

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

LOUISE CAMARGO DE MENDONÇA

**ANÁLISE CELULAR E DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* À TEMOZOLOMIDA,
PCV E PACLITAXEL EM CULTURAS PRIMÁRIAS DERIVADAS DE GLIOMAS**

Porto Alegre

2015

LOUISE CAMARGO DE MENDONÇA

**ANÁLISE CELULAR E DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* À TEMOZOLOMIDA,
PCV E PACLITAXEL EM CULTURAS PRIMÁRIAS DERIVADAS DE GLIOMAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz
Co-orientadora: Msc. Franciele Kipper

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho àqueles que me apoiaram durante todos os anos de graduação. Sempre compreendendo os momentos em que foi necessário estar ausente e sempre me dando força e suporte para que o meu objetivo fosse alcançado. Obrigada família.

Agradeço ao professor Guido Lenz pela oportunidade e confiança durante o desenvolvimento desse trabalho. A todos integrantes do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular pelo auxílio e disponibilidade em todos os momentos de dúvidas e necessidades e principalmente pelas produtivas discussões científicas que muito contribuíram para minha formação. Agradeço em especial à Franciele Kipper por compartilhar comigo seus conhecimentos, pelo estímulo a me fazer formar uma opinião científica crítica e por tornar possível a realização desse trabalho.

Agradeço aos professores e a todos que contribuíram para minha formação científica desde o início do curso, em especial à Larissa Penna por ter me ensinado a dar os primeiros passos na pesquisa acadêmica e pelo enorme carinho construído.

Agradeço aos meus colegas e amigos por compartilharem comigo todos os momentos da graduação e os sentimentos de angústia à euforia. Obrigada pelo companheirismo, pelos conselhos, pelos abraços e pela grande e valiosa amizade construída durante essa jornada.

Obrigada, vocês foram essenciais.

SUMÁRIO

RESUMO	4
I. INTRODUÇÃO	6
I.1 Gliomas	6
Características Gerais e Epidemiologia	6
O tratamento de glioblastoma	7
I.2 Apoptose, senescência e autofagia no tratamento de câncer	10
I.3 Terapia personalizada em gliomas	13
II. OBJETIVOS	15
III. ARTIGO CIENTÍFICO	16
Introdução	18
Materiais e Métodos	21
Cultura celular	21
Análise de sensibilidade <i>in vitro</i>	22
Laranja de Acridina	22
Análise Morfométrica Nuclear	23
Resultados	24
Sensibilidade celular <i>in vitro</i>	24
Análises Celulares	25
Análise de Organelas Vesiculares Ácidas	29
Discussão	31
Conclusão	34
Referências	35
Figuras Suplementares	39
IV. PERSPECTIVAS	41
V. REFERÊNCIAS GERAIS	42
VI. ANEXOS	46

RESUMO

O principal desafio na maioria dos cânceres é a grande variabilidade no resultado dos tratamentos entre pacientes com o mesmo tipo tumoral que pode ser causada por diferenças nas respostas celulares. A variação da efetividade às terapias pode estar relacionada à indução ou à resistência de mecanismos como senescência, autofagia e apoptose. Dentro dessa perspectiva está o glioblastoma, tumor do sistema nervoso central mais comum e agressivo em adultos, que tem uma alta taxa de mortalidade devido à elevada capacidade de invasão e resistência aos tratamentos. O objetivo deste trabalho consiste na predição da resposta a diferentes tratamentos *in vivo* baseado na análise das características celulares em culturas primárias advindas de biopsias de pacientes. As culturas primárias analisadas não apresentaram resposta citotóxica ao tratamento com temozolomida, fármaco comumente utilizado na clínica, enquanto que a administração de PCV e paclitaxel foi capaz de diminuir o número de células *in vitro*. A resposta celular ao tratamento com PCV, contudo, foi diferente para os pacientes ao se analisar aspectos como indução de autofagia e apoptose após esse tratamento *in vitro*. Uma das culturas apresentou maior proporção de células com características morfológicas de apoptose, enquanto a outra apresentou menor proporção. Esse resultado pode ser comparado aos diferentes níveis de organelas vesiculares ácidas induzidas pelo tratamento, em que a cultura que apresentou menor proporção de células morfológicamente apoptóticas apresentou um aumento do número de organelas vesiculares ácidas. Esses resultados apontam que o conhecimento de mecanismos envolvidos na resistência celular, como a indução de autofagia, poderia ter valor preditivo tão bom quanto o

conhecimento de marcadores moleculares. Assim sendo, o estudo de sensibilidade/resistência a fármacos em culturas primárias e a identificação de características celulares e/ou farmacológicas são boas alternativas para aumentar a eficácia da terapia de pacientes com gliomas.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Gliomas

Características Gerais e Epidemiologia

Gliomas são os tumores mais comuns do sistema nervoso central e com maior taxa de mortalidade. Caracterizam-se por alta invasibilidade, proliferação e resistência à terapia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os gliomas em quatro graus diferentes de acordo com sua agressividade. Entre adultos, mais de 50% dos casos são constituídos de gliomas de alto grau, também denominados como gliomas malignos. Fazem parte deste grupo os glioblastomas multiformes (grau IV), os astrocitomas anaplásicos (grau III) e os oligodendrogliomas anaplásicos (grau III). Os gliomas de baixo grau (grau I e grau II), por sua vez, são mais comuns em indivíduos mais jovens, têm melhor evolução, porém, tendem a sofrer transformação para um glioma de alto grau (LOUIS et al., 2007).

A classificação dada pela OMS é um importante componente nos critérios utilizados para prever a resposta à terapia e a evolução do tumor. Esses critérios ainda incluem idade do paciente, localização do tumor, características radiológicas, medidas de ressecção cirúrgica, proliferação celular e alterações genéticas. A combinação destes parâmetros contribui para uma estimativa global do prognóstico do paciente (LOUIS et al., 2007; MAHALEY et al., 1989).

Glioblastoma (GBM) representa 29% das ocorrências de câncer no sistema nervoso central em jovens entre 15 e 39 anos nos Estados Unidos e cerca de 50% dos tumores malignos. A incidência aumenta com a idade, as taxas mais elevadas são de 75 a 84 anos e é 1,6 vezes mais comum no sexo masculino (AVGEROPOULOS, 2006; KANZAWA et al., 2004; QUINN T. OSTROM, 2014). O GBM tem sobrevida média em torno de 14 meses mesmo quando o paciente é submetido à cirurgia combinada à radioterapia e à quimioterapia (STUPP et al., 2009). Embora a sobrevida desses pacientes não tenha alterado significativamente nas últimas décadas, o surgimento de novas estratégias para o tratamento desse tumor tem impulsionado pesquisas nessa área e contribuído para a melhor compreensão dos mecanismos de desenvolvimento, crescimento e resistência à terapia dos cânceres do sistema nervoso central (AVGEROPOULOS, 2006; LOUIS et al., 2007).

O tratamento de glioblastoma

A temozolomida (TMZ) foi estabelecida como quimioterapia de primeira linha para pacientes com GBM desde 2005. Sua atividade anticâncer foi descrita em 1987 como um agente alquilante que reage com o DNA (BLEEHEN et al., 1995; HIRST et al., 2013). Esse fármaco forma produtos de ação citotóxica que promovem a ruptura do DNA e subsequente morte celular por interferência em ciclos sucessivos de replicação. (JOHANNESSEN; BJERKVIG; TYSNES, 2008). Temozolomida é usada no início do tratamento de GBM na dose diária de 75 mg por área de superfície corporal (75 mg/m^2) em associação com radioterapia. Essa combinação é administrada durante seis semanas seguida por seis ciclos de TMZ

sozinha na dose de 150-200 mg/m² por cinco dias consecutivos a cada 28 dias (MESSAOUDI; CLAVREUL; LAGARCE, 2015). Com esta combinação (TMZ mais radioterapia), a sobrevida média alcançou 14,6 meses, em comparação com 12 meses para os pacientes tratados com radioterapia sozinha (STUPP et al., 2009). No entanto, tornou-se evidente que os tumores apresentam um grande grau de variabilidade na sensibilidade a esse tratamento. Isso pode ser reflexo tanto do grau de diferenciação do tumor como da resistência a TMZ através de uma variedade de mecanismos, tais como os altos níveis de atividade de MGMT (*O⁶-methylguanine DNA methyl-transferase*) nas células tumorais, o que reduz o efeito deste agente de alquilação e conduz a um fenótipo resistente. (ZHANG et al., 2010).

O regime terapêutico com PCV é uma combinação de procarbazina - um agente de alquilação com boa penetração na barreira hematoencefálica; CCNU, também conhecido como lomustina - um agente alquilante oral da família nitrosoureia semelhante à carmustina; e vincristina – um inibidor de microtúbulos administrado por via intravenosa, que não só interrompe a mitose, mas também atenua a migração celular, no entanto, tem baixa capacidade de penetração na barreira hematoencefálica (AJAZ et al., 2014). O uso de PCV foi estabelecido em 1970, e continua a ser um componente importante na prática e em ensaios clínicos. Apesar de PCV ser tradicionalmente usado quando há primeira recidiva de GBM, a maioria dos casos consiste no uso de TMZ, pelo menos em pacientes que antes responderam a esse fármaco (FRANCESCHI et al., 2005). Contudo, pacientes com recorrência de GBM que são tratados com TMZ têm uma sobrevida média de apenas 3 a 6 meses (YUNG et al., 2000; YUST-KATZ, 2012).

Com isso, muitos clínicos começaram a investigar recentemente a eficácia de agentes quimioterapêuticos de segunda linha, tais como PCV, para o tratamento da recorrência de GBM.

Durante a última década houve uma grande expansão na investigação e aprovação de novos fármacos para tratamento de tumores. Vários agentes foram direcionados para o tratamento de GBM em ensaios clínicos de fase inicial, mas com sucesso ainda limitado (AJAZ et al., 2014). O paclitaxel (PTX) é uma droga antitumoral clinicamente eficaz com atividade importante em câncer de mama e de ovário (BURKHART et al., 1994). Paclitaxel atua como uma droga antimetabólica que causa morte celular predominantemente por apoptose. O principal alvo celular é o sistema de microtúbulos que desempenha um papel chave na mitose, transporte intracelular, motilidade, e manutenção da forma celular (MANFRED; PARNES; HORWITZ, 1982). Embora já se compreenda como os mecanismos antimetabólicos provocam a parada da mitose, ainda não se sabe muito como as células respondem a essa parada no ciclo celular (GASCOIGNE; TAYLOR, 2009). Apesar disso, vários relatos clínicos tem descrito o uso de PTX em adultos com glioma recorrente (CHANG et al., 2001). Todavia, o seu uso em tumores cerebrais é ainda limitado devido à baixa capacidade de penetração na barreira hematoencefálica, embora a sua eficácia *in vitro* em GBM e em modelos animais de glioma já seja comprovada (ANNOVAZZI et al., 2015; BRANHAM et al., 2004; CHANG et al., 2001). Com isso, PTX vem surgindo com um potencial agente terapêutico no tratamento de GBM.

