

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Curso de Ciências Biológicas

Júlia Caroline Marcolin

**HOMOGENEIZAÇÃO DE FENÓTIPO DE SINALIZAÇÃO DE ERK NO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DE GLIOBLASTOMA**

Porto Alegre

2022

Júlia Caroline Marcolin

**HOMOGENEIZAÇÃO DE FENÓTIPO DE SINALIZAÇÃO DE ERK NO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de bacharela em Ciências
Biológicas do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Dra. Karine Rech Begnini

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Marcolin, Júlia Caroline
Homogeneização de fenótipo de sinalização de ERK no
tratamento quimioterápico de glioblastoma / Júlia
Caroline Marcolin. -- 2022.
33 f.
Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Karine Rech Begnini.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Via de sinalização de ERK. 2. Glioblastoma. 3.
Temozolomida. I. Lenz, Guido, orient. II. Begnini,
Karine Rech, coorient. III. Título.

Júlia Caroline Marcolin

**HOMOGENEIZAÇÃO DE FENÓTIPO DE SINALIZAÇÃO DE ERK NO
TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO DE GLIOBLASTOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de bacharela em Ciências
Biológicas do Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz

Coorientadora: Dra. Karine Rech Begnini

Aprovada em: Porto Alegre, 11 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guido Lenz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Karine Rech Begnini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fabrício Figueiró
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Isabele Iser Marson
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo e qualquer coisa, a minha família pelo amor e apoio incondicionais. Todas minhas conquistas são de vocês também.

Ao meu querido namorado Vinícius por trazer calma e conforto aos meus momentos caóticos e sempre acreditar em mim.

Agradeço as amigadas, em especial à Natacha, que mesmo de longe sempre está por perto quando preciso. E também à Andressa, Caroline, Fernanda, Giovana e Lívia pela companhia durante essa montanha-russa de sentimentos, experiências e aprendizados que é uma graduação. Ter vivido isso com vocês tornou tudo mais leve e especial.

Por fim, agradeço ao LabSinal pela oportunidade de aprender tanto, especialmente aos meus incríveis orientadores Guido e Karine: muito mais do que ciência, vocês me ensinaram a fazer as perguntas difíceis e ter a coragem de ir atrás das respostas.

RESUMO

Entre os tumores cerebrais malignos, o glioblastoma multiforme é o mais comum, tendo como características elevados graus de proliferação e invasão, além de uma heterogeneidade intratumoral que contribui para resistência e menor sobrevida dos pacientes. A heterogeneidade pode ter diversas origens e faz com que células de uma mesma população respondam de maneira diferente a um mesmo estímulo. Nesse sentido, uma das vias celulares que controlam a proliferação e sobrevivência das células é a via de sinalização de ERK, que também está relacionada com processos de tumorigênese e fenótipos oncogênicos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi gerar populações de células tumorais com fenótipos homogêneos de sinalização de ERK, visando compreender e comparar suas respostas ao tratamento quimioterápico e seus efeitos no desfecho de morte e proliferação celular. Para isso, a sinalização de ERK em células tumorais de glioblastoma foi marcada com fluorescência verde, permitindo o acompanhamento da atividade da via ao longo do tempo. Com o uso de um inibidor e um ativador da via, foi possível modular a atividade de ERK antes e depois da adição do quimioterápico. Os resultados demonstram que durante o tratamento com temozolomida (TMZ), as células de todas as populações sofreram reduções em seus níveis de variância de atividade ERK, com exceção do grupo em que a via foi ativada previamente. Após 10 dias, em resposta a um retratamento com TMZ, o comportamento da atividade de ERK nas células permaneceu estável e mais heterogêneo, demonstrando uma adaptação da população em relação aos efeitos do quimioterápico. Embora alguns grupos tenham apresentado um aumento na heterogeneidade de sinalização de ERK nos dias subsequentes ao retratamento, os níveis de proliferação celular se mantiveram semelhantes para todas as populações, independente da combinação de drogas. Ademais, a proporção de células senescentes aumenta após o retratamento, atingindo cerca de 70% de cada população contra 30% presente no primeiro tratamento. Em suma, o tratamento quimioterápico com TMZ influencia na heterogeneidade da sinalização de ERK em células tumorais, e modulações nessa via podem reforçar ou atenuar esses comportamentos.

Palavras-chave: Via de sinalização de ERK; Glioblastoma; Temozolomida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 OBJETIVOS	9
1.1.1 Objetivo geral	9
1.1.2 Objetivos específicos	9
2. METODOLOGIA	10
2.1 LINHAGENS CELULARES	10
2.2 MARCAÇÃO FLUORESCENTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO ERK	10
2.3 HOMOGENEIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE SINALIZAÇÃO DE ERK	11
2.4 IMAGENS E QUANTIFICAÇÕES.....	12
2.5 DESFECHOS CELULARES APÓS O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO ...	13
3. RESULTADOS.....	13
3.1 DINÂMICA E HOMOGENEIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE ERK EM CÉLULAS TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA	13
3.2 RESPOSTAS DE SINALIZAÇÃO DE ERK AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	17
3.3 DESFECHOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO.....	20
3.4 EFEITOS DO RETRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NA SINALIZAÇÃO DE ERK EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA	22
4. DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	29
5.1 PERSPECTIVAS.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

