam um aumento da área nuclear que espontaneamente diminui com o passar dos dias após o tratamento. Nesse mesmo trabalho, isso não ocorre com a linhagem A172. A diferença entre as duas linhagens é que, provavelmente, enquanto a A172 entra em um estado de senescência induzido pelo TMZ, as células U251, carregando uma mutação em TP53, não entram em senescência e morrem mais, reduzindo a área nuclear média populacional.

O tratamento com ActD aparenta, de alguma maneira, mobilizar a resposta da linhagem com genótipo selvagem, fazendo com que ela perca o fenótipo de aumento nuclear induzida pelo tratamento com TMZ, mas apenas exclusivamente após já ter sido estressada com o quimioterápico. Após a combinação de ambos, o tamanho nuclear médio da população é reduzido. Porém, não podemos confirmar se isso é uma resposta senolítica (ou seja, o tamanho nuclear médio da população reduziu porque as células senescentes morreram) ou se as células maiores começam a reduzir em tamanho (ou seja, ActD reverte o fenótipo de núcleo aumentado). Considerando uma situação em que a célula já teve seu p53

mobilizado pelo tratamento de TMZ e consequente indução da entrada em senescência, a administração de ActD impactaria na biogênese ribossomal. Dessa forma, as células não conseguiriam continuar aumentando seu tamanho, pela carência de síntese proteica, e, conseqüentemente, não chegariam ao fenótipo senescente completo. Se essa hipótese for confirmada, a combinação de TMZ e ActD pode ser uma opção como tratamento complementar de glioblastomas com fenótipo selvagem de p53, impedindo a formação de células senescentes.

De forma geral, os resultados obtidos nesse trabalho foram capazes de mostrar que o nucléolo de células de glioblastoma de alto grau que carregam mutação no gene TP53 respondem ao tratamento quimioterápico agudo com mudanças morfológicas observáveis. As células U251 não aparentaram ter indução de estresse nucleolar pelo TMZ, e, como o estresse nucleolar é mediado por p53, talvez esse comportamento não represente todas as linhagens de glioblastomas. Além disso, foi possível inferir que células que carregam mutação na proteína p53 são menos responsivas à indução de estresse nucleolar pelo tratamento de ActD. Por outro lado, a combinação de tratamento de TMZ com ActD inibiu a o desenvolvimento de um fenótipo de crescimento nuclear em células com o gene selvagem de p53, reforçando a participação da proteína na mobilização de estresse nucleolar.

PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos aqui, podemos concluir que, de alguma forma, o nucléolo participa ou é impactado pela resposta de estresse induzida pela quimioterapia com TMZ. Se isso for investigado mais além, pode nos dar uma perspectiva mais aprofundada da importância da resposta nucleolar para a sobrevivência no câncer.

Dentre as limitações do trabalho, inclui-se a utilização de um marcador não específico de nucléolo, como o Ki67. Mesmo que o Ki67 apresente localização nucleolar nas fases S/G2, acabamos perdendo informações a respeito do nucléolo em outras fases do ciclo e não temos como nos certificarmos da presença de ruptura nucleolar utilizando apenas a marcação do Ki67. Portanto, é necessário refazer os mesmos experimentos utilizando outros marcadores, como de fibrilarina ou nucleofosmina. Também, é necessário avaliar o comportamento do nucléolo após a combinação de TMZ com ActD.

Além disso, é necessário performar os experimentos de análise morfológica de nucléolos em uma linhagem que apresente fenótipo selvagem para p53, como é o caso da A172, a fim de investigar mais afundo se as respostas encontradas são, de fato, relacionadas ao estresse induzido por TMZ, e se elas são únicas em células mutadas para p53. Dessa forma, será possível confirmar se essas são respostas generalizadas de glioblastomas ou se são causadas por uma disfuncionalidade no p53, onde talvez possamos enxergar ruptura nucleolar e posterior fusão dos nucléolos (traço de células senescentes) na linhagem A172.