I.2 Apoptose, senescência e autofagia no tratamento de câncer

A apoptose é a forma mais importante de morte celular em resposta a terapias e sua via de sinalização molecular já é bem conhecida. A ativação desse processo pode ser determinante no desfecho dos tratamentos antitumorais. As alterações morfológicas típicas de células apoptóticas incluem a condensação e fragmentação nuclear, encolhimento celular, desestruturação da membrana celular, perda de adesão a matriz extracelular e a células vizinhas. A adequada sinalização apoptótica é importante para a manutenção de um equilíbrio estável entre a sobrevivência e a morte celular. Uma das características das células tumorais é perda deste equilíbrio e a evasão aos mecanismos de apoptose (GOLDAR; KHANIANI; DERAKHSHAN, 2015; LENZ, 2012; PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR, 2011). Ao longo da última década, houve avanços significativos na descoberta e validação de vários novos agentes terapêuticos para o câncer. No entanto, a resistência à terapia inevitavelmente conduz a um tratamento ineficiente, e os principais fatores que contribuem para a resistência à quimioterapia são os reguladores de apoptose (FULDA, 2009, 2010; PLATI; KHOSRAVI-FAR, 2008). Avanços nesses conhecimentos têm proporcionado novos alvos para drogas como as estratégias terapêuticas indutoras de apoptose que podem ser usadas em combinação com outros agentes terapêuticos e potencializar a resposta ao tratamento.

Células tumorais são conhecidas por terem capacidade infinita de proliferação, enquanto isso, células normais têm parada na divisão celular e

mudanças das características morfológicas e moleculares que são características da quiescência - quando as células estão paradas, mas ainda podem continuar o ciclo de divisão - ou senescência, quando esta parada é irreversível (CAMPISI, 2001; SERRANO, 1997). As bases moleculares da senescência têm sido intensamente estudadas e sugere-se a combinação de diversos fatores, entre eles o encurtamento dos telômeros devido a um grande número de divisões celulares e o acúmulo de danos no DNA (COLLADO; SERRANO, 2010; COLLADO, 2007). A progressão do tumor envolve a inibição dos mediadores de senescência, mas isso não significa que as células tumorais tenham perdido a capacidade de se tornarem senescentes. Estas células podem entrar neste estado em resposta a danos causados por mudanças no ambiente celular que podem ser causados por fármacos. Uma variedade de agentes antitumorais é capaz de induzir senescência com efeito dose dependente, e é detectável até mesmo nas menores concentrações que tiveram um efeito inibitório no crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2000; RONINSON, 2003).

É relatado que o tratamento antitumoral (tal como radioterapia, quimioterapia e terapia molecular), além de senescência, também pode induzir a autofagia em células cancerosas. Como um mecanismo de autoproteólise, a autofagia é ativada quando há um meio celular adverso e contribui para a quebra de componentes intracelulares dentro dos lisossomos para fornecer uma fonte alternativa de energia e, assim, sustentar a sobrevivência da célula (LEVINE; KLIONSKY, 2004; MIZUSHIMA et al., 2008). Esse mecanismo é capaz de dificultar a ação dos quimioterápicos utilizados no tratamento de tumores. Essa característica sugere a capacidade da autofagia para: (1) melhorar a resistência

das células cancerosas a condições endógenas que normalmente provocam a morte celular, tais como hipóxia e privação de nutrientes; (2) tornar as células transformadas menos sensíveis à morte celular induzida por terapia; (3) mantém a sobrevivência de células cancerosas que entram num estado de senescência, em resposta à terapia; e (4) assegurar a manutenção das células tronco tumorais (GALLUZZI et al., 2015).

A autofagia pode promover a adaptação e sobrevivência celular, contudo em algumas condições também pode levar à morte celular. Quando os tratamentos danificam organelas nas células cancerosas, a autofagia pode inicialmente ser desencadeada para proteger as células sequestrando e degradando as organelas danificadas. No entanto, uma vez que certo nível de dano intracelular é atingido, a autofagia pode servir para remover as células danificadas e iniciar a morte celular (CUERVO, 2004). A morte celular mais comumente associada é a apoptose, mas pode também ocorrer por meio de outros mecanismos. A autofagia é um processo com várias etapas, a inibição em diferentes estágios pode gerar diferentes respostas citotóxicas (LI et al., 2015). Apesar disso, a inibição da autofagia pode sensibilizar as células a essas terapias, indicando uma estratégia para melhorar a eficácia do tratamento de câncer (AJABNOOR; CROOK; COLEY, 2012; KONDO et al., 2005).

I.3 Terapia personalizada em gliomas

Gliomas, como outros cânceres, apresentam uma vasta variabilidade genética inter e intratumoral. Resultados recentes de sequenciamento de tumores mostram que cada novo tumor é um tumor geneticamente diferente e constituído de vários subclones (BACA et al., 2014). Estas diferenças genéticas produzem fenótipos celulares e de resistência a terapias variados. Ainda dentro deste contexto, um projeto do *The Cancer Genome Atlas* identificou e classificou os gliomas em quatro subtipos que apresentam distinta expressão/mutação/deleção de genes e correlacionou esses subtipos à sensibilidade diferente à quimioterapia (VERHAAK et al., 2010). No Brasil, o diagnóstico a nível molecular de gliomas é praticamente inexistente e não é coberto pelo Sistema Único de Saúde, o que causa onerosas despesas ao paciente e ao sistema de saúde, que por desconhecer características específicas do tumor, muitas vezes acaba fornecendo um medicamento menos eficaz. Na literatura há dados de ensaios crônicos mostrando que a correlação entre testes preditivos *in vitro-in vivo* têm uma porcentagem de 69 de verdadeiros positivos e de mais de 90 de verdadeiros negativos (HOFF, 1989). Ou seja, através de testes de sensibilidade *in vitro* um oncologista pode ser capaz de predizer com mais de 90% de certeza quando o tumor do paciente será resistente a certo tratamento. Outro estudo utilizando ensaio de resposta à droga em histocultura de gliomas revelou que pacientes tratados com dois ou mais quimioterápicos que demonstraram inibição do crescimento *in vitro* tiveram boa resposta *in vivo*; quando a inibição *in vitro* do crescimento era maior que 80% houve uma correlação de predição de sensibilidade de 100% (GWAK et al., 2011).

Assim sendo, uma alternativa para aumentar a eficácia das terapias é o estudo de sensibilidade/resistência *in vitro* a fármacos em culturas primárias advindas de biopsias de pacientes. Estudos sugerem que a regulação de moléculas alvos do ciclo celular, autofagia, apoptose e senescência em cânceres pode ser uma estratégia eficaz para a conduta de tumores (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007; COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997). Contudo, até o presente momento, os testes de predição *in vitro* são realizados com tratamentos em altas concentrações e analisando-se aspectos únicos como: viabilidade celular e número de células proliferativas (GWAK et al., 2011; LEE et al., 2012). Esse tipo de análise não leva em consideração as características celulares que podem driblar a real efetividade desses tratamentos. Uma delas, por exemplo, é a autofagia, processo que pode promover a adaptação e sobrevivência celular. Com isso, avaliar outros aspectos de resposta aos tratamentos, como características celulares, tem implicações importantes para abordagens terapêuticas.

II. OBJETIVOS

Geral:

- Correlacionar dados de sensibilidade/resistência a TMZ, PCV e PTX com dados celulares de culturas primárias de gliomas.

Específicos:

- Avaliar dados de sensibilidade/resistência in vitro à TMZ, PCV e PTX nas culturas primárias de amostras derivadas de gliomas dos pacientes;
- Avaliar comportamentos e características celulares que incluem análise de autofagia, senescência, e apoptose após o tratamento para cada paciente;
- Encontrar características celulares que possam estar correlacionadas com diferentes respostas de sensibilidade/resistência ao mesmo quimioterápico em diferentes pacientes.

III. ARTIGO CIENTÍFICO

Carta de submissão no formato exigido pelo periódico “*PlosOne*” (<http://www.plosone.org>)

Louise C. de Mendonça¹, Franciele C. Kipper², Guido Lenz³

1. cdmlouise@gmail.com
2. franciele.kipper@yahoo.com.br
3. gulenz@gmail.com

Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (www.ufrgs.br/labsinal),
Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Análise celular e de sensibilidade *in vitro* à temozolomida, PCV e paclitaxel em culturas primárias derivadas de gliomas

Louise C. de Mendonça^{1,2}, Franciele C. Kipper^{1,2}, Guido Lenz^{1,2}

1. Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (www.ufrgs.br/labsinal),
Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2. Endereço para correspondência: Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Departamento de Biofísica, Av. Bento Gonçalves 9500. CEP 91501-970, Porto
Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 51 3308 7620

Introdução

Gliomas são os tumores mais comuns do sistema nervoso central e com maior taxa de mortalidade. Caracterizam-se por alta invasibilidade, proliferação e resistência à terapia. Embora houvesse uma tentativa de desenvolver quimioterápicos mais efetivos para este tumor, a introdução da temozolomida e da carmustina apresentaram uma adição na sobrevida média de apenas 2 meses. Os gliomas são classificados pela Organização Mundial da Saúde em quatro graus diferentes de acordo com sua agressividade, sendo que o grau IV é o mais agressivo deles. Neste grupo está incluído o glioblastoma (GBM), que tem sobrevida média em torno de 14 meses quando o paciente é submetido à cirurgia combinada à radioterapia e à quimioterapia [1].

A temozolomida (TMZ) é a quimioterapia de primeira linha para pacientes com glioblastoma estabelecida desde 2005. Teve sua ação anticâncer descrita em 1987 como sendo um agente alquilante capaz de reagir com o DNA em ciclos sucessivos de replicação [2], [3]. Atualmente há evidências de que este tratamento não proporciona aumento na taxa de sobrevida maior do que 6 meses em pacientes que apresentam recidiva do tumor [4], [5]. A baixa efetividade deste tratamento em algumas situações tornou evidente a importância de testes de predição *in vitro* de tratamentos para melhorar a escolha da terapia para cada tipo de paciente.

Muitos clínicos começaram a investigar recentemente a eficácia de agentes quimioterapêuticos de segunda linha, tais como PCV, para o tratamento

da recorrência de GBM [6]–[9]. PCV é a combinação dos fármacos procarbazina (PCZ), lomustina (CCNU) e vincristina (VC) estabelecida na prática clínica desde 1970. Consiste em dois agentes de alquilação, sendo o segundo da família da nitrosoureia semelhante à carmustina, e um inibidor de microtúbulos, respectivamente [8]. Além disso, o direcionamento para o tratamento de gliomas de fármacos que são efetivos para outros tipos de cânceres também vem tornando-se uma estratégia no tratamento desta doença. Um exemplo disso é o agente terapêutico paclitaxel (PTX), que é utilizado em câncer de mama e de ovário [10]. O principal alvo celular de PTX é o sistema de microtúbulos que desempenha um papel chave na mitose, transporte intracelular, motilidade, e manutenção da forma celular [11]. Sua eficácia *in vitro* e em modelos animais de gliomas já é comprovada e por isso PTX vem surgindo recentemente como uma nova opção para o tratamento de pacientes com GBM [12]–[14].

Os efeitos dos tratamentos de cânceres incluem a indução de apoptose, senescência e autofagia pelo acúmulo de danos no DNA. A apoptose é o tipo de morte celular mais importante no tratamento de cânceres e muito relacionada ao processo de autofagia. Um dos principais fatores que contribuem para a resistência à quimioterapia são os inibidores da morte apoptótica nas células tumorais [15]–[17]. A parada na divisão celular e mudanças das características morfológicas e moleculares são características do processo de senescência [18], [19]. Diversos fármacos são capazes de induzir este estado por causarem mudanças no ambiente celular e acúmulo de danos no DNA. [20], [21]. Já a autofagia consiste num mecanismo de autoproteólise como uma fonte alternativa de energia para sustentar a sobrevivência da célula [22], [23]. Esse mecanismo é

capaz de dificultar a ação dos quimioterápicos utilizados no tratamento de tumores por tornar as células tumorais menos sensíveis à morte celular induzida por terapia.