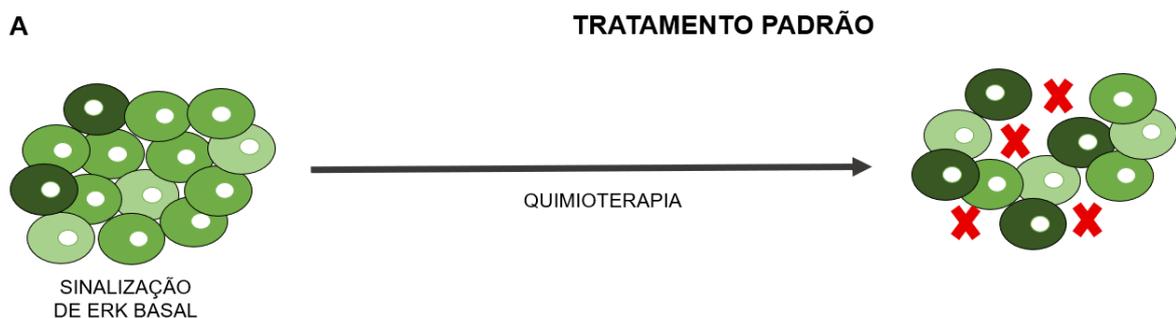
O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor cerebral maligno mais comum, sendo caracterizado por um elevado grau de proliferação e invasão celular (OSTROM et al., 2021). O tratamento padrão para esse tumor consiste na combinação de cirurgia, ciclos de radioterapia e quimioterapia com temozolomida (TMZ), um agente alquilante de DNA que induz a morte celular (LEE, 2016). Contudo, a eficácia do tratamento é limitada devido a quimiorresistência apresentada pelos pacientes, o que torna as taxas de mortalidade elevadas e a sobrevida média baixa (OSTROM, et al., 2021; LEE, 2016). Além disso, sabe-se que o GBM apresenta uma grande heterogeneidade intratumoral, ou seja, células de um mesmo tumor exibem fenótipos distintos, sendo essa uma característica relacionada com menor sobrevivência (PATEL et al, 2014). Nesse sentido, é fundamental compreender como os fenótipos heterogêneos impactam no destino final das células tumorais de GBM e como controlá-los, a fim de encontrar recursos benéficos para o tratamento desse câncer.

A heterogeneidade pode ser representada por diversos níveis e ter diferentes origens em células tumorais individuais (LENZ et al., 2022). Nesse sentido, células que são similares a nível de genoma sofrem progressivos aumentos de variabilidade em seus níveis de epigenoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma e sinaloma, originando diversos fenótipos celulares (LENZ et al., 2022). Assim, uma população celular heterogênea ocupa uma diversa e considerável área fenotípica, o que contribui para comportamentos e desfechos distintos nas células tumorais (LENZ et al., 2022). Sendo assim, a heterogeneidade do câncer está muito relacionada com impactos no tratamento da doença, visto que essas alterações nas células podem levar ao desenvolvimento de resistência a quimioterapia (LENZ et al., 2022). Em glioblastoma, por exemplo, a análise fosfoproteômica de células únicas demonstrou que a resistência aos inibidores de mTOR ocorre de maneira não-genética através da religação da via de sinalização, que regula processos de proliferação, autofagia e apoptose celular (WEI et al., 2016). Assim sendo, controlar a capacidade de geração de heterogeneidade pode reduzir o espaço fenotípico ocupado pelas células tumorais, provocando melhores respostas celulares (LENZ et al., 2022).

Uma via de sinalização importante na regulação de processos celulares é a das proteínas quinases ativadas por mitógenos – MAPKs, composta por famílias de proteínas que transmitem sinais do meio extracelular para o núcleo celular (LAVOIE;

GAGNON; THERRIEN, 2020). Entre elas, têm-se via da quinase regulada pela sinalização extracelular (*extracellular signal-regulated kinase - ERK*), cuja cascata de sinalização envolve as proteínas RAS, RAF e MEK, que posteriormente fosforila ERK e propicia a transcrição de genes específicos que regulam respostas celulares de proliferação, diferenciação e sobrevivência (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020). Devido a sua atuação em funções de crescimento celular, desregulações na via da ERK estão relacionadas com a tumorigênese e o desenvolvimento de câncer (MAIK-RACHLINE; HACOHEN-LEV-RAN; SEGER, 2019).

A ativação da sinalização de ERK através da estimulação de receptores purinérgicos promove a proliferação celular em glioblastoma, enquanto a inibição da via está relacionada com níveis aumentados de autofagia e morte celular, revelando um importante papel dessa via na sobrevivência desse tumor (JACQUES-SILVA et al., 2004);(YANG et al., 2021). Além disso, o tratamento com TMZ promove uma redução da atividade da ERK, que resulta na inibição dos fenótipos oncogênicos de células de glioblastoma e releva potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da doença (WANG et al., 2016). Sendo assim, o objetivo deste trabalho é regular a heterogeneidade de células de glioblastoma em relação a via de sinalização de ERK, e, a partir de um fenótipo homogêneo, verificar as respostas celulares ao tratamento com TMZ (Fig. 1).