Ademais, é necessário confirmar se existe mesmo um acúmulo de rRNA não processado no nucléolo ou se o aumento da área nucleolar é em decorrência do aumento da taxa de biogênese ribossomal. Isso pode ser respondido fazendo RT-PCR e quantificando a razão dos pré-rRNAs 47s e dos rRNAs maduros 18S, 28S e 5S nas células não tratadas e tratadas com TMZ.

Também, fazendo *tracking* de células únicas podemos investigar se essas respostas estão relacionadas com um estado de seleção que leva à maior sobrevivência das células com nucléolos maiores, ou se todas as células

apresentam um aumento do nucléolo como resposta ao estresse, mesmo que elas acabem morrendo ou sobrevivendo, entrando em um estado de senescência ou não.

Por último, precisamos responder se a diminuição da área nuclear que ocorreu nas células A172 que receberam a combinação de tratamento de TMZ e ActD é uma resposta senolítica ou se a ActD reverte ou impede o desenvolvimento de um fenótipo de senescência completo. Isso também pode ser respondido fazendo o *tracking* de células únicas e com a marcação de células senescentes vivas, que pode ser feita usando o marcador C₁₂FDG (*5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside*), um substrato que, quando clivado pela β-galactosidase, emite fluorescência. Além disso, seria interessante explorar outras rodadas de tratamento com TMZ após o uso de ActD, para avaliar se as células que sobreviveram - que não continuaram aumentando em tamanho nuclear - se sensibilizariam e morreriam quando expostas novamente ao quimioterápico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASLAND, D. et al. Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR–Chk1, p21, and NF-kB. **Cancer Research**, v. 79, n. 1, p. 99–113, 1 jan. 2019.

ANTHONY H. V. SCHAPIRA. Neurology and Clinical Neuroscience. **Mosby Elsevier**, 2007.

AUBERT, M. et al. Pre-ribosomal RNA processing in human cells: From mechanisms to congenital diseases. **Biomolecules**, 1 dez. 2018.

BELTZIG, L. et al. Senescence Is the Main Trait Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells. **Cancers**, v. 14, n. 9, 1 maio 2022.

BLEEKER, F. E.; MOLENAAR, R. J.; LEENSTRA, S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, maio 2012.

BOISVERT, F. M.; LAMOND, A. I. p53-Dependent subcellular proteome localization following DNA damage. **Proteomics**, v. 10, n. 22, p. 4087–4097, nov. 2010.

BOULON, S. et al. The Nucleolus under Stress. **Molecular Cell**, out. 2010.

BULLWINKEL, J. et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 206, n. 3, p. 624–635, mar. 2006.

BURGER, K. et al. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 16, p. 12416–12425, 16 abr. 2010.

BUTLER, M. et al. MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma. **Trends in Cancer**. Cell Press, 1 maio 2020.

BYWATER, M. J. et al. Dysregulation of the basal RNA polymerase transcription apparatus in cancer. **Nature Reviews in Cancer**, maio 2013.

CAROTENUTO, P. et al. Therapeutic approaches targeting nucleolus in cancer. **Cells**, MDPI, 1 set. 2019.

CELA, I.; MATTEO, A. DI; FEDERICI, L. Nucleophosmin in its interaction with ligands. **International Journal of Molecular Sciences**, 2 jul. 2020.

CHOONG, M. L. et al. Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: A new route to p53 based cyclotherapy. **Cell Cycle**, v. 8, n. 17, p. 2810–2818, 1 set. 2009.

COMAI, L. The nucleolus: a paradigm for cell proliferation and aging. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 1473–1478, 1999.

CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308–312, 2016.

DAI-FENG LU et al. Actinomycin D inhibits cell proliferations and promotes apoptosis in osteosarcoma cells. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 08, n. 02, p. 1904–1911, 2015.

DE AZAMBUJA, E. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: A meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504–1513, 21 maio 2007.

DIESCH, J.; HANNAN, R. D.; SANIJ, E. Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. **Cell and Bioscience**. BioMed Central Ltd., 27 jul. 2014.

FARLEY, K. I. et al. Determinants of mammalian nucleolar architecture. **Chromosoma**. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 26 set. 2015.