A resistência à morte celular através desses mecanismos constitui-se no maior desafio no tratamento dessa doença. Além disso, outra dificuldade está nas diferentes respostas celulares dependendo de características específicas do tumor de cada paciente. O objetivo deste trabalho consiste na predição *in vitro* de características celulares em resposta a diferentes tratamentos em culturas primárias advindas de biopsias de pacientes com gliomas. Isso permite compreender como o tratamento pode agir em tumores diferentes e possibilita ao oncologista obter estratégias de potencializar o tratamento levando-se em consideração as diferentes respostas entre os pacientes.

Materiais e Métodos

Cultura celular:

As amostras celulares são provenientes de pacientes submetidos à cirurgia de retirada do tumor no Hospital São Lucas da PUC. Os pacientes concordaram em participar do estudo por meio da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**). As culturas celulares foram mantidas em meio F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino e em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

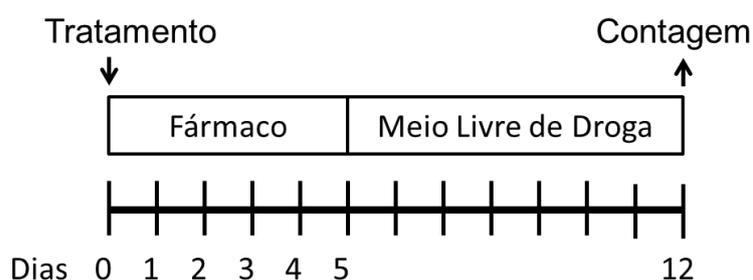
Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas culturas primárias: LS12 e LS16. A nomenclatura advém do nome do laboratório seguido da ordem de coleta do paciente. As informações adicionais sobre os pacientes seguem na tabela a seguir.

	Sexo	Idade	Histologia	Agente Quimioterápico
LS12	F	45	Glioblastoma (grau quatro)	Temodal 120 mg
LS16	M	26	Astrocitoma fibrilar (grau dois)	Sem quimioterapia adjuvante

Aprovação do comitê de ética: UFRGS: 420.856; PUCRS: 429.849.

Análise de sensibilidade *in vitro*:

As células foram plaqueadas e tratadas com os fármacos em concentrações próximas à plasmática (TMZ 30 μM , PCV – procarbazina 0,38 μM + lomustina 3,85 μM + vincristina 54 nM - e PTX 0,1 μM). Os fármacos foram mantidos por 5 dias no meio de cultura (mimetizando o tempo de tratamento de TMZ na clínica). Após esse período as células foram mantidas em meio livre de droga por 7 dias, conforme ilustrado na figura a seguir, e então o número remanescente foi contado por citometria de fluxo (*Guava Technologies*, Hayward, CA, USA). Consideramos as culturas celulares sensíveis ao tratamento quando o número de células remanescentes foi menor ou igual a 50%.



Laranja de Acridina:

O corante fluorescente laranja de acridina (AO) marca toda a célula com fluorescência verde, exceto compartimentos ácidos como os autofagolissomos, onde fluoresce em vermelho, sendo por isso utilizada para análise da eficiência do processo autofágico. As células foram plaqueadas e tratadas com os fármacos nas mesmas concentrações citadas anteriormente. Após 3, 5 e 7 dias de tratamento, foram tripsinizadas e incubadas com AO 2,0 μM por 15 min à temperatura ambiente. A proporção de marcação verde/vermelho foi avaliada em

citômetro de fluxo (*Guava Technologies*, Hayward, CA, USA). Foi considerada uma autofagia basal de 4% no controle e os demais tratamentos foram setados a partir desta.

Análise Morfométrica Nuclear:

A análise morfométrica nuclear (NMA) é uma ferramenta desenvolvida por *Filippi-Chiela et al* que é capaz de indicar a proporção de células em senescência, apoptose ou com irregularidades nucleares em uma população de células *in vitro* com base na morfologia nuclear (**Anexo 2**) [24]. Para isso as células foram plaqueadas e tratadas por 3, 5 e 7 dias com os fármacos nas concentrações anteriormente citadas. Nos dias de análise as células foram fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS e os núcleos foram corados com DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) 300 nM por 20 minutos a temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas por microscopia de fluorescência e o tamanho/índice de irregularidade nuclear foi analisado através do programa *Image Pro Plus 6.0* (IPP6 - *Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA*). Os resultados de senescência, apoptose e irregularidades nucleares foram obtidos analisando-se os parâmetros nucleares da ferramenta conforme planilha disponível no site <http://www.ufrgs.br/labsinal/NMA/>.

Resultados

Sensibilidade celular *in vitro*:

A sensibilidade das culturas primárias LS12 e LS16 aos quimioterápicos TMZ, PCZ, CCNU, VC, PCV e PTX pode ser observada na **Figura 1**. As culturas analisadas não foram sensíveis ao tratamento com TMZ, fármaco mais utilizado na clínica. Enquanto que a combinação dos fármacos PCZ, CCNU e VC (PCV) obteve sensibilidade de aproximadamente 50% para ambas as culturas, sendo que o tratamento *in vitro* com os componentes isolados não mostra efeito tão importante. O fármaco que se revelou mais efetivo no tratamento das culturas LS12 e LS16 foi PTX, aproximadamente 90% das células foram sensíveis. Esses resultados justificam a escolha de PCV e PTX para as análises posteriores.

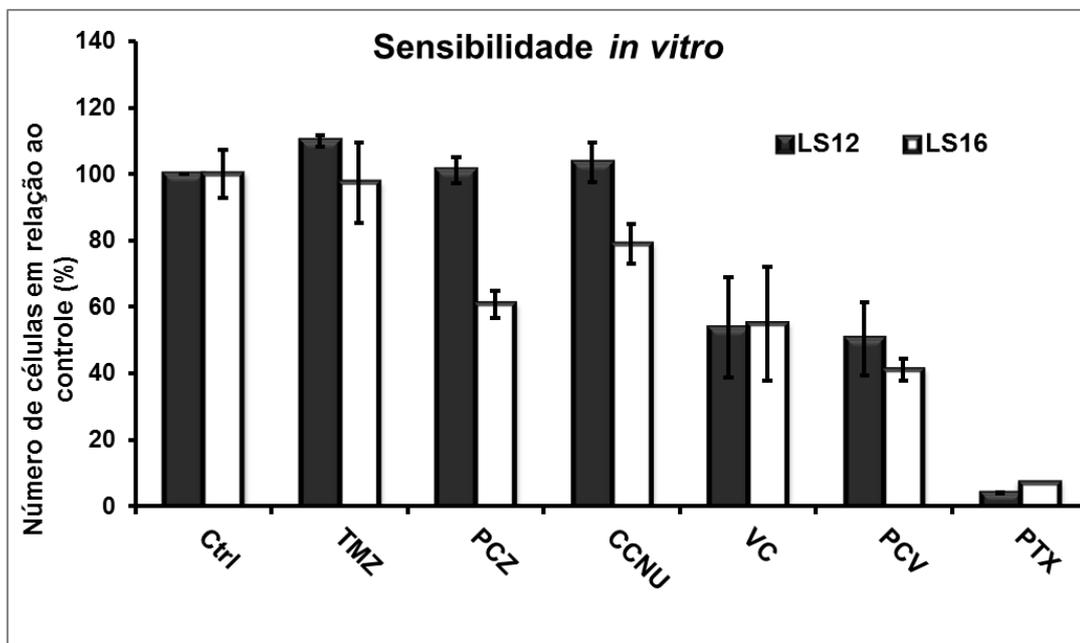


Figura 1. Sensibilidade *in vitro*. Sensibilidade das culturas primárias LS12 (barra preta) e LS16 (barra branca) em relação o controle (Ctrl) 12 dias após o tratamento com os fármacos temozolomida 30 μ M (TMZ), procarbazina 0,38 μ M (PCZ), lomustina 3,85 μ M (CCNU), vincristina 54 nM (VC), PCV e paclitaxel 0,1 μ M (PTX). Contagem do número de células por citometria de fluxo.

Análises Celulares:

A análise morfométrica nuclear (NMA) reafirmou que tanto a cultura LS12 como LS16 não respondem *in vitro* ao tratamento com TMZ na concentração plasmática (**Figura 2B e 3B**). Esse tratamento não foi capaz de induzir senescência ou morte celular que fosse perceptível por NMA. A análise celular revelou que PCV pode ter induzido morte celular pelo mecanismo de apoptose na cultura LS12, sendo duas vezes maior no terceiro dia ao se fazer uma comparação em relação aos valores de apoptose do controle (**Figura 2C**). No entanto, o mesmo resultado não foi verificado na cultura LS16, que, apesar de apresentar sensibilidade *in vitro* ao tratamento com PCV, mostrou indução de apoptose também no terceiro dia, mas duas vezes menor do que a cultura LS12 (**Figura 3C**). A sensibilidade *in vitro* verificada no tratamento com PTX pode ser devido a grande indução de morte celular por apoptose na cultura LS12 (**Figura 2D e Figura 4A**). A cultura LS16 também apresentou aumento do número de células apoptóticas, apesar de não ser tão acentuado como na cultura LS12 (**Figura 3D e Figura 4B**).

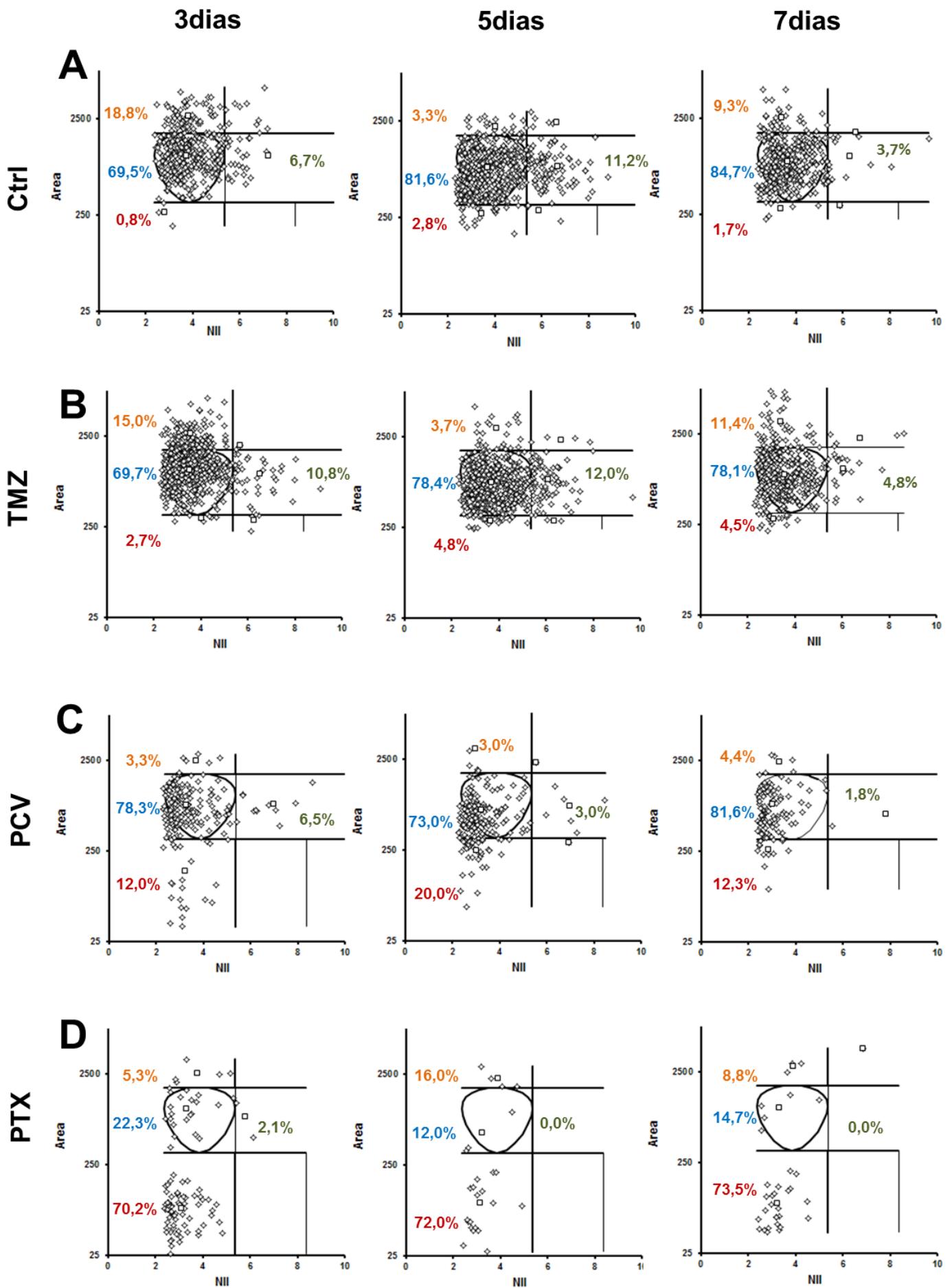


Figura 2. Análise Morfométrica Nuclear. Cultura primária **LS12**. Análises realizadas em 3, 5 e 7 dias. As medidas foram representadas por cores: núcleos normais (azul), senescentes (laranja), apoptóticos (vermelho) e irregulares (verde). **(A)** Controle (Ctrl): maioria das células normais, **(B)** TMZ: maioria das células normais, **(C)** PCV: aumento de 15x da porcentagem de células apoptóticas em 3 dias e aumento de 7x em 5 e 7 dias, **(D)** PTX: Mais de 70% de células apoptóticas em todos os dias de análise.