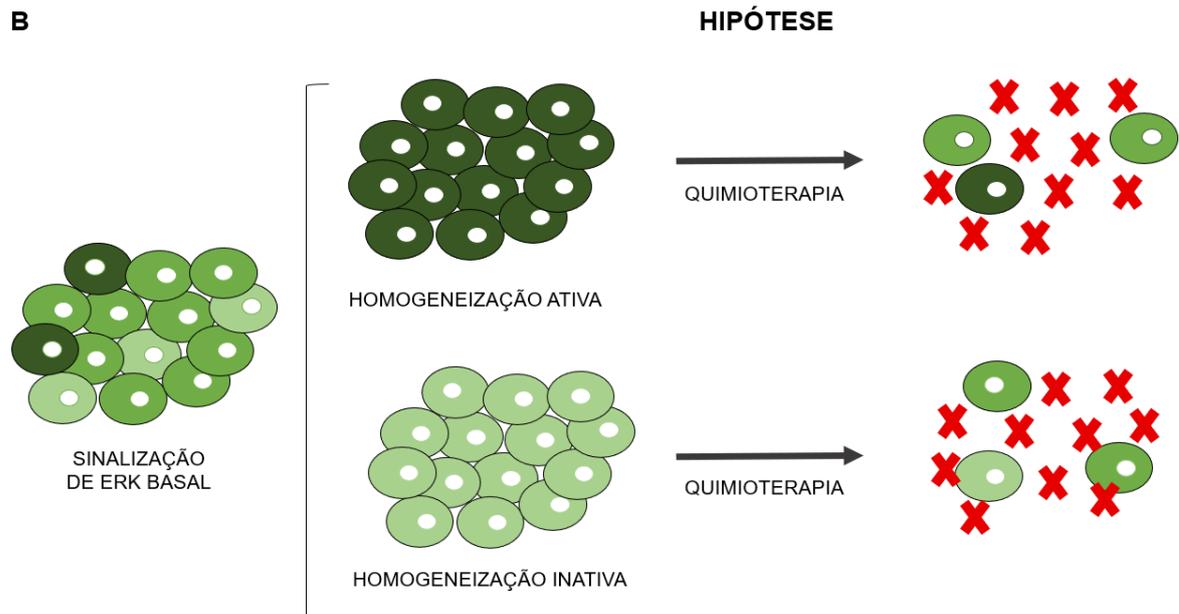


Figura 1. Hipótese do trabalho em comparação com o tratamento padrão de glioblastoma. (A) Tratamento quimioterápico padrão utilizado em glioblastoma multiforme, principalmente com o uso de TMZ. (B) Hipótese e objetivo do trabalho, no qual uma população celular com sinalização de ERK mais homogênea apresentaria melhores respostas ao tratamento quimioterápico. Marcações em vermelho indicam morte celular.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Reduzir o perfil heterogêneo de atividade de ERK em células tumorais de glioblastoma e investigar sua relação com respostas ao tratamento quimioterápico.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar a dinâmica de ativação da via de sinalização de ERK em linhagem tumoral de glioblastoma, em comparação a uma linhagem celular normal;
2. Gerar uma população celular homogênea em relação a sinalização de ERK a partir do uso de inibidores da via e alterações na concentração de soro fetal bovino na cultura celular;
3. Relacionar os fenótipos homogêneos com resultados celulares de morte e sobrevivência ao tratamento com temozolomida.

2. METODOLOGIA

2.1 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares de glioblastoma A172 e pulmonar normal MRC5 foram mantidas em meio DMEM *low glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37°C e 5% CO₂ em incubadora com umidade controlada.

2.2 MARCAÇÃO FLUORESCENTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO ERK

Para observar a ativação da via de sinalização de ERK nas células de ambas as linhagens, foi feita a expressão estável de um repórter de translocação de ERK quinase (KTR) (Addgene #90227), cuja sequência é composta pelo substrato da quinase, por um sítio de localização nuclear e um sítio de exportação, fusionados a uma proteína fluorescente (REGOT et al, 2014). Quando a ERK está ativa, ocorre a fosforilação do substrato, levando a supressão da atividade do sítio de localização nuclear e o aumento da atividade do sítio de exportação, que então desloca a proteína fluorescente para o citoplasma da célula. A partir da desfosforilação do substrato quando a via da ERK está inativa, ocorre a supressão do sítio de exportação e aumento da atividade do sítio de localização nuclear, fazendo com que a fluorescência retorne para o núcleo. Dessa forma, essa técnica permite acompanhar a atividade de ERK em células únicas através da translocação núcleo-citoplasmática da fluorescência verde. A sequência do KTR foi inserida ao genoma das células das linhagens A172 e MRC5 por transdução lentiviral. Essa técnica se inicia com a transfecção, processo no qual células empacotadoras receberão os componentes necessários para formar os lentivírus carregadores da sequência de interesse. O sobrenadante dessa cultura celular contendo a carga viral é recolhido e inserido nas células alvo por transdução, quando as membranas do lentivírus e das células são fusionadas e o material genético é liberado dentro da célula e será incorporado ao genoma. As células transduzidas foram tratadas com puomicina para se obter uma linhagem com expressão estável da proteína fluorescente. Além disso, as células tiveram seu núcleo marcado para segmentação das imagens com 53BP1 (Addgene #69531), que confere fluorescência vermelha e também indica focos de reparo ao DNA.

A sequência foi inserida ao genoma das células também por transdução lentiviral, já descrita anteriormente.

2.3 HOMOGENEIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE SINALIZAÇÃO DE ERK

Para a verificação da dinâmica de sinalização de ERK, as linhagens A172 e MRC5 foram plaqueadas, sendo cerca de 5.000 células por poço. Posteriormente, as populações foram tratadas com um inibidor e um ativador da via para modular os níveis de heterogeneidade. Para inibir a sinalização de ERK nas células, foi utilizado o fármaco trametinib, um inibidor alostérico de MEK, a MAPK imediatamente anterior à ERK. Já para ativar a via, as células sofreram alterações na concentração de soro fetal bovino, o qual contém fatores de crescimento que estimulam a sinalização de ERK através de fatores de crescimento. A linhagem celular de glioblastoma A172 foi dividida em dois grandes grupos: homogeneização pré-tratamento com TMZ e homogeneização pós-tratamento com TMZ, tendo cada uma delas um fenótipo de ativação da via da ERK, feito com a adição de 1mL de meio de cultivo celular contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), e um fenótipo de inibição de ERK feito com a adição de 20nM de TRAM.

Para as homogeneizações de pré-tratamento com TMZ, a população inativa foi tratada com 20nM de TRAM durante uma hora, tempo em que atinge sua menor atividade média. Já para a geração de uma população homogênea de ERK ativa, em que todas as células estão ativas, primeiro tratou-se novamente as células com 20nM de TRAM durante uma hora, para que todas partissem de um mesmo nível de ativação, seguido de uma adição de SFB, o qual possui fatores de crescimento que estimulam a ativação da via de sinalização de ERK. Posteriormente, para simular o tratamento quimioterápico de glioblastoma, todos os grupos foram tratados com 100uM de TMZ durante 3 horas. Em seguida, foi realizado o tratamento de homogeneização para os grupos pós-TMZ. Para o grupo de sinalização de ERK ativa, foi feita apenas a troca de 1mL do meio do cultivo celular para a adição de SFB, enquanto o grupo inativo recebeu 20nM de TRAM (Fig. 2).

Dez dias após o tratamento quimioterápico, todos os grupos foram retratados com TMZ para simular um novo ciclo de quimioterapia, sendo novamente 100 uM durante 3 horas. Ademais, a população de homogeneização pós-tratamento inativa

agora foi subdividida em 2 grupos: um recebeu o retratamento apenas com TMZ e outra recebeu mais uma vez ambos TMZ e TRAM (Fig. 2).