FARLEY-BARNES, K. I. et al. Diverse Regulators of Human Ribosome Biogenesis Discovered by Changes in Nucleolar Number. **Cell Reports**, v. 22, n. 7, p. 1923–1934, 13 fev. 2018.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis, and nuclear irregularities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 8 ago. 2012.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099–1113, 2015.

GRUMMT, I. Life on a planet of its own: Regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. **Genes and Development**, 15 jul. 2003.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**. American Association for Cancer Research Inc., 1 jan. 2022.

HEIN, N. et al. The nucleolus: An emerging target for cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, nov. 2013.

HENRAS, A. K. et al. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 1 mar. 2015.

HERNANDEZ-VERDUN, D. Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. **Nucleus**, v. 2, n. 3, p. 189–194, 2011.

HUANG, J. et al. Isocitrate dehydrogenase mutations in glioma: From basic discovery to therapeutics development. **Frontiers in Oncology**, v. 9, jun, 2019.

INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. 2019.

JAMES, A. et al. Nucleolar stress with and without p53. *Nucleus*. **Landes Bioscience**, 5 ago. 2014.

KILL, I. R. Localization of the Ki-67 antigen within the nucleolus. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 1253–1263, 1996.

KOH, S. B. et al. A quantitative FastFUCCl assay defines cell cycle dynamics at a single-cell level. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 2, p. 512–520, 2017.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes and Diseases**, 1 set. 2016.

LELLIS BADKE, G. et al. Glioblastoma multiforme em idosos: uma revisão sobre seu tratamento com ênfase na abordagem cirúrgica. **Arq Bras Neurocir**. 2014.

LENZ, L. S. FACCIONI, J. L. BRACCO, P. A. SANTOS, J. A. F. et al. Cancer cell fitness is dynamic. **Cancer Research**, v. 81, n. 4, p. 1040–1051, 15 fev. 2021.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, ago. 2007.

MILLER, I. et al. Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. **Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 1105- 1112.e5, 31 jul. 2018.

MONTANARO, L.; TRERÉ, D.; DERENZINI, M. Nucleolus, ribosomes, and cancer. **American Journal of Pathology**. American Society for Investigative Pathology Inc., 2008.

OGAWA, L. M. et al. Increased numbers of nucleoli in a genome-wide RNAi screen reveal proteins that link the cell cycle to RNA polymerase I transcription. **Molecular Biology of the Cell**, v. 32, n. 9, p. 956–973, 2021.

ORSOLIC, I. et al. The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms. **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 1 jun. 2016.

OSUKA, S.; VAN MEIR, E. G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: The way forward. **Journal of Clinical Investigation**. American Society for Clinical Investigation, 1 fev. 2017.

P. RUBBI, C.; MILNER, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. **The EMBO Journal**, 2003.

PEDERSON, T. The nucleolus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p. 1–15, 2011.

PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. **Handbook of Clinical Neurology**. Elsevier, 2016. v. 134p. 71–95.

PETROVA, N. V. et al. Small molecule compounds that induce cellular senescence. **Aging Cell**. Blackwell Publishing Ltd., 1 dez. 2016.

QUIN, J. E. et al. Targeting the nucleolus for cancer intervention. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**. Elsevier, 2014.

RAHMANZADEH, R. et al. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. **Cell Prolif.** 2007.

RODRIGUEZ-CORONA, U. et al. Fibrillarin from Archaea to human. **Biology of the Cell.** Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 1 jun. 2015.

ROOS, W. P. et al. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O6-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. **DNA Repair**, v. 8, n. 1, p. 72–86, 1 jan. 2009.

RUBBI, C. P.; MILNER, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. **EMBO Journal**, v. 22, n. 22, p. 6068–6077, 17 nov. 2003.

RUSSO, A.; RUSSO, G. Ribosomal proteins control or bypass p53 during nucleolar stress. **International Journal of Molecular Sciences.** MDPI AG, 12 jan. 2017.

SILVA, A. O. 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**, v. 348, n. 2, p. 177–183, 1 nov. 2016.