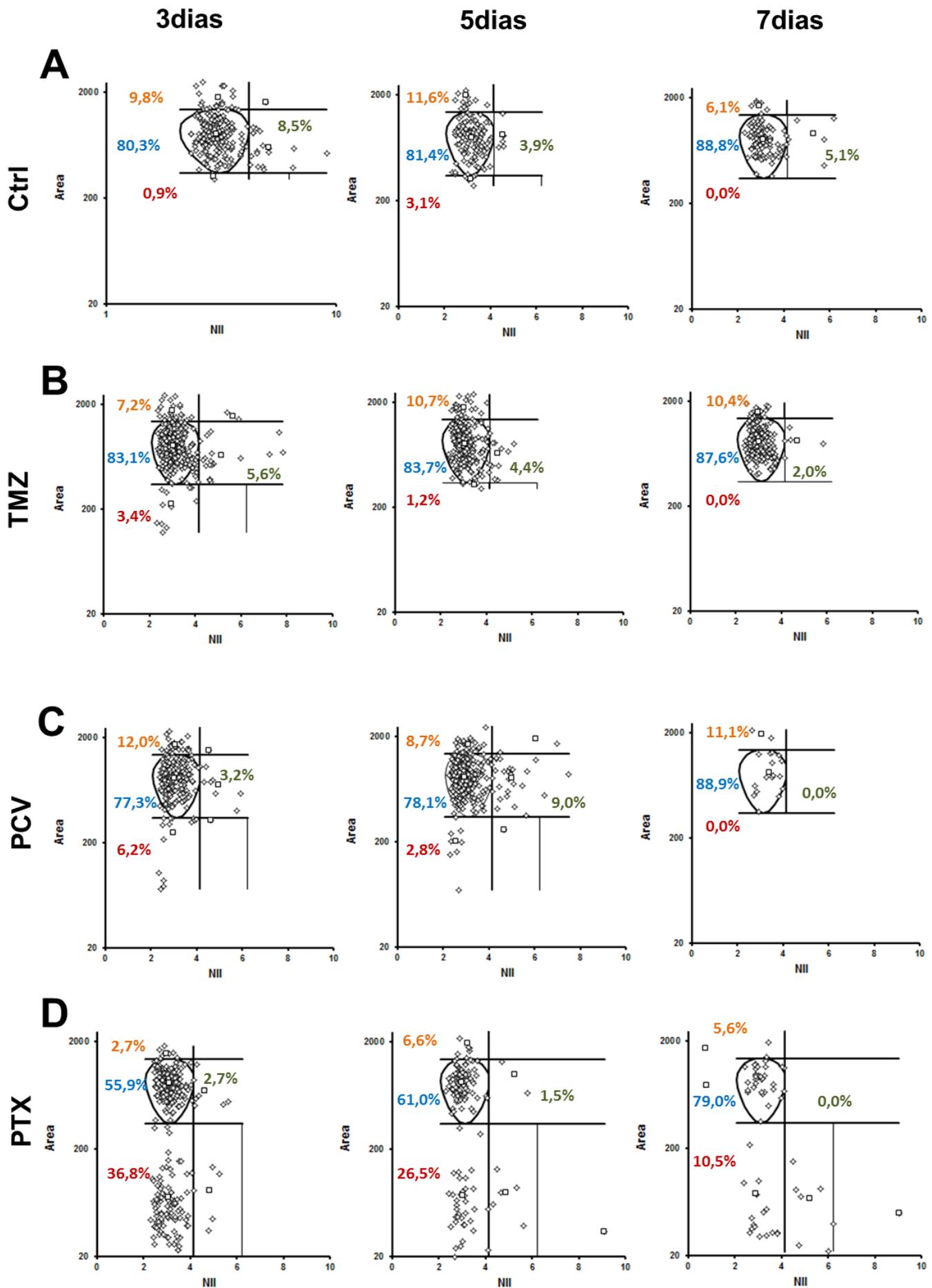


Figura 3. Análise Morfométrica Nuclear. Cultura primária LS16. Análises realizadas em 3, 5 e 7 dias. As medidas foram representadas por cores: núcleos normais (azul), senescentes (laranja), apoptóticos (vermelho) e irregulares (verde). **(A)** Controle (Ctrl): maioria das células normais, **(B)** TMZ: maioria das células normais, **(C)** PCV: aumento de 7x a porcentagem de células apoptóticas em 3 dias, **(D)** PTX: Presença de células apoptóticas em todos os dias de análise.

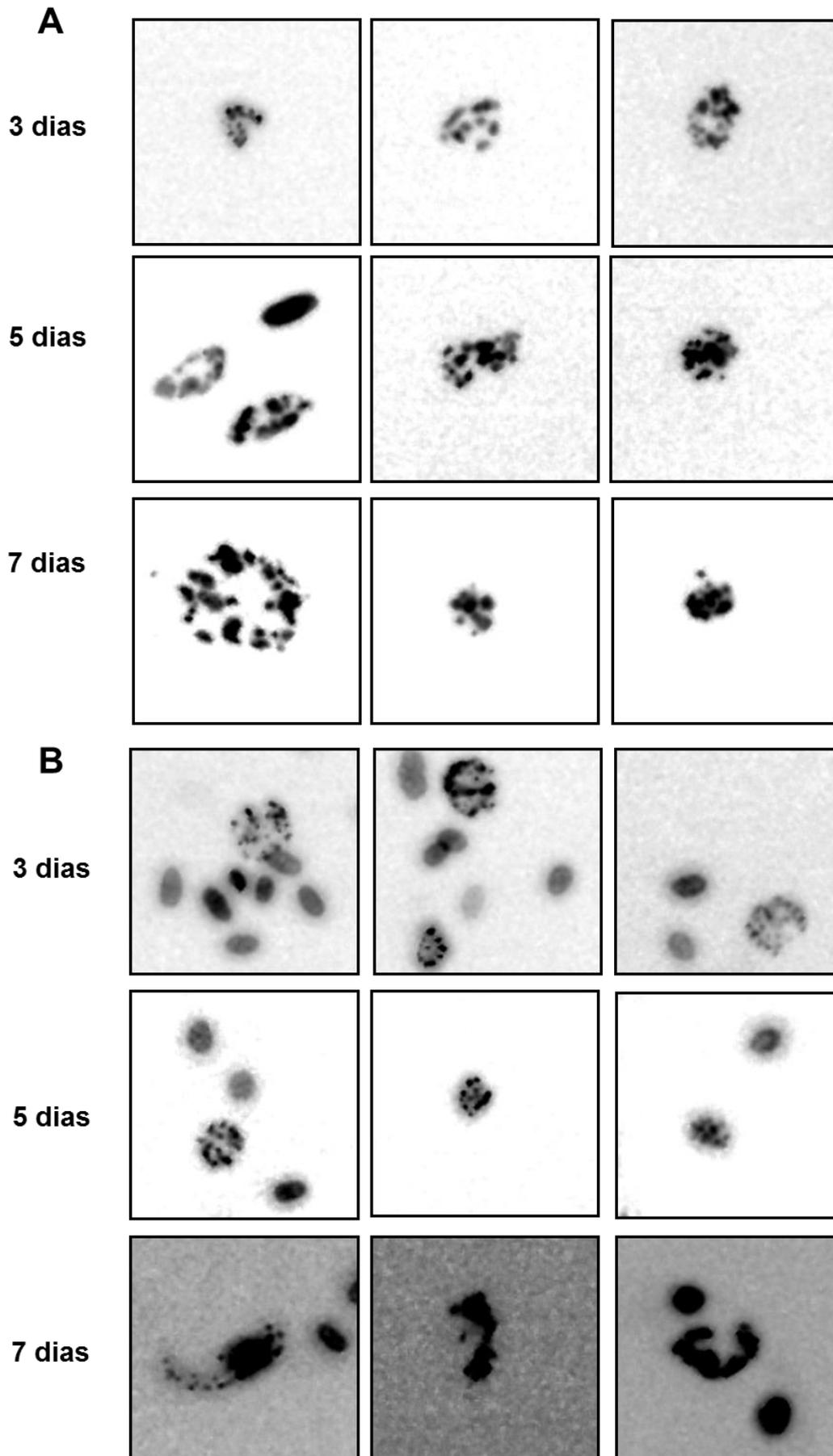


Figura 4. Núcleos apoptóticos corados com DAPI.
 Fotos dos núcleos tratados com PTX após 3, 5 e 7 dias.
 (A) Cultura primária **LS12**, (B) Cultura primária **LS16**.
 Visualização em aumento de 200x.

Análise de Organelas Vesiculares Ácidas:

A marcação com AO mostrou que ambas as culturas não tiveram aumento de organelas vesiculares ácidas (caracterizada principalmente por autofagolissomos formados durante a indução de autofagia) após o tratamento com TMZ nos dias analisados (**Figura 5**). Esse resultado mostra que TMZ não foi capaz de induzir nem apoptose e nem autofagia nas células analisadas. O tratamento com PCV não induziu autofagia na cultura LS12, no entanto, foi capaz de induzir em LS16 (**Figura 5**). Esse resultado pode ser correlacionado aos níveis de apoptose verificados através do método de NMA, em que a cultura que teve menos indução de autofagia foi a que apresentou maior número de células apoptóticas. O tratamento com PTX induziu altos níveis de autofagia em ambas as culturas (**Figura 5**). A apoptose verificada anteriormente (**Figura 2D e 3D**) pode estar relacionada ao dano intracelular induzido por PTX que parece ser tão grande que a autofagia torna-se um mecanismo para remover as células danificadas e iniciar a morte celular.