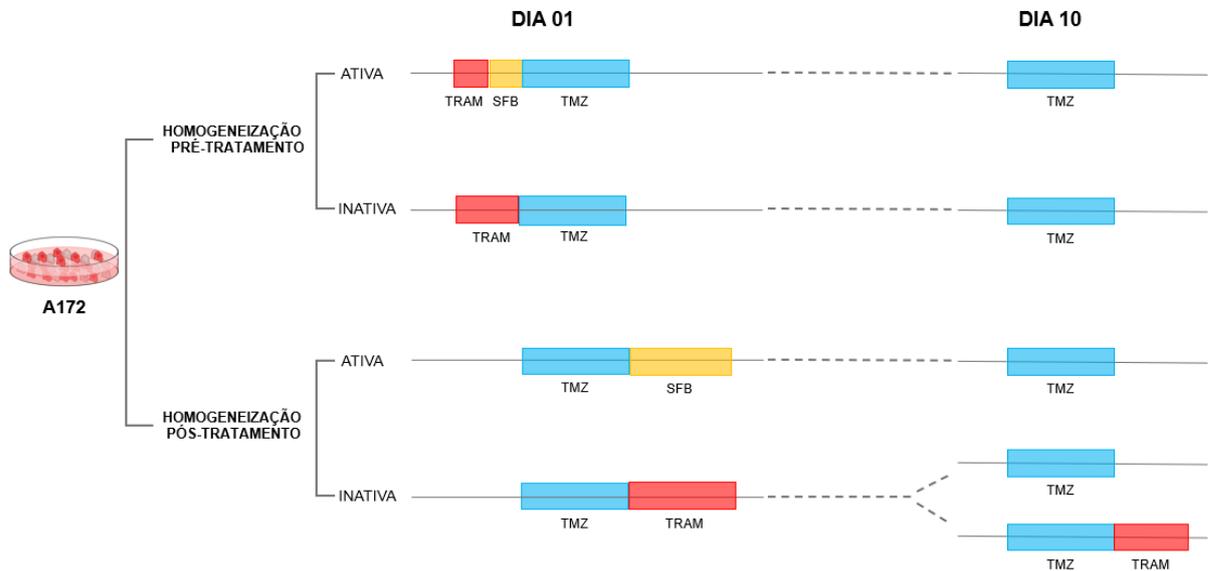


Figura 2. Esquema de tratamentos de homogeneização e quimioterapia para a linhagem celular de glioblastoma A172. TRAM, trametinib; TMZ, temozolomida; SFB, soro fetal bovino.

A resposta da sinalização de ERK foi avaliada através da translocação núcleo-citoplasmática da fluorescência, e a população celular foi acompanhada no aparelho Incucyte, o qual incuba as células e permite fotografar a cultura celular com e sem fluorescência de forma automatizada em períodos pré-determinado. Assim, foi possível estabelecer a dinâmica de sinalização de ERK em cada célula da população durante os intervalos de tempo.

2.4 IMAGENS E QUANTIFICAÇÕES

As fotografias de microscopia de fluorescência geradas durante os experimentos foram analisadas através do FORNMA, um *script* de programação em Python, que realiza a quantificação da fluorescência nas células únicas (Pereira et al., dados não publicados). Para isso, a marcação nuclear fluorescente com 53BP1 é utilizada para a segmentação das imagens, em que os núcleos são reconhecidos e marcados. Após, é realizada uma remoção de *background* nas imagens contendo a fluorescência verde do KTR-ERK para remover possíveis interferências na quantificação. A marcação nuclear é sobreposta nas células com marcação de ERK e

aumentada em 2,5 pixels, gerando um anel citoplasmático. Por fim, o nível de atividade da via da ERK em cada célula é determinado através da razão entre o valor da fluorescência do citoplasma pela fluorescência do núcleo.

2.5 DESFECHOS CELULARES APÓS O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Após a homogeneização do fenótipo de ERK, foi realizado o tratamento quimioterápico com temozolomida, visando observar os destinos de morte e sobrevivência nos diferentes perfis celulares. Novamente, as células foram acompanhadas no aparelho Incucyte e as fotos foram analisadas da mesma maneira descrita anteriormente. A análise de morte e sobrevivência celular foi realizada através do *Cumulative Population Doubling* (CPD), que se refere ao número de vezes em que as células da população dobraram desde o início do cultivo (SILVA et al, 2016). Além disso, a proporção de células em senescência foi identificada através da ferramenta de Análise Morfométrica Nuclear (do inglês *Nuclear Morphometric Analysis*, NMA), que identifica células com características de senescência, apoptose ou com irregularidades nucleares a partir da análise morfométrica nuclear (FILIPPI-CHIELA, 2012).

3. RESULTADOS

3.1 DINÂMICA E HOMOGENEIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE ERK EM CÉLULAS TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA

Para o desenvolvimento dos experimentos, foram utilizadas células da linhagem celular de glioblastoma A172 e da linhagem pulmonar normal MRC5 marcadas estavelmente com a fluorescência verde do KTR da ERK (Fig. 3). Para se obter o estado basal de atividade de ERK nas células antes do início dos tratamentos, as populações foram fotografadas a cada 10 minutos durante 3 horas, no aparelho Incucyte.

