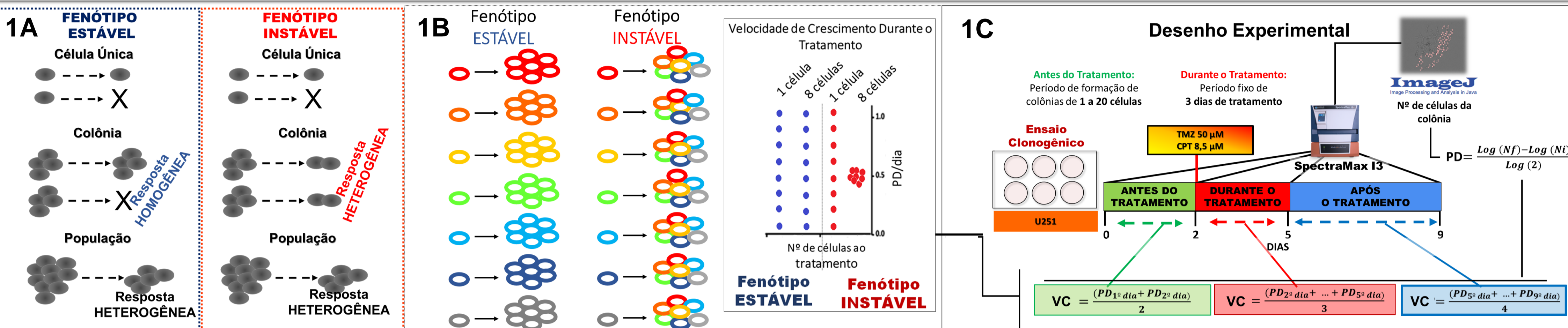


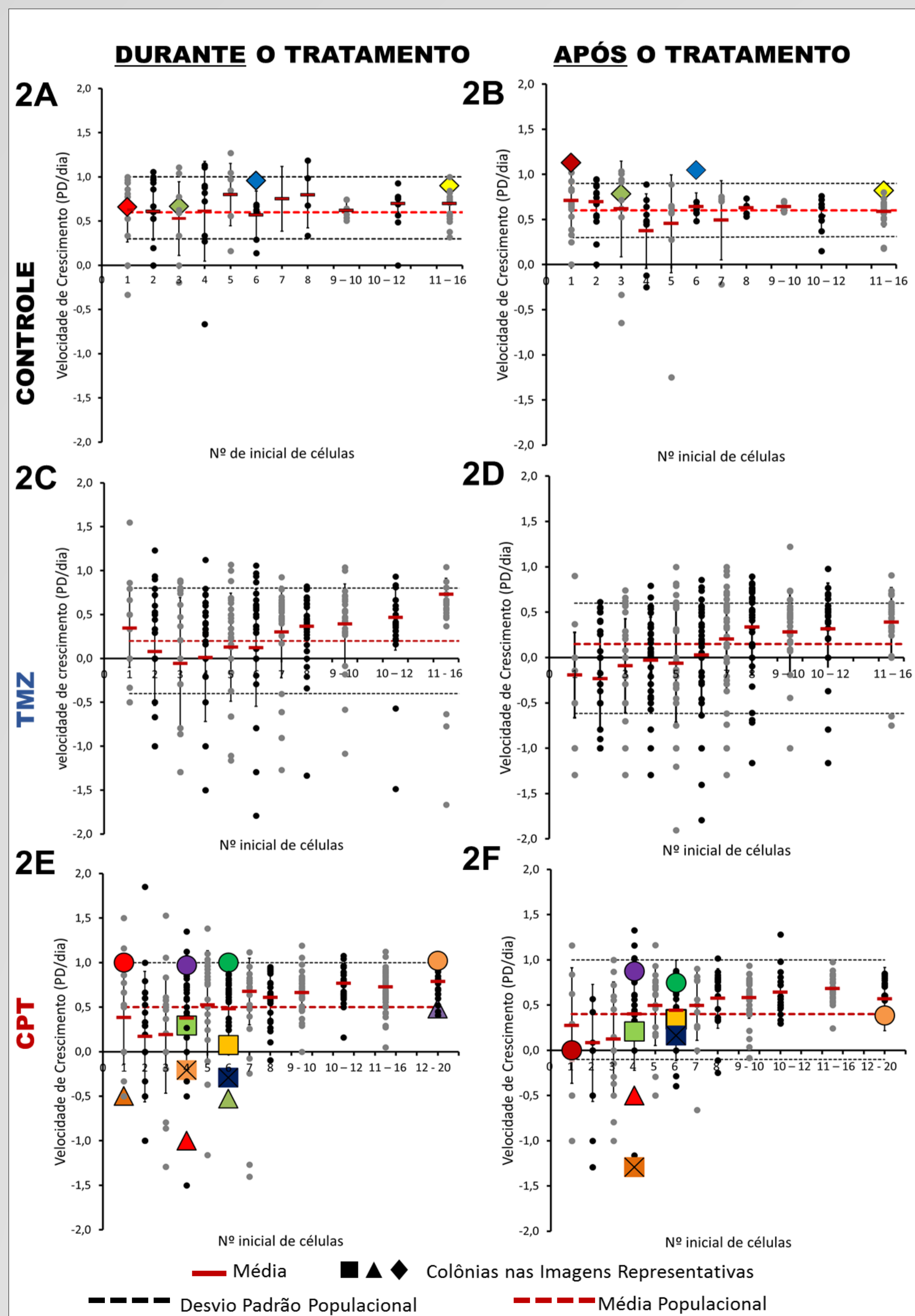
Introdução:

Apesar de, conceitualmente, uma divisão celular dar origem a duas células genótipica e fenotipicamente idênticas, dados prévios de ensaios *in vitro* registram casos de resposta heterogênea a quimioterápicos dentro de colônias geradas a partir de células únicas (Fig. 1 A). Uma das hipóteses é que subclones, com graus variados de resistência, tenham se desenvolvido a partir de mutações acumuladas ao longo das divisões das células, durante o período de formação de uma colônia (Fig. 1 B). Diante disso, o fenótipo de proliferação das células tumorais sobreviventes ao tratamento pode ser instável ao longo das gerações, devido a possibilidade de aumento de variabilidade entre as células-irmãs no decorrer das mitoses. Portanto, o objetivo do trabalho é verificar o grau de variabilidade do perfil proliferativo de células, expostas a tratamentos quimioterápicos distintos, adicionado a cada divisão celular no período de formação da colônia após uma a cinco divisões celulares.

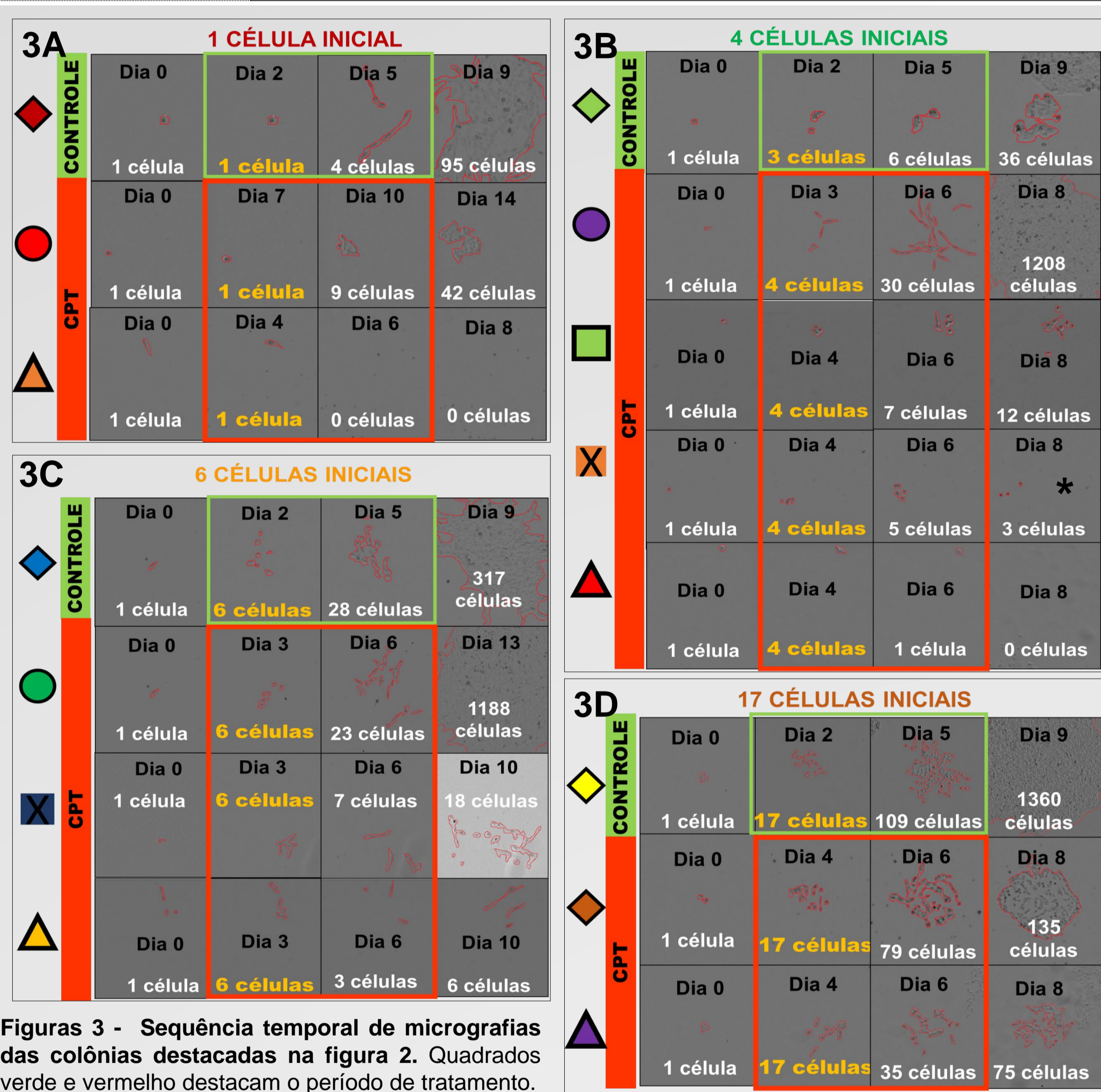
Metodologia e Resultados:



Figuras 1 – 1A. Princípio lógico da metodologia utilizada. 1B. Duas hipóteses de resistência: estável - fenótipo de resistência é herdado inalterado pelos descendentes - ou instável - a variabilidade de fenótipos dentro de todas colônias aumenta no decorrer das gerações até assemelhar-se a variabilidade populacional. Graus de resistência são representados pelas diferentes cores. O gráfico ilustrativo à direita mostra a variação da manutenção do fenótipo em cada colônia (representada por pontos) de acordo com o número inicial de células da colônia no período de tratamento. 1C. Desenho experimental: Colônias compostas por 1 a 20 células foram tratadas por 3 dias com Temozolomida (TMZ) e Cisplatina (CPT). Micrografias foram captadas regularmente e o número final e inicial de células de uma colônia no intervalo analisado (Nf e Ni, respectivamente) foram inseridos na fórmula acima para o cálculo do índice de duplicação da população das colônias ao longo do tempo (PD). A velocidade de crescimento (VC) diária de cada colônia foi calculada de forma individual para cada etapa da análise.



Figuras 2- Análise do Crescimento das Colônias. Barras pretas correspondem ao desvio padrão da distribuição dos resultados de cada grupo de células iniciais analisadas. Marcadores coloridos referenciam as colônias analisadas através da sequência de micrografias na figura 3.



-- No período durante o tratamento, à medida que o número inicial de células componentes das colônias no tratamento aumenta, o perfil proliferativo das colônias torna-se cada vez mais similar entre si (Fig. 2C e 2E). Porém, no período pós-tratamento, a variação do perfil proliferativo das colônias sobreviventes parece voltar a aumentar (Fig. 2D e 2F).

-- As micrografias confirmam a grande variância na resposta entre colônias formadas por até 4 células (Fig. 3B), onde são observados desde colônias com resposta homogênea aos tratamentos até o surgimento de casos de sensibilidade variada dentro de uma mesma colônia (sequência com asterisco). Isso pode indicar que duas divisões celulares sejam suficientes para o surgimento de fenótipos distintos dentro de uma mesma colônia originada de célula única.

-- Durante o período de tratamento, a variabilidade de resposta proliferativa de colônias com o mesmo número inicial de células passa a diminuir notavelmente a partir de colônias compostas por 8 células (Fig. 2C e 2E). Este fenômeno se confirma a partir da análise das micrografias sequenciais (Fig. 3C e 3D). Isso sugere que um número mínimo de três divisões celulares seja necessário para que uma heterogeneidade fenotípica seja alcançada dentro de uma colônia originada de célula única, produzindo um perfil proliferativo semelhante ao constatado em ensaios populacionais.

Conclusão e Perspectivas:

Portanto, através deste conjunto de ensaios, pode-se concluir que uma elevada heterogeneidade fenotípica pode ser rapidamente alcançada dentro de um conjunto de células originadas a partir de uma única célula, evidenciando um alto grau de instabilidade genética e molecular que possivelmente deve ser adquirida a cada geração. Como perspectiva, pretende-se ampliar o número amostral para elevar o grau de confiabilidade dos dados gerados até o momento.