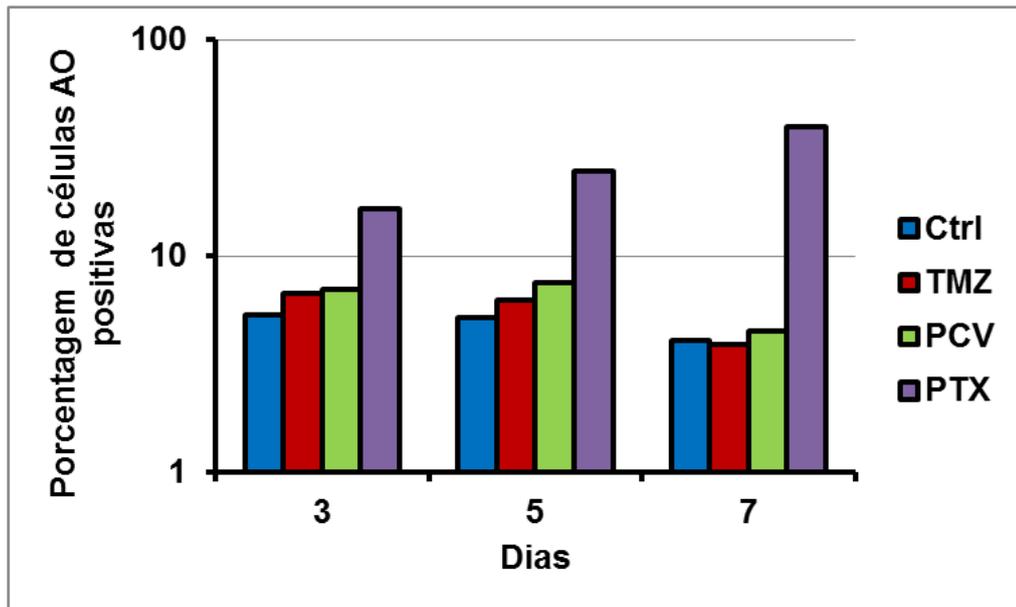
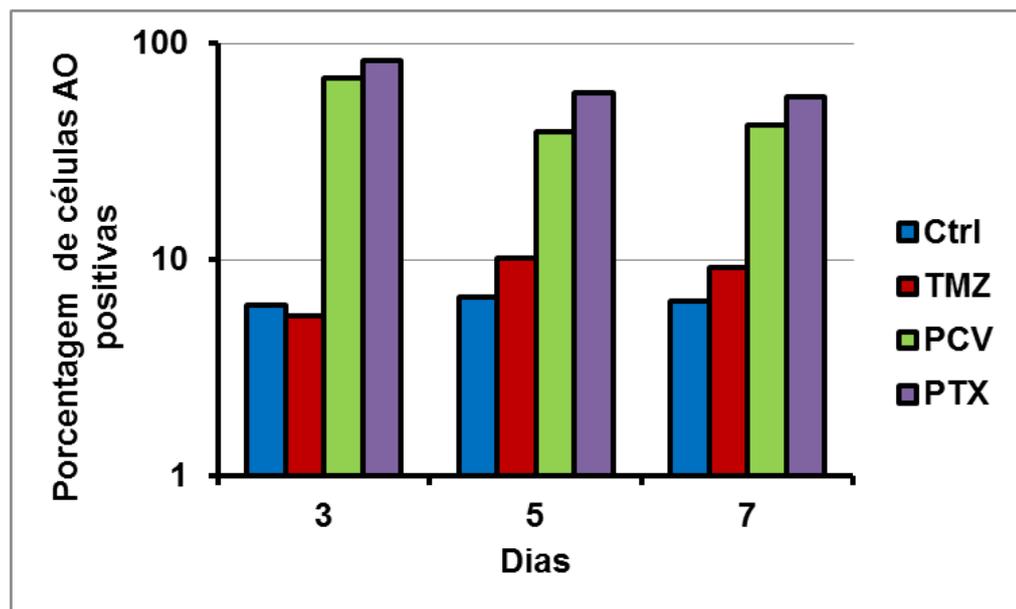
A**B**

Figura 5. Análise de Autofagia por AO.

(A) Cultura primária **LS12**: Indução de autofagia apenas no tratamento com PTX.

(B) Cultura primária **LS16**: Indução de autofagia no tratamento com PCV e PTX.

Análises feitas em citômetro de fluxo 3, 5 e 7 dias após o tratamento.

Discussão

O tratamento com TMZ é aprovado pela *Food and Drug Administration* para uso concomitante com radioterapia após ressecção cirúrgica [25]. A literatura afirma que ela confere 2,5 meses de vantagem de sobrevida média sobre pacientes que não a receberam [26]. Dados da literatura mostram que o seu efeito citotóxico é devido principalmente a indução de autofagia [2], [27]. Nossos dados de AO, todavia, mostraram que esse fármaco não foi capaz de aumentar a formação de autofagolissomos, como um indicativo de autofagia, nas culturas primárias LS12 e LS16 (**Figura 5**). Enquanto isso, na linhagem de glioblastoma U87, houve presença de autofagolissomos induzidos por TMZ pela mesma análise de AO (**Figura S1**).

Dados da literatura mostram que TMZ também induz senescência e apoptose *in vitro* em células de glioma [28]. A inter-relação destes processos desencadeados por drogas anticâncer, incluindo TMZ, não é clara [29]. De acordo com isto, foi possível verificar a presença de células senescentes na linhagem celular de glioblastoma U87 através da ferramenta de NMA (**Figura S2**). Contudo, foi possível notar que esse fármaco não é capaz de induzir o mesmo processo nas culturas primárias de pacientes (**Figura 2B, 3B e Figura S3**).

Um estudo de 2013 demonstrou pela primeira vez que um único tipo de lesão de DNA induzida por TMZ, O₆MeG, dispara três diferentes mecanismos em

células de glioma: apoptose, autofagia e senescência. Revelam ainda que os mecanismos têm uma interação complexa e que a decisão entre a morte e a sobrevivência depende de um equilíbrio de autofagia, senescência e apoptose [29]. A existência destas diferentes decisões ressalta a importância do uso de culturas primárias advindas dos pacientes para que se possa prever o tratamento mais eficaz levando em consideração as características particulares de cada tumor e a variabilidade na sensibilidade a esse tratamento.

Visto que nossos resultados mostraram que ambas as culturas LS12 e LS16 não foram sensíveis *in vitro* ao tratamento com TMZ, fomos investigar se o agente terapêutico PCV poderia ser uma opção melhor de tratamento para esses pacientes. Os resultados obtidos mostraram que as culturas primárias testadas responderam melhor a esse tratamento pela análise de sensibilidade *in vitro* (**Figura 1**). A análise celular mostrou que pode haver diferentes respostas a esse mesmo regime terapêutico dependendo da cultura celular analisada. LS12 apresentou morte celular por apoptose maior no terceiro dia de tratamento pelo método de NMA, além disso, não houve indução de autofagia com esse tratamento perceptível pela análise por AO (**Figura 2C e 5A**). Diferente disso, a cultura LS16, que também foi sensível ao tratamento *in vitro*, apresentou menos morte celular por apoptose verificada por NMA, e isso pode ser devido à indução de autofagia verificada pelo tratamento com PCV (**Figura 3C e 5B**). Diante desse resultado podemos perceber que o mesmo tratamento induz diferentes tipos de respostas nas células. A importância de conhecer isto está na possibilidade de interagir com esses processos para poder obter um melhor resultado *in vivo*.

Os resultados obtidos evidenciaram que o uso de PTX nas culturas primárias analisadas induziu expressiva morte celular por apoptose e a eficaz sensibilidade *in vitro* possivelmente deve-se a esse mecanismo (**Figura 1, Figura 2D, Figura 3D, Figura 4**). Com esse resultado torna-se evidente que PTX é um potencial agente terapêutico no tratamento desses pacientes. Apesar disso, ainda existem dificuldades no tratamento *in vivo* com PTX devido sua dificuldade de ultrapassar a barreira hematoencefálica saudável. Os estudos com PTX vêm explorando o uso de microesferas encapsuladas para melhorar a entrega do agente ao sistema nervoso central [30]–[33]. PTX é um dos agentes quimioterápicos com grande sucesso entre as drogas encapsuladas e tem sua eficácia aprovada para uma ampla variedade de tumores [32], [34], [35]. A notável eficácia de PTX verificada *in vitro* deve servir como um estímulo para a utilização desse quimioterápico na prática clínica.

Conclusão

A medicina personalizada para câncer significa a adaptação da terapia para cada paciente com base em características únicas de cada tumor. A capacidade de identificar mecanismos celulares das células tumorais em resposta aos diferentes tratamentos aumenta a chance da terapia escolhida para determinado paciente ser a mais eficiente possível. Pelas análises deste trabalho foi possível demonstrar a baixa efetividade *in vitro* do agente terapêutico TMZ, comumente utilizado na clínica. Enquanto que outros fármacos, como PCV e PTX, demonstraram melhor eficácia nas culturas primárias dos pacientes analisados. Além disso, através das análises celulares conseguimos identificar mecanismos que podem estar interferindo na ação dos fármacos. O conhecimento destes processos permite ao oncologista adotar estratégias que possam melhorar o tratamento. O paciente cuja cultura celular apresentou níveis elevados de organelas vesiculares ácidas com o tratamento com PCV, por exemplo, poderia ser tratado em combinação com cloroquina, um inibidor de autofagia, que pode aumentar a eficácia do tratamento. No entanto, a indução de autofagia deve ser confirmada por outras técnicas. Apesar disso, com os dados mostrados identificamos diferentes respostas entre amostras de pacientes com o mesmo tipo tumoral e a importância da investigação do efeito dos tratamentos *in vitro*.

Referências

- [1] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. a. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross, and R. O. Mirimanoff, “Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 10, no. 5, pp. 459–466, 2009.
- [2] T. C. Hirst, H. M. Vesterinen, E. S. Sena, K. J. Egan, M. R. Macleod, and I. R. Whittle, “Systematic review and meta-analysis of temozolomide in animal models of glioma: was clinical efficacy predicted?,” *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 1, pp. 64–71, 2013.
- [3] N. M. Bleehen, E. S. Newlands, S. M. Lee, N. Thatcher, P. Selby, a. H. Calvert, G. J. S. Rustin, M. Brampton, and M. F. G. Stevens, “Cancer research campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 13, no. 4, pp. 910–913, 1995.
- [4] W. K. Yung, R. E. Albright, J. Olson, R. Fredericks, K. Fink, M. D. Prados, M. Brada, a Spence, R. J. Hohl, W. Shapiro, M. Glantz, H. Greenberg, R. G. Selker, N. a Vick, R. Rampling, H. Friedman, P. Phillips, J. Bruner, N. Yue, D. Osoba, S. Zaknoen, and V. a Levin, “A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse.,” *Br. J. Cancer*, vol. 83, no. 5, pp. 588–593, 2000.
- [5] S. Yust-Katz, “NIH Public Access,” vol. 127, no. 15, pp. 358–366, 2012.
- [6] A. Tandon and D. Schiff, “Therapeutic Decision Making in Patients with Newly Diagnosed Low Grade Glioma,” *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2014.
- [7] M. Brada, S. Stenning, R. Gabe, L. C. Thompson, D. Levy, R. Rampling, S. Erridge, F. Saran, R. Gattamaneni, K. Hopkins, S. Beall, V. P. Collins, and S. M. Lee, “Temozolomide versus procarbazine, lomustine, and vincristine in recurrent high-grade glioma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 28, no. 30, pp. 4601–4608, 2010.
- [8] M. Ajaz, S. Jefferies, L. Brazil, C. Watts, and a. Chalmers, “Current and investigational drug strategies for glioblastoma,” *Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 7, pp. 419–430, 2014.
- [9] J. Kuhnhen, T. Kowalski, S. Steenken, K. Ostermann, and U. Schlegel, “Procarbazine, carmustine, and vincristine (PBV) for chemotherapy pre-treated patients with recurrent glioblastoma: A single-institution analysis,” *J. Neurooncol.*, vol. 109, no. 2, pp. 433–438, 2012.