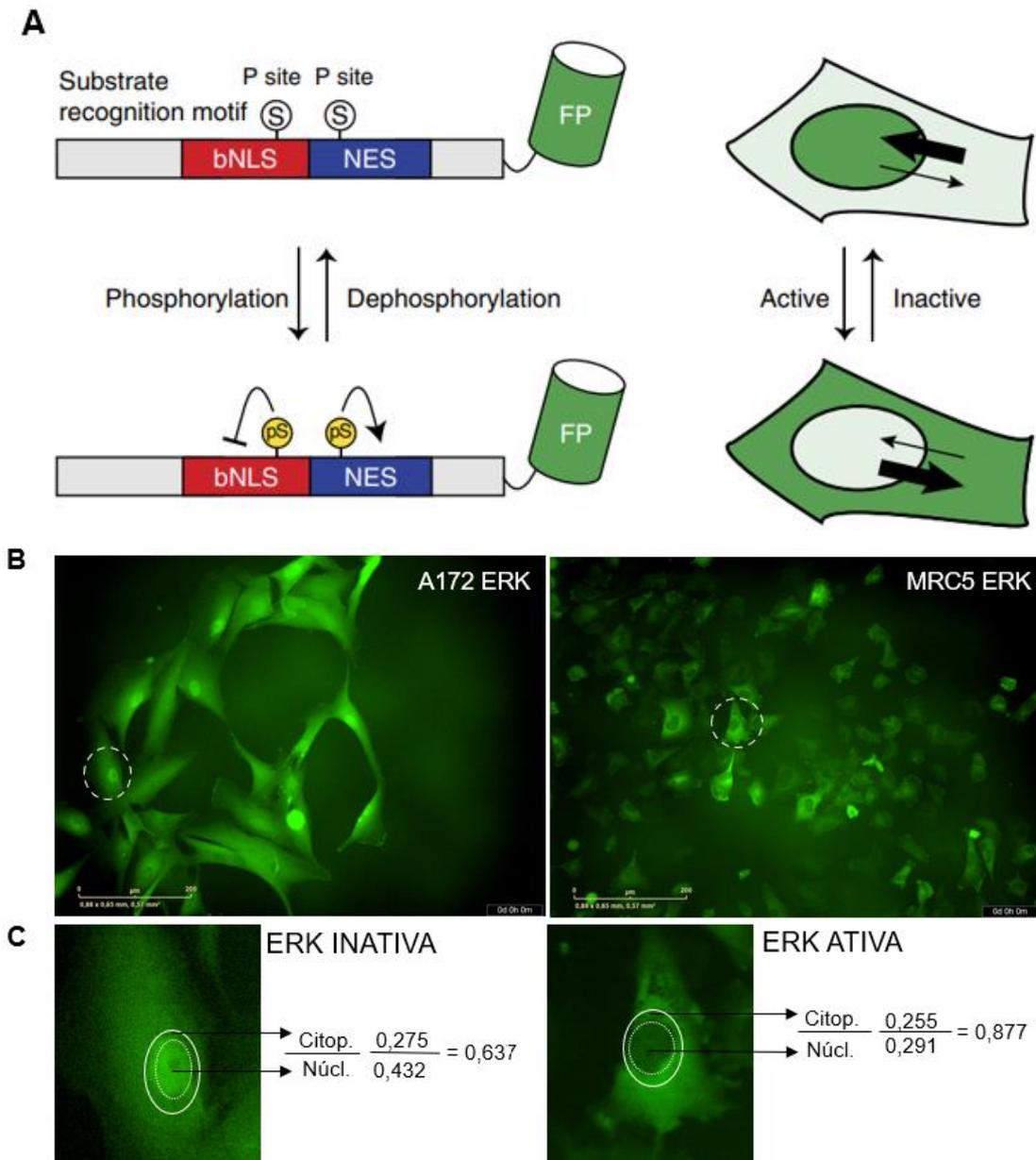
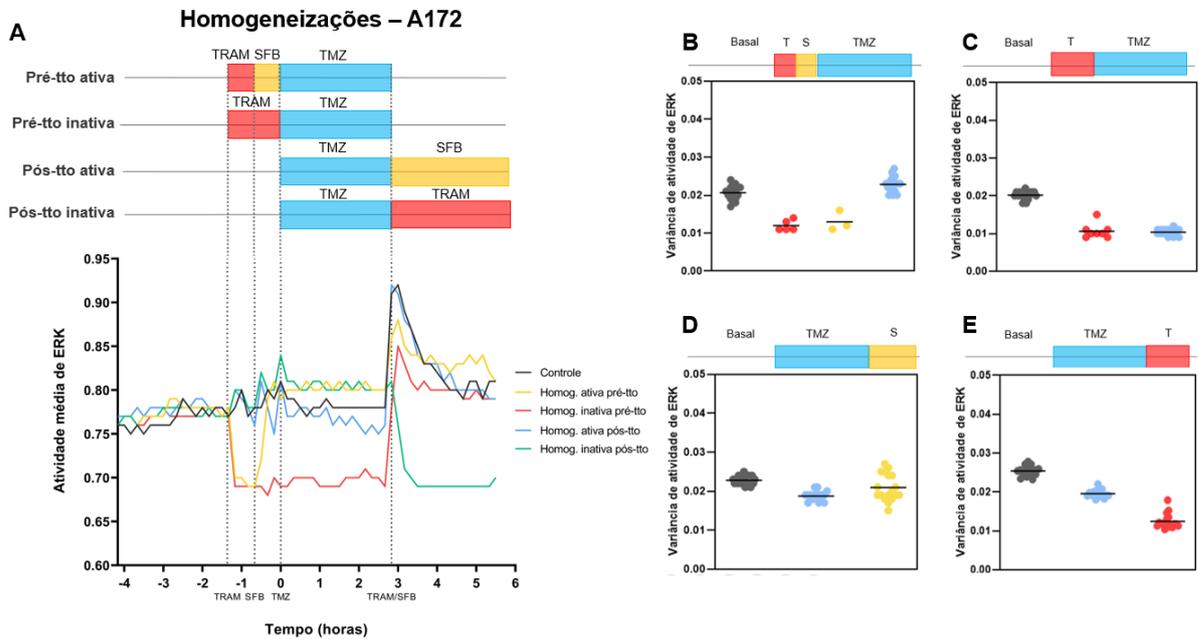


Figura 3. Repórter de translocação de ERK quinase (KRT). (A) Sequência do KTR-ERK (KUDO et al, 2018) com sinais de localização nuclear e exportação nuclear, fusionados a uma proteína fluorescente. (B) Marcação fluorescente nas linhagens A172 de glioblastoma e MRC5 pulmonar. (C) Exemplo de quantificação da atividade de ERK através da razão entre a medida da fluorescência do citoplasma e fluorescência do núcleo em uma célula com sinalização inativa (esquerda) e ativa (direita). bNLS, sinal de localização nuclear bipartido; NES, sinal de exportação nuclear; Citop. citoplasma; Núcl. núcleo.