SINGH, N. et al. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. **Cancer Drug Resistance.** OAE Publishing Inc., 2021.

STĘPIŃSKI, D. The nucleolus, an ally, and an enemy of cancer cells. **Histochemistry and Cell Biology.** Springer Verlag, 1 dez. 2018.

STIMPSON, K. M. et al. Nucleolar Organization, ribosomal DNA array stability, and acrocentric chromosome integrity are linked to telomere function. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 24 mar. 2014.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **The new england journal of medicine**, 2005.

STUPP, R. et al. High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 25, p. 93–101, 1 set. 2014.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma**. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 jun. 2018.

SZAFLARSKI, W. et al. Early rRNA processing is a stress-dependent regulatory event whose inhibition maintains nucleolar integrity. **Nucleic acids research**, v. 50, n. 2, p. 1033–1051, 25 jan. 2022.

URBANSKA, K. et al. Glioblastoma multiforme - An overview. **Wspolczesna Onkologia**. Termedia Publishing House Ltd., 2014.

UXA, S., et al. Ki-67 gene expression. **Cell Death & Differentiation**, v. 28, n. 12, 28 jun. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer**, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Cancer Report: Cancer research for cancer development. **International Agency for Research on Cancer**, 2020.

YAN, Q. et al. The functions of non-coding RNAs in rRNA regulation. **Frontiers in Genetics**. Frontiers Media S.A., 2019.

YANG, K. et al. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin. **Nature Communications**, v. 7, 25 nov. 2016.

YANG, K.; YANG, J.; YI, J. Nucleolar stress: Hallmarks, sensing mechanism and diseases. **Cell Stress**. Shared Science Publishers OG, 1 jun. 2018.

YANG, L. et al. Nucleolar repression facilitates initiation and maintenance of senescence. **Cell Cycle**, v. 14, n. 22, p. 3613–3623, 2015.

ZEMP, I.; KUTAY, U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. **FEBS Letters**, 19 jun. 2007.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**. 2012.

CURRICULUM VITAE

TÓRGO, D.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Daphne Tórgo de Lemos

Local e data de nascimento: Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,
13/04/1999

Endereço profissional: Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica,
prédio 43431, sala 115 - Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Agronomia,
Porto Alegre, 91501-970, Brasil

Telefone: (51) 996597529

E-mail: daphtorgo@gmail.com

2. FORMAÇÃO

2021-2022: Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2016-2021: Bacharelado em Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3. ESTÁGIOS

2021-2021: Estágio curricular em Patologia Clínica no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Materno Infantil Presidente Vargas. Supervisora: Dra. Carolina Didonet Pederzoli. Atividades desenvolvidas: coleta sanguínea venosa de pacientes adultos, urocultura, bioquimismo, antibiogramas, cultura de leite materno, cultura de secreções, hemocultura, controle de qualidade, teste de sangue oculto nas fezes, hemogramas, testes de coagulação, realização das lâminas hematológicas e de líquido, testes bioquímicos do soro, análise de sedimentos urinários, EQUs, testes imunológicos de reatividade para doenças infecciosas e análise quantitativa de hormônios, vitaminas e marcadores.

2017-2021: Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientação: Dr. Guido Lenz. Atividades desenvolvidas: cultura celular, subclonagens moleculares, clonagens de vetores plasmidiais, transfecções, transduções lentivirais, transdução com transposon, citometria, ensaio clonogênico, tracking de células únicas, análise de imagem, CRISPR.

4. EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

2022-2022: Participação no projeto ProEdu de aprendizagem híbrida de Ciências na Escola Comunitária de Educação Básica Aldeia Lumiar de Porto Alegre, com o tema Vacinas

2022-2022: Docência orientada na disciplina Biofísica Biomédica II para o curso de Biomedicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2022-2022: Docência orientada na disciplina eletiva Biologia Celular e Molecular do Câncer para o curso de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

LENZ, L. S. FACCIONI, J. L. BRACCO, P. A. SANTOS, J. A. F. et al. Cancer Cell Fitness Is Dynamic. Cancer Research 81: p. 1040-1051 (2021).