- [10] C. a Burkhart, J. W. Berman, C. S. Swindell, and S. B. Horwitz, "Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity.," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 22, pp. 5779–5782, 1994.
- [11] J. J. Manfred, J. Parness, and S. B. Horwitz, "Taxol binds to cellular microtubules," *J. Cell Biol.*, vol. 94, no. 3, pp. 688–696, 1982.
- [12] S. M. Chang, J. G. Kuhn, H. I. Robins, S. C. Schold, a M. Spence, M. S. Berger, M. Mehta, I. F. Pollack, C. Rankin, and M. D. Prados, "A Phase II study of paclitaxel in patients with recurrent malignant glioma using different doses depending upon the concomitant use of anticonvulsants: a North American Brain Tumor Consortium report.," *Cancer*, vol. 91, no. 2, pp. 417–422, 2001.
- [13] M. T. Branham, S. B. Nadin, L. M. Vargas-Roig, and D. R. Ciocca, "DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 560, no. 1, pp. 11–17, 2004.
- [14] L. Annovazzi, V. Caldera, M. Mellai, C. Riganti, L. Battaglia, D. Chirio, A. Melcarne, and D. Schiffer, "The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment," *Int. J. Oncol.*, no. 7, pp. 2299–2308, 2015.
- [15] S. Fulda, "Tumor resistance to apoptosis," *Int. J. Cancer*, vol. 124, no. 3, pp. 511–515, 2009.
- [16] J. Plati and R. Khosravi-Far, "Dysregulation of Apoptotic Signalling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities," *J Cell Biochem.*, vol. 104, no. 4, pp. 1124–1149, 2008.
- [17] S. Fulda, "Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2010, 2010.
- [18] M. Serrano, "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a)," *Cell*, vol. 88, no. 5, pp. 593–602, 1997.
- [19] J. Campisi, "Cellular senescence as a tumor suppressor mechanism," *Trends Cell Biol*, vol. 18, no. 3, pp. 189–195, 2001.
- [20] I. Roninson, "Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment," *Cancer Res.*, vol. 63, pp. 2705–2715, 2003.
- [21] D. Hanahan and R. a. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, 2000.

- [22] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, and D. J. Klionsky, "Autophagy fights disease through cellular self-digestion.," *Nature*, vol. 451, no. 7182, pp. 1069–1075, 2008.
- [23] B. Levine and D. J. Klionsky, "Development by Self-Digestion Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy," *Dev. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 463–477, 2004.
- [24] E. C. Filippi-Chiela, M. M. Oliveira, B. Jurkovski, S. M. Callegari-Jacques, V. D. da Silva, and G. Lenz, "Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, 2012.
- [25] M. H. Cohen, J. R. Johnson, and R. Pazdur, "Food and drug administration drug approval summary: Temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 19 I, pp. 6767–6771, 2005.
- [26] M. D. Stupp, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma," *Cancer/Radiothérapie*, vol. 9, no. 3, pp. 196–197, 2005.
- [27] T. Kanzawa, I. M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo, and S. Kondo, "Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells.," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 4, pp. 448–457, 2004.
- [28] W. Günther, E. Pawlak, R. Damasceno, H. Arnold, and a J. Terzis, "Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids.," *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 3, pp. 463–469, 2003.
- [29] A. V. Knizhnik, W. P. Roos, T. Nikolova, S. Quiros, K. H. Tomaszowski, M. Christmann, and B. Kaina, "Survival and Death Strategies in Glioma Cells: Autophagy, Senescence and Apoptosis Triggered by a Single Type of Temozolomide-Induced DNA Damage," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 2013.
- [30] S. H. Ranganath, I. Kee, W. B. Krantz, P. K. H. Chow, and C. H. Wang, "Hydrogel matrix entrapping PLGA-paclitaxel microspheres: Drug delivery with near zero-order release and implantability advantages for malignant brain tumour chemotherapy," *Pharm. Res.*, vol. 26, no. 9, pp. 2101–2114, 2009.
- [31] P. Kumar Narahariseti, B. Yung Sheng Ong, J. Wei Xie, T. Kam Yiu Lee, C. H. Wang, and N. V. Sahinidis, "In vivo performance of implantable biodegradable preparations delivering Paclitaxel and Etanidazole for the treatment of glioma," *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 886–894, 2007.
- [32] P. P. Di Mauro and S. Borrós, "Development of High Drug Loaded and Customizing Novel Nanoparticles for Modulated and Controlled Release of Paclitaxel," *Pharm. Res.*, no. 10, 2014.

- [33] J. Alaina Floyd, A. Galperin, and B. D. Ratner, "Drug Encapsulated Polymeric Microspheres for Intracranial Tumor Therapy: A Review of the Literature," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2015.
- [34] B. M. R. Fetell, S. A. Grossman, J. D. Fisher, B. Erlanger, E. Rowinsky, and J. Stockel, "Preirradiation Paclitaxel in Glioblastoma Multiforme : Efficacy , Pharmacology , and Drug Interactions," *J Clin Oncol*, vol. 15, 1997.
- [35] Z. Lidar, Y. Mardor, T. Jonas, R. Pfeffer, M. Faibel, D. Nass, M. Hadani, and Z. Ram, "Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study.," *J. Neurosurg.*, vol. 100, no. 3, pp. 472–479, 2004.

Figuras Suplementares

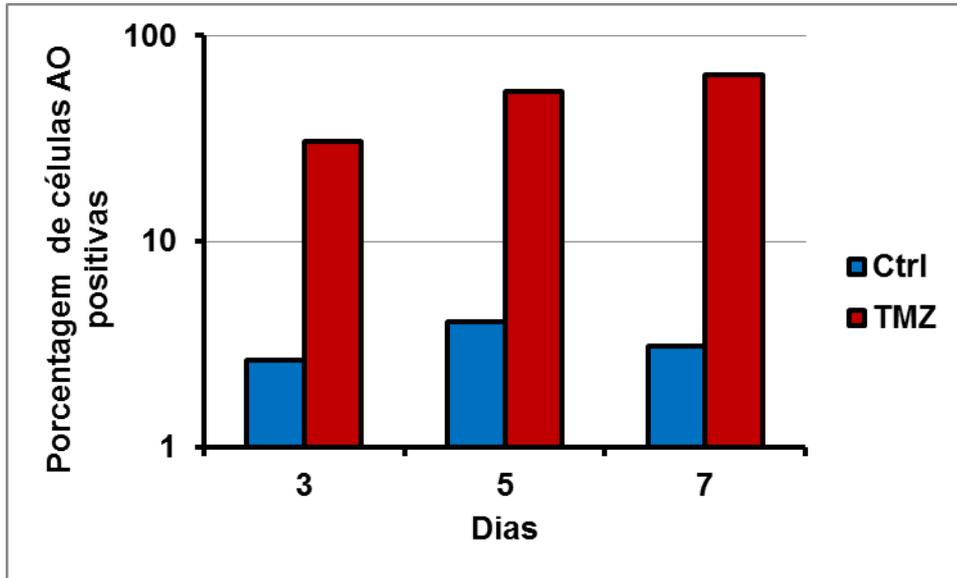


Figura S1. Análise de autofagia por AO. Linhagem celular de glioblastoma U87. Análises feitas 3, 5 e 7 dias após o tratamento. Presença de indução de autofagia no tratamento com temozolomida (TMZ) comparando-se ao controle (Ctrl).

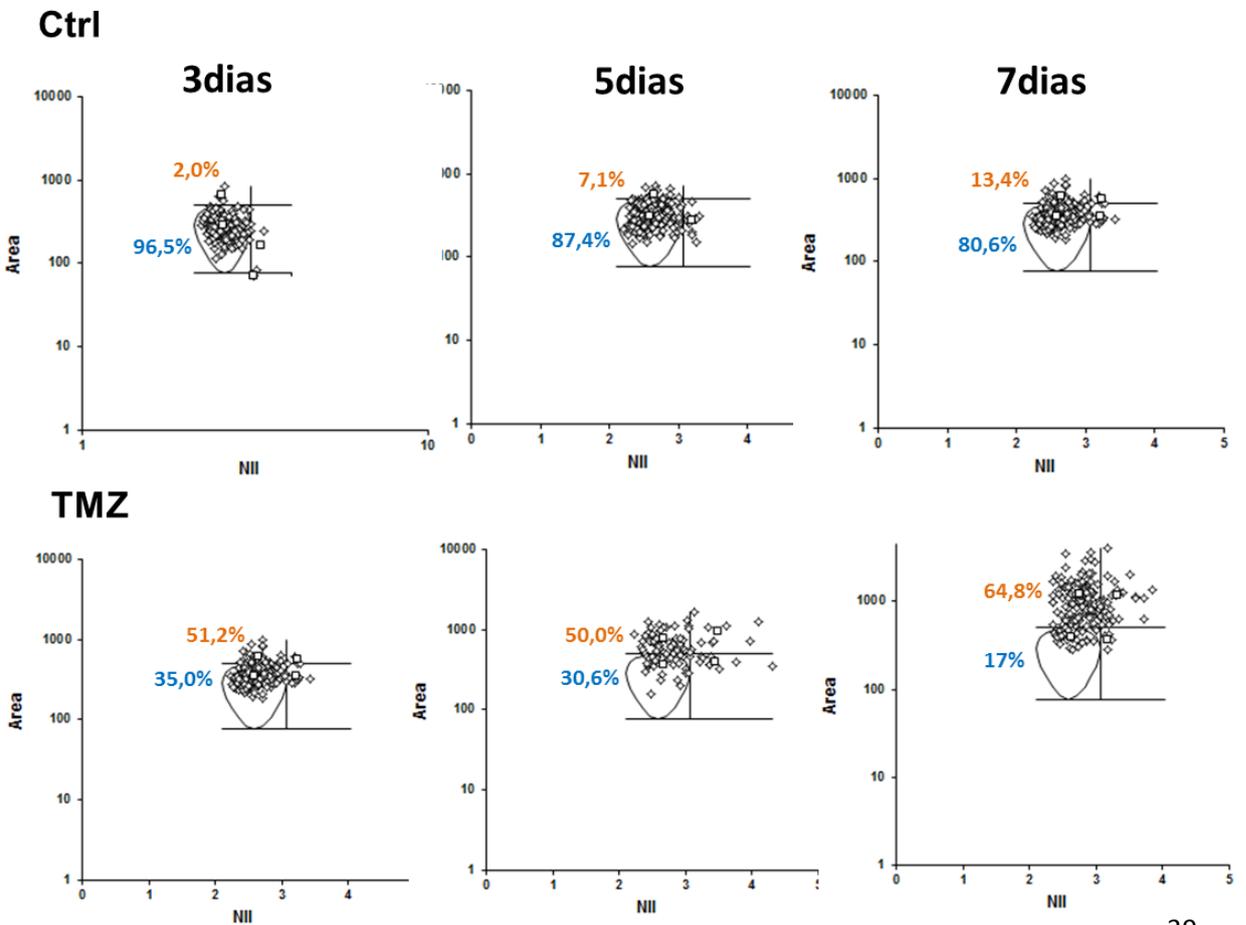


Figura S2. Análise Morfométrica Nuclear. Linhagem celular de glioblastoma U87. Análises realizadas em 3, 5 e 7 dias. As medidas foram representadas por cores: núcleos normais (azul) e senescentes (laranja). (A) Controle (Ctrl): maioria das células normais, (B) TMZ: aumento do número de células senescentes.