Em seguida, foi verificada a dinâmica de sinalização de ERK em resposta ao tratamento com trametinib (TRAM), um inibidor alostérico de MEK, e temozolomida (TMZ), quimioterápico padrão no regime terapêutico de glioblastoma (Fig. 4A). A fim de verificar os níveis de homogeneizações alcançados através dos tratamentos de homogeneização, a variância de sinalização de ERK entre as células de cada

população foi analisada. Nesse sentido, quanto menor a variância, mais homogênea está a atividade de sinalização de ERK naquele grupo e vice-versa. Para o grupo de homogeneização pré-tratamento ativa, nota-se a redução da variância durante o período de tratamento com TRAM e SFB, seguida de um aumento da heterogeneidade ao longo do tratamento com TMZ (Fig. 4B). Por outro lado, na homogeneização pré-tratamento inativa, a variância diminui consideravelmente com a adição de TRAM e se mantém homogênea durante o tratamento com TMZ (Fig 4C). Para as populações que foram homogeneizadas após o tratamento com TMZ, nota-se o aumento da variância para a homogeneização ativa com SFB e redução para o grupo inativo que recebeu TRAM (Fig. 4D, 4E).



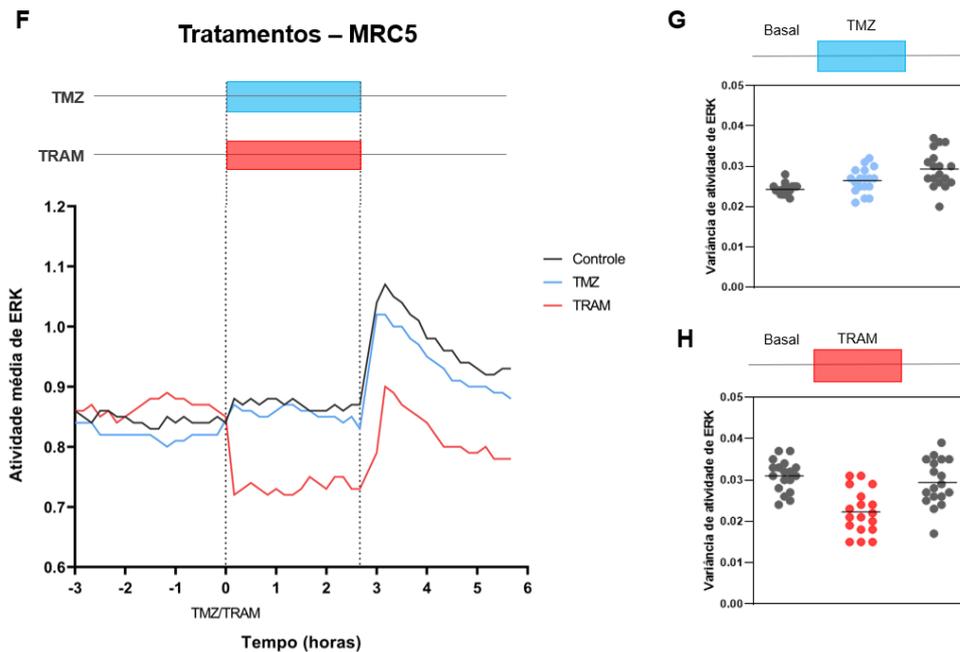


Figura 4. Sinalização de ERK em resposta aos tratamentos com TRAM e TMZ. (A) Dinâmica de sinalização de ERK em glioblastoma em resposta aos tratamentos de homogeneização. (B-C-D-E) Variâncias de atividade de ERK em resposta a cada homogeneização. (F) Dinâmica de sinalização de ERK em células pulmonares normais em resposta aos tratamentos com TMZ e TRAM. (G-H) Variâncias de atividade de ERK em resposta aos tratamentos com TMZ e TRAM. Todos os grupos foram fotografados a cada 10 minutos durante todos os tratamentos. TRAM/T, trametinib; TMZ, temozolomida; S, soro fetal bovino. N = 1.

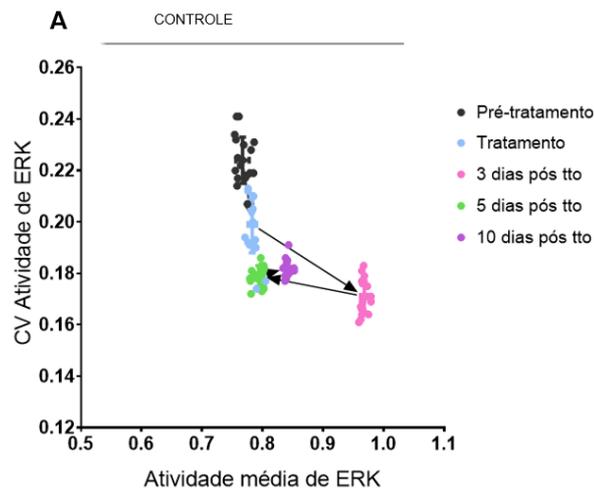
Para comparar os comportamentos de sinalização de ERK com a linhagem normal, células de MRC5 foram tratadas 20nM de TRAM ou 100uM de TMZ, ambos por 3 horas. Durante o tratamento inibitório, é possível notar a diminuição da atividade de ERK, enquanto durante a adição de TMZ a atividade se mantém constante (Fig. 4F). Na análise dos níveis de variância, a população de TMZ demonstra um aumento de heterogeneidade após o tratamento, enquanto o tratamento com TRAM gerou uma redução da variabilidade durante a ação do inibidor (Fig. 4G, 4H). Os picos de ativação de ERK ocorridos próximos a 3 horas em ambas linhagens se referem a troca do meio de cultivo celular realizada tanto nos grupos tratados para a retirada do TMZ e TRAM, quanto no grupo controle para padronização das respostas (Fig. 4A, 4F).