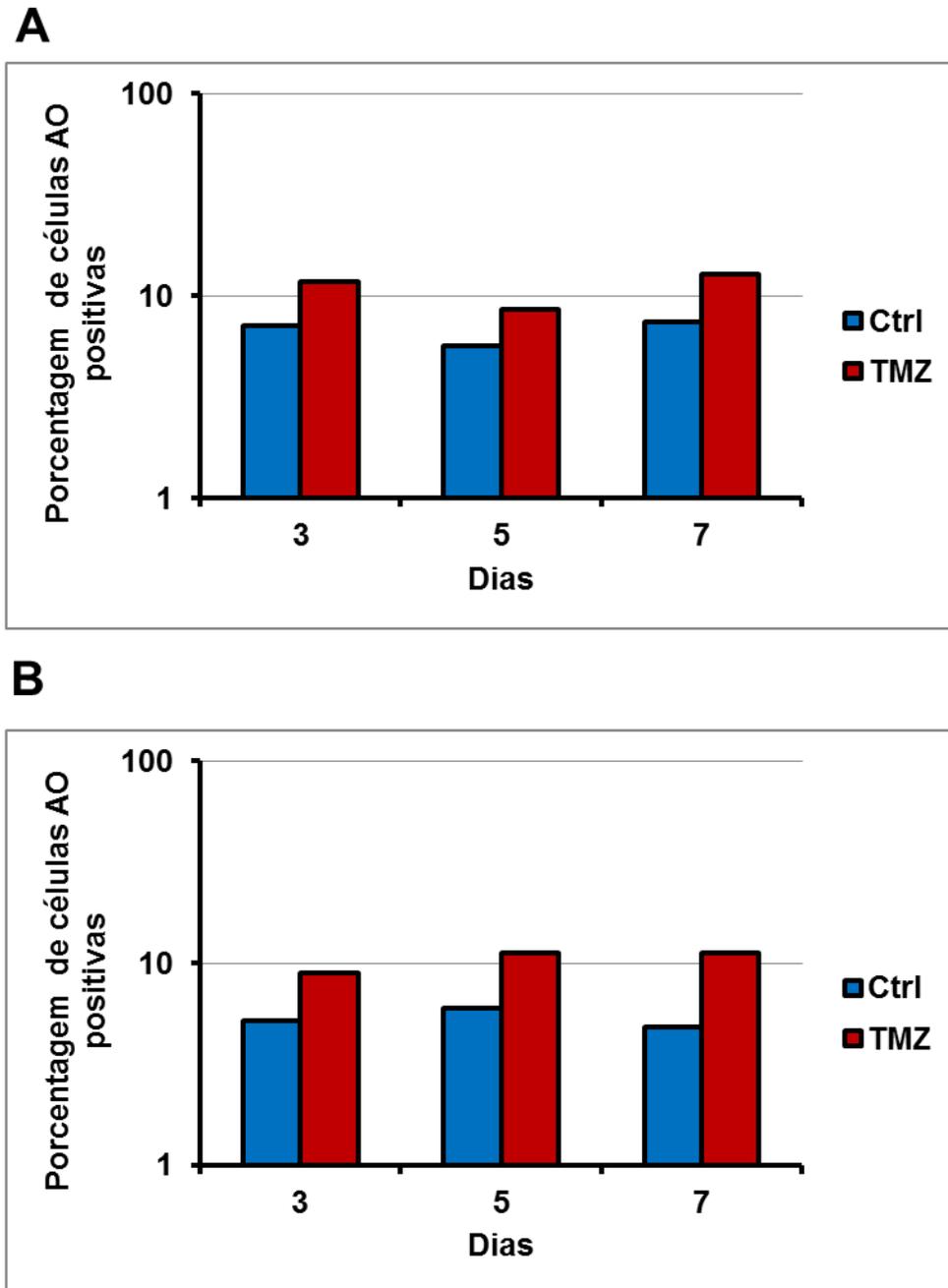


Figura S3. Análise de autofagia por AO. (A) Cultura primária **LS09**, (B) Cultura primária **LS19**. Análises feitas 3, 5 e 7 dias após o tratamento. Pouca indução de autofagia no tratamento com temozolomida (TMZ) em comparação ao controle (Ctrl).

IV. PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho incluem concluir as análises farmacológicas e de sensibilidade para as demais culturas primárias advindas de biopsias de pacientes presentes no laboratório; continuidade e aprofundamento das análises por meio de técnicas como *western blot* para proteínas relacionadas aos processos de apoptose, senescência e autofagia. Após as análises das respostas aos fármacos *in vitro* e a identificação da indução ou resistência aos processos citados faremos testes com inibidores de autofagia, como cloroquina, para as culturas que apresentaram resistência decorrente deste processo e avaliar se há potencialização do tratamento. Com esses resultados esperamos no futuro sugerir ao oncologista uma estratégia alternativa para o tratamento de cada paciente.

V. REFERÊNCIAS GERAIS

- AJABNOOR, G.; CROOK, T.; COLEY, H. Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 3, n. 1, p. e260–9, 2012.
- AJAZ, M. et al. Current and investigational drug strategies for glioblastoma. **Clinical Oncology**, v. 26, n. 7, p. 419–430, 2014.
- ANNOVAZZI, L. et al. The DNA damage/repair cascade in glioblastoma cell lines after chemotherapeutic agent treatment. **International Journal of Oncology**, n. 7, p. 2299–2308, 2015.
- AVGEROPOULOS, N. G. New treatment strategies for malignant gliomas. **Expert review of anticancer therapy**, v. 6, n. 7, p. 1087–1104, 2006.
- BACA, S. C. et al. Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. v. 153, n. 3, p. 666–677, 2014.
- BLEEHEN, N. M. et al. Cancer research campaign phase II trial of temozolomide in metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 4, p. 910–913, 1995.
- BRANHAM, M. T. et al. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 1, p. 11–17, 2004.
- BURKHART, C. A et al. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity. **Cancer research**, v. 54, n. 22, p. 5779–5782, 1994.
- CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumor suppressor mechanism. **Trends Cell Biol**, v. 18, n. 3, p. 189–195, 2001.
- CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 9, p. 729–740, 2007.
- CHANG, S. M. et al. A Phase II study of paclitaxel in patients with recurrent malignant glioma using different doses depending upon the concomitant use of anticonvulsants: a North American Brain Tumor Consortium report. **Cancer**, v. 91, n. 2, p. 417–422, 2001.
- COLLADO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 223–233, 2007.

- COLLADO, M.; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 1, p. 51–57, 2010.
- COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 2776–2778, 1997.
- CUERVO, A. M. Autophagy: In sickness and in health. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 70–77, 2004.
- FRANCESCHI, E. et al. Salvage temozolomide for prior temozolomide responders. **Cancer**, v. 104, n. 11, p. 2473–2476, 2005.
- FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 3, p. 511–515, 2009.
- FULDA, S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.
- GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. p. 1–26, 2015.
- GASCOIGNE, K. E.; TAYLOR, S. S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 15, p. 2579–2585, 2009.
- GOLDAR, S.; KHANIANI, M. S.; DERAKHSHAN, S. M. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. v. 16, p. 2129–2144, 2015.
- GWAK, H. S. et al. Chemotherapy for malignant gliomas based on histoculture drug response assay: A pilot study. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 50, n. 5, p. 426–433, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HIRST, T. C. et al. Systematic review and meta-analysis of temozolomide in animal models of glioma: was clinical efficacy predicted? **British journal of cancer**, v. 108, n. 1, p. 64–71, 2013.
- HOFF, D. D. VON. He ' s Not Going to Talk About In Vitro. 1989.
- JOHANNESSEN, T.-C. A.; BJERKVIG, R.; TYSNES, B. B. DNA repair and cancer stem-like cells--potential partners in glioma drug resistance? **Cancer treatment reviews**, v. 34, n. 6, p. 558–567, 2008.
- KANZAWA, T. et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. **Cell death and differentiation**, v. 11, n. 4, p. 448–457, 2004.

- KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 9, p. 726–734, 2005.
- LEE, S. W. et al. In vitro chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. **Acta Medica Okayama**, v. 66, n. 3, p. 271–277, 2012.
- LENZ, G. Endogenous anticancer mechanisms (EACMs). **Frontiers in Bioscience**, v. S4, n. 1, p. 1017, 2012.
- LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by Self-Digestion Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 463–477, 2004.
- LI, C. et al. Impact of Autophagy Inhibition at Different Stages on Cytotoxic Effect of Autophagy Inducer in Glioblastoma Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 53629254, p. 1303–1316, 2015.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.
- MAHALEY, M. S. et al. National survey of patterns of care for brain-tumor patients. **Journal of neurosurgery**, v. 71, n. 6, p. 826–836, 1989.
- MANFRED, J. J.; PARNES, J.; HORWITZ, S. B. Taxol binds to cellular microtubules. **Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 3, p. 688–696, 1982.
- MESSAOUDI, K.; CLAVREUL, A.; LAGARCE, F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2015.
- MIZUSHIMA, N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069–1075, 2008.
- PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro**, v. 3, n. 4, p. 279–296, 2011.
- PLATI, J.; KHOSRAVI-FAR, R. Dysregulation of Apoptotic Signalling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. **J Cell Biochem.**, v. 104, n. 4, p. 1124–1149, 2008.
- QUINN T. OSTROM, M. . CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. **Neuro Oncol**, v. 14(suppl 5, n. February, p. 1–57, 2014.
- RONINSON, I. Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. **Cancer Research**, v. 63, p. 2705–2715, 2003.

SERRANO, M. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). **Cell**, v. 88, n. 5, p. 593–602, 1997.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 5, p. 459–466, 2009.

VERHAAK, R. G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

YUNG, W. K. et al. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. **British journal of cancer**, v. 83, n. 5, p. 588–593, 2000.

YUST-KATZ, S. NIH Public Access. v. 127, n. 15, p. 358–366, 2012.

ZHANG, J. et al. Acquired resistance to temozolomide in glioma cell lines: Molecular mechanisms and potential translational applications. **Oncology**, v. 78, n. 2, p. 103–114, 2010.

VI. ANEXOS

Anexo 1:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Estabelecimento de culturas de tumores do sistema nervoso central para avaliação celular, genética e farmacológica”.

Investigadores Responsáveis: Franciele Kipper, Professor Dr. Guido Lenz, Dr. André Marc, Dra. Fabiana Spillari Viola, Professor Dr. Jaderson Costa da Costa, Professor Dr. Eliseu Paglioli Neto

Local de realização e endereço: Hospital São Lucas da PUCRS, Avenida Ipiranga, 6690 - POA/RS

Prezado paciente:

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que será conduzido por uma equipe de pesquisadores da PUCRS e da UFRGS. Este estudo tem por objetivo avaliar de que maneira as células dos tumores de pacientes respondem a diferentes medicamentos utilizados para o tratamento de tumores do sistema nervoso, buscando compreender porque alguns pacientes têm uma resposta melhor a um determinado tratamento do que outros.

Caso você concorde em participar do estudo, nós usaremos um pedaço do seu tumor retirado durante a cirurgia, antes que ele seja descartado. As células do pedaço do seu tumor serão crescidas no laboratório e usadas para:

1. Estudar as alterações no material genético destas células para tentar descobrir porque o tumor se originou e porque ele respondeu a terapia de uma determinada forma;
2. Testar se diferentes medicamentos que já estão disponíveis para tratamento deste tumor matam estas células e se ou porque algumas sobrevivem;

3. Estabelecer uma coleção de células que serão armazenadas em um banco de células na PUC e na UFRGS para que possam ser utilizadas em estudos futuros. Neste caso, as células só poderão ser utilizadas para novas pesquisas mediante autorização de um comitê de ética em pesquisa.

É importante deixar claro que os resultados desta pesquisa provavelmente não terão nenhum impacto sobre o seu tratamento e/ou acompanhamento médico imediato, mas podem proporcionar um maior entendimento sobre a doença e auxiliar o desenvolvimento e planejamento de tratamentos futuros.