Por fim, através dos tratamentos com TRAM antes da adição do TMZ, foi possível garantir que a população tumoral inativa estava com sinalização de ERK homogênea durante o período de tratamento quimioterápico. Além disso, a homogeneização inativa pós-tratamento com TMZ também foi bem sucedida, uma vez que as células responderam ao efeito do TRAM e reduziram sua atividade e variância

de sinalização de ERK (Fig. 4A, 4C). Já as respostas de atividade de ERK da linhagem normal se mostraram similares aos da linhagem tumoral durante o tratamento com TMZ e TRAM (Fig. 4F). Contudo, o tratamento com TRAM não gerou uma resposta homogênea de inibição para essa população, uma vez que os níveis de variância permanecem altos (Fig. 4H).

3.2 RESPOSTAS DE SINALIZAÇÃO DE ERK AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Para a verificação dos comportamentos de sinalização de ERK nos dias subsequentes ao tratamento quimioterápico com TMZ, as células foram mantidas no aparelho Incucyte e acompanhadas por 10 dias, sendo fotografadas em momentos específicos para a quantificação da atividade da ERK. A partir dos valores obtidos durante esse período, foi calculado o coeficiente de variância (CV) da atividade de ERK, obtido através da razão entre o desvio padrão e a média da população em cada tempo analisado, ou seja, corresponde a variabilidade dos dados em relação à média. Dessa forma, quanto menor o CV, mais homogêneo é o conjunto de dados e, neste caso, mais homogênea é a sinalização de ERK na população.



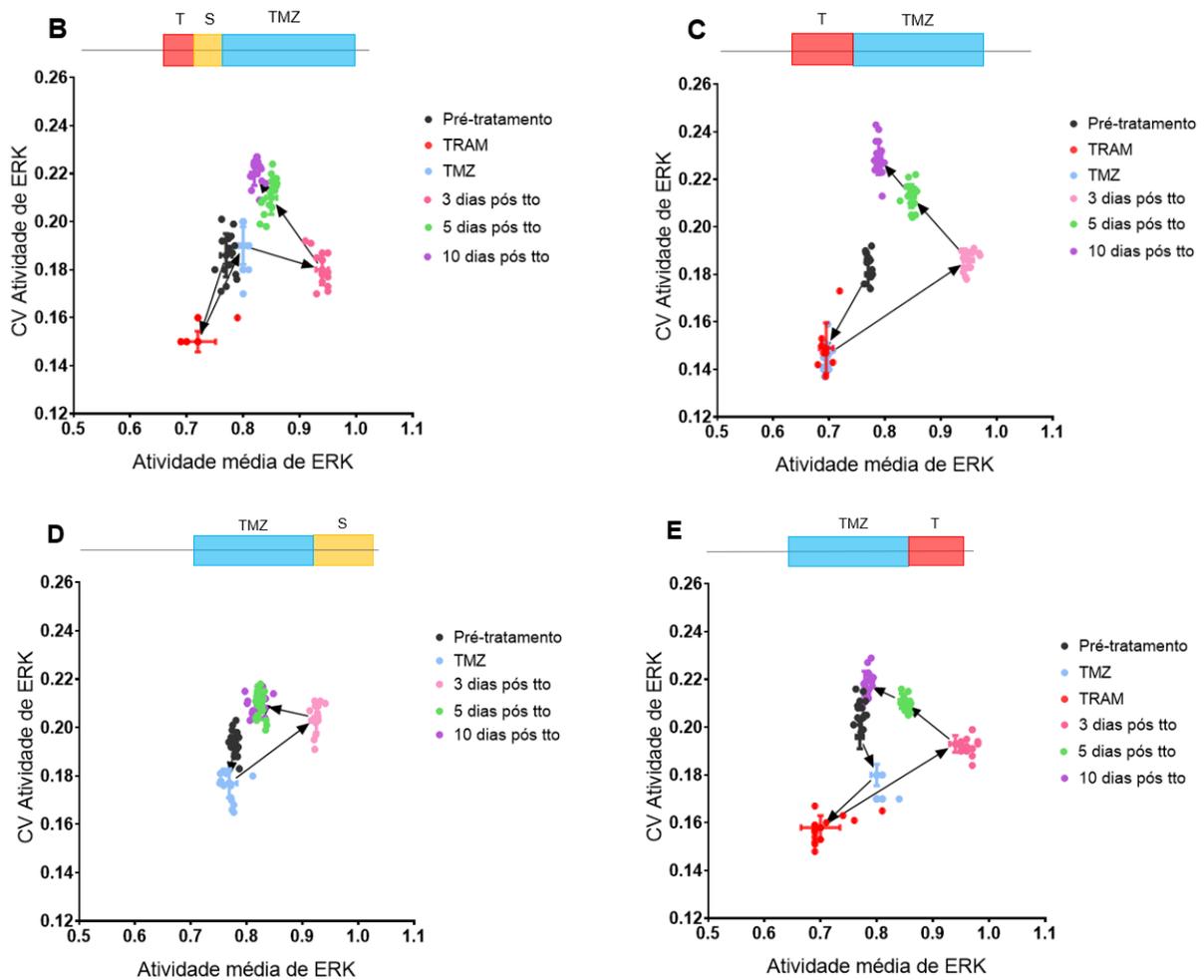


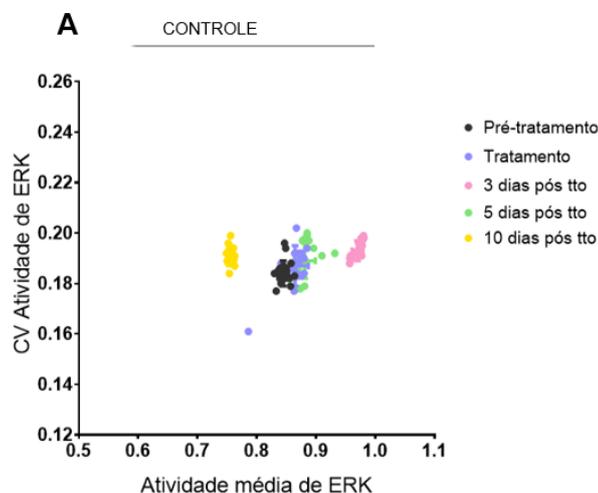
Figura 5. Coeficientes de variância da sinalização de ERK em resposta ao tratamento quimioterápico em células de glioblastoma. (A) Controle. (B) Homogeneização pré-tratamento ativa. (C) Homogeneização pré-tratamento inativa. (D) Homogeneização pós-tratamento ativa. (E) Homogeneização pós-tratamento inativa. Cada período analisado consiste em fotos a cada 10 minutos durante 3 horas. As flechas indicam a ordem temporal dos resultados de CV atingidos. TMZ, temozolomida; TRAM/T, trametinib; S, soro fetal bovino; Tto; tratamento; CV, coeficiente de variância.