Não existe um prazo exato ou estipulado para que você tome conhecimento dos resultados do estudo, mas estes lhes serão informados assim que estiverem disponíveis, se este for o seu desejo. Você pode optar por não saber o resultado desta pesquisa. Além disso, estes estudos serão publicados em revistas científicas especializadas.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária e você tem total liberdade de concordar ou não com a participação nesta pesquisa. Sua decisão, seja qual for, NÃO prejudicará o seu atendimento médico nesta instituição.

O estudo prevê que um pedaço do tumor retirado durante a cirurgia possa ser utilizado para atender aos objetivos deste projeto de pesquisa, ou de outros projetos de pesquisa relacionados a este propósito. O material coletado durante a cirurgia será suficiente para realizar todos os procedimentos do estudo e não influenciará a coleta de material para a patologia ou qualquer outro exame de rotina.

RESPONDA:

1. Com relação a porção do seu tumor que seria descartada após a cirurgia, para este estudo, você (marque com um X):

AUTORIZA a utilização no laboratório para o desenvolvimento do presente projeto;

NÃO AUTORIZA a coleta e a utilização no laboratório e deseja que esta porção seja descartada imediatamente após a cirurgia.

2. Com relação ao armazenamento das células deste tumor, para pesquisas futuras, no final deste estudo, você (marque com um X):

AUTORIZA o armazenamento para utilização em estudos futuros que estejam aprovados por uma comissão de ética da PUC ou UFRGS.

NÃO AUTORIZA o armazenamento, solicitando que seja descartado após a conclusão do presente estudo.

3. Durante o estudo também estão previstas três coletas de sangue: uma antes da retirada do tumor, uma imediatamente após a retirada cirúrgica do tumor e outra aproximadamente dois meses após a sua cirurgia (durante uma consulta médica de acompanhamento). Em cada coleta serão retirados 10 mL de sangue, quantidade correspondente a mais ou menos uma colher de sopa. Você (marque com um X):

AUTORIZA essas coletas, ciente de que após a coleta de sangue pode haver uma pequena dor local e até mesmo formação de uma pequena mancha roxa na região.

NÃO AUTORIZA as coletas de sangue.

4. Normalmente após a cirurgia um pedaço do tumor é enviado para a biopsia para identificação da malignidade do mesmo e fica armazenada no hospital. Nesse caso uma porção do tumor que foi enviado para biopsia vai estar disponível caso você concorde e o estudo necessite fazer uso dela apenas depois que essa biopsia for concluída. Para isso, você (marque com um X):

AUTORIZA que esse material seja utilizado posteriormente sabendo que isso não causa prejuízos ao seu diagnóstico.

NÃO AUTORIZA que a porção armazenada pelo hospital esteja disponível para este estudo.

Durante a pesquisa também é necessária a análise do prontuário médico para confrontar os resultados obtidos no laboratório com os dados clínicos (idade, sexo, doenças prévias), quimioterapia utilizada, exames laboratoriais prévios

(bioquímicos e hematológicos), etc. Em NENHUM momento dados pessoais serão divulgados ou a sua identidade revelada a terceiros.

Por meio deste termo, você AUTORIZA que os pesquisadores envolvidos neste estudo pesquisem os seus registros médicos nesta instituição a fim de obter as informações necessárias para a realização desta pesquisa. Você tem direito à privacidade. Os resultados deste estudo poderão ser publicados, mas o seu nome não será revelado.

Em qualquer momento você é livre para abandonar o estudo por qualquer motivo pessoal.

Danos relacionados à pesquisa:

A doação de uma pequena parte do tumor retirado não acarretará em nenhum dano físico uma vez que essa porção seria descartada após a cirurgia.

A biopsia continuará a ser feita pelo hospital independente de você disponibilizar uma porção restante para a realização do presente projeto ou não.

As coletas de sangue podem gerar dor local e uma pequena mancha roxa, passageiras.

As análises do prontuário médico não violarão a sua privacidade.

Confidencialidade:

As amostras dos tumores obtidos para o estudo serão catalogadas na forma de um código com letras e números, em nenhum momento do estudo o seu nome ou outros dados pessoais serão divulgados.

Os prontuários com todos os dados clínicos serão protegidos de acordo com determinações das leis brasileiras, através do Comitê Nacional de Ética (Brasília). Informações obtidas deste estudo poderão ser usadas em relatórios, apresentações e publicações, mas o seu nome não será divulgado em nenhum momento.

Benefícios potenciais:

A participação neste estudo poderá não trazer benefício algum para o seu tratamento. Porém, se forem descobertas algumas alterações do seu material genético estas serão comunicadas ao seu oncologista, que poderá utilizar este resultado para tomar decisões importantes sobre o seu tratamento. Entretanto, com base nos resultados obtidos, espera-se, em longo prazo, obter um maior conhecimento e compreensão a respeito desta doença e ser capaz de direcionar o tratamento de acordo com características peculiares do tumor de cada paciente. Apenas através de estudos como esse poderemos desenvolver um tratamento mais adequado para seus portadores e tentar melhorar a sobrevivência dos pacientes futuros.

Custos e pagamentos:

Você participará desse estudo de forma totalmente voluntária.

Não haverá custos para sua participação neste estudo. Nem você ou o seu médico serão pagos para fornecer porções do seu tumor e/ou sangue para este estudo. Todas as despesas serão pagas por agências de financiamento à pesquisa.

Dúvidas:

Se você tiver qualquer dúvida em relação à esta pesquisa, deve contatar alguns dos pesquisadores responsáveis em horário comercial, no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, através do telefone (51) 3308.7620 ou diretamente a qualquer hora do dia com a pesquisadora Franciele Kipper pelo e-mail franciele.kipper@ufrgs.br ou com o pesquisador Guido Lenz pelo e-mail lenz@ufrgs.br.

Em caso de dúvida em relação ao conteúdo ético desta pesquisa, não hesite em contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS – localizado na Av. Paulo Gama, 110, 2º andar, fone: (51) 3308.3738, e-mail: etica@propesq.ufrgs.br – ou o Comitê de Ética da PUCRS – localizado na Av. Ipiranga 6690, prédio 60, Sala 314, fone/fax: (51) 3320.3345, e-mail: cep@puccrs.br – ambos em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Consentimento do Paciente:

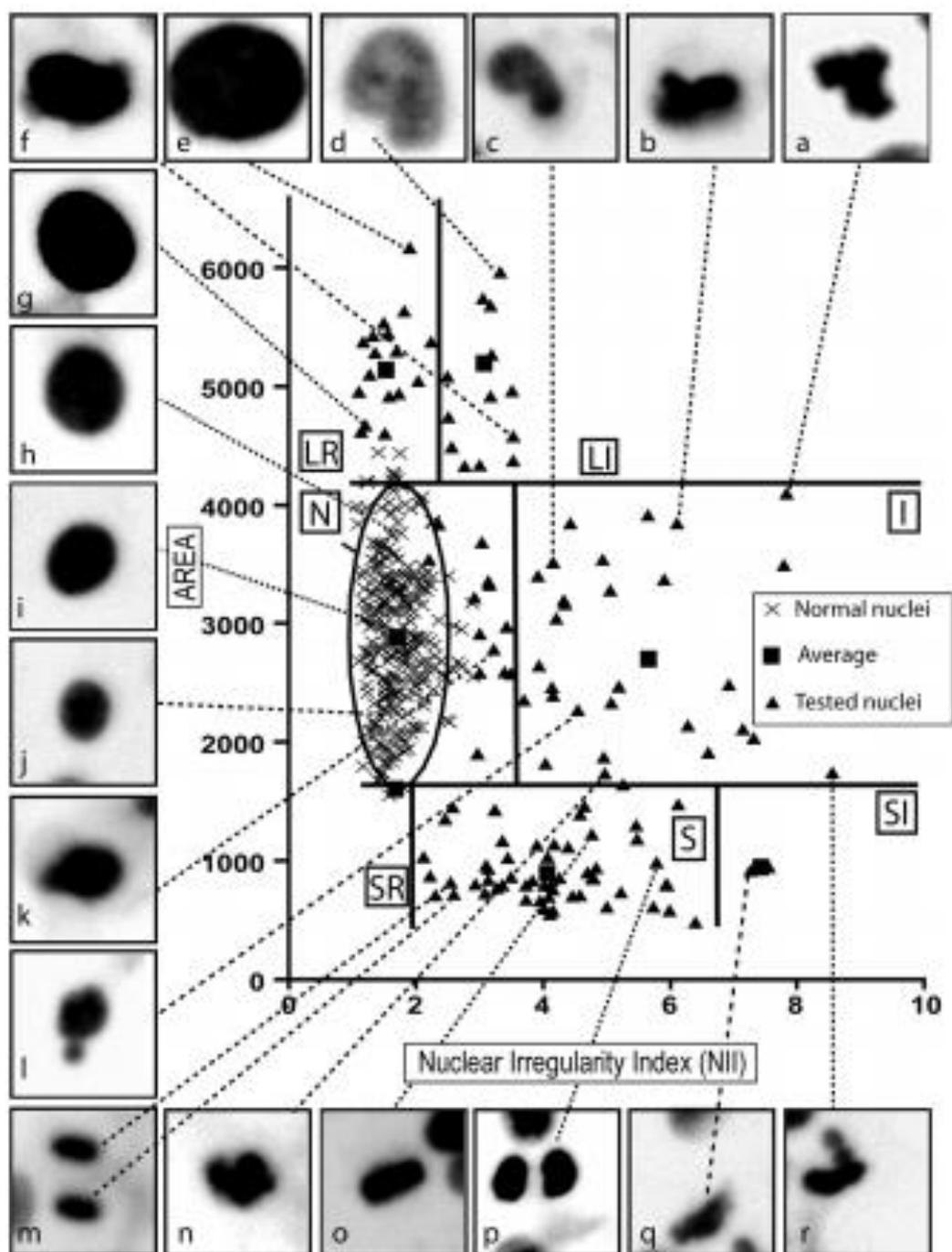
Fui informado do objetivo, procedimentos, duração do estudo e concordo em participar deste projeto de pesquisa conduzido pelos pesquisadores: Franciele Kipper, Professor Dr. Guido Lenz, Dr. André Marc, Dra. Fabiana Spillari Viola, Professor Dr. Jaderson Costa da Costa, Professor Dr. Eliseu Paglioli Neto.

Um resumo das informações foi passado a mim e sei que estou livre para recusar minha participação neste estudo e posso desistir do meu consentimento a qualquer momento, sem prejuízos ao tratamento médico que receberei. Foi-me dada uma cópia deste consentimento para guardar comigo e este documento me confere todos os direitos e deveres perante o que me foi proposto.

Nome do paciente (em letra de forma) Assinatura do paciente ou responsável

Nome do pesquisador (em letra de forma) Assinatura do pesquisador

Caso seja necessário o contato com o paciente no futuro, o mesmo poderá ser feito através dos telefones: (____)_____ ou (____)_____. Na impossibilidade de contatar o paciente dessa forma, os pesquisadores poderão contatar o familiar _____ através do telefone (____)_____, e-mail _____ ou endereço _____.



Anexo 2. Distribuição de núcleos em um gráfico de área versus NII. N: Núcleos normais (cruzes representam núcleos utilizados para determinar a população de referência e a elipse representa a distribuição conjunta de área e NII para núcleos normais); I: irregular, LR: Grande e regular; LI: Grande e irregular; SR: Pequeno e regular; S: Pequeno; SI: Pequeno e irregular. Quadrados representam as médias das diferentes populações. Fotografias (a-r) mostram exemplos de núcleos e a sua localização no gráfico. [24]

doi:10.1371/journal.pone.0042522.g001