O grupo tumoral que passou pela homogeneização pré-tratamento ativa apresentou queda no CV durante o tratamento com TRAM, porém alguns pontos dispersos apresentam maior média de atividade e CV, correspondendo ao período de adição de soro fetal bovino para a estimulação da via (Fig. 5B). Durante o tratamento quimioterápico, essa população atingiu um CV similar ao período de pré-tratamento, tendo também um aumento nos dias subsequentes, mas permanecendo estável entre o quinto e décimo dia (Fig. 5B). O grupo de homogeneização pré-tratamento inativa, por outro lado, atingiu um CV bastante baixo durante o tratamento com TRAM, demonstrando a homogeneização da população, que permaneceu estável nesse

fenótipo durante o tratamento com TMZ. Posteriormente, entre o terceiro e décimo dia após a quimioterapia, as células atingiram gradativamente maiores CVs, ficando, portanto, mais heterogêneas em relação à atividade de ERK (Fig. 5C).

A respeito dos grupos de homogeneização pós-tratamento, a população ativa apresentou uma homogeneização da sinalização de ERK durante o tratamento com TMZ, porém se torna mais heterogênea ao longo dos dias subsequentes, atingindo uma estabilidade entre o quinto e décimo dia (Fig. 5D). Já para o grupo inativo, pode-se notar a diminuição do CV durante a adição do TMZ, seguido de uma homogeneização ainda maior durante o tratamento com TRAM, que reduziu também a atividade média da via. Nos dias subsequentes, a população sofreu gradativos aumentos de heterogeneidade, com seu máximo no décimo dia pós-tratamento com TMZ. (Fig. 5E).

A fins de comparação, o CV da atividade de ERK da linhagem MRC5 também foi observado. Nesse caso, o tratamento com TMZ não causou quedas no CV como visto na linhagem tumoral, aqui a heterogeneidade se manteve constante ao estado de pré-tratamento. Já nos dias subsequentes, a população se tornou mais heterogênea, demonstrado pelo aumento do CV, um comportamento notado também na linhagem tumoral (Fig. 6B). Ademais, quando tratada com TRAM, a linhagem normal apresentou uma diminuição de sua atividade média, todavia seu nível de CV demonstrou um comportamento distinto ao verificado na linhagem tumoral. Aqui, o nível de heterogeneidade durante o TRAM foi muito maior, indicando que há células que não inativaram sua sinalização de ERK (Fig. 6C).



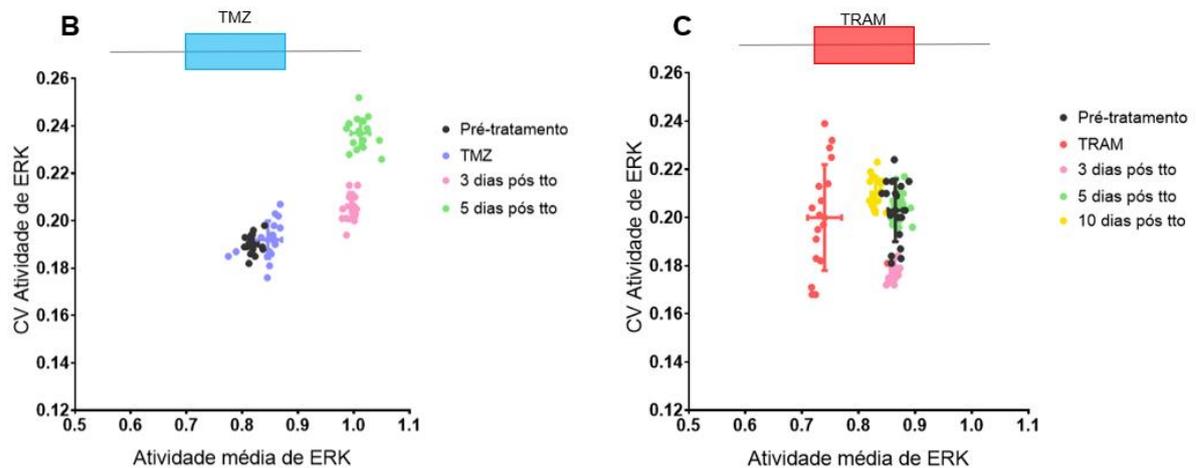


Figura 6. Coeficientes de variância de sinalização de ERK em resposta aos tratamentos na linhagem MRC5. (A) Controle. (B) Tratamento com 100uM de TMZ. (C) Tratamento com 20nM de TRAM. Cada ponto no gráfico refere-se a média de atividade de ERK e o coeficiente de variância de todas as células da população em um determinado tempo. Cada período analisado consiste em fotos a cada 10 minutos durante 3 horas. No décimo dia após o tratamento com TMZ todas as células estavam mortas. TMZ, temozolomida; TRAM, trametinib; Tto, tratamento; CV, coeficiente de variância.

3.3 DESFECHOS DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Para verificar a relação entre os fenótipos de sinalização de ERK e os desfechos de proliferação celular, a quantidade de células em cada população foi contada uma vez ao dia ao longo de todo o experimento. Ao final, foi calculado o *Cumulative Population Doubling* (CPD), que indica o número de vezes em que as células da população dobraram de tamanho desde o início do cultivo, refletindo assim os níveis de proliferação e, indiretamente, de morte celular. Em geral, os resultados da linhagem tumoral A172 foram bastante similares, não apresentando variações na proliferação celular independente do tipo de homogeneização que a população sofreu (Fig. 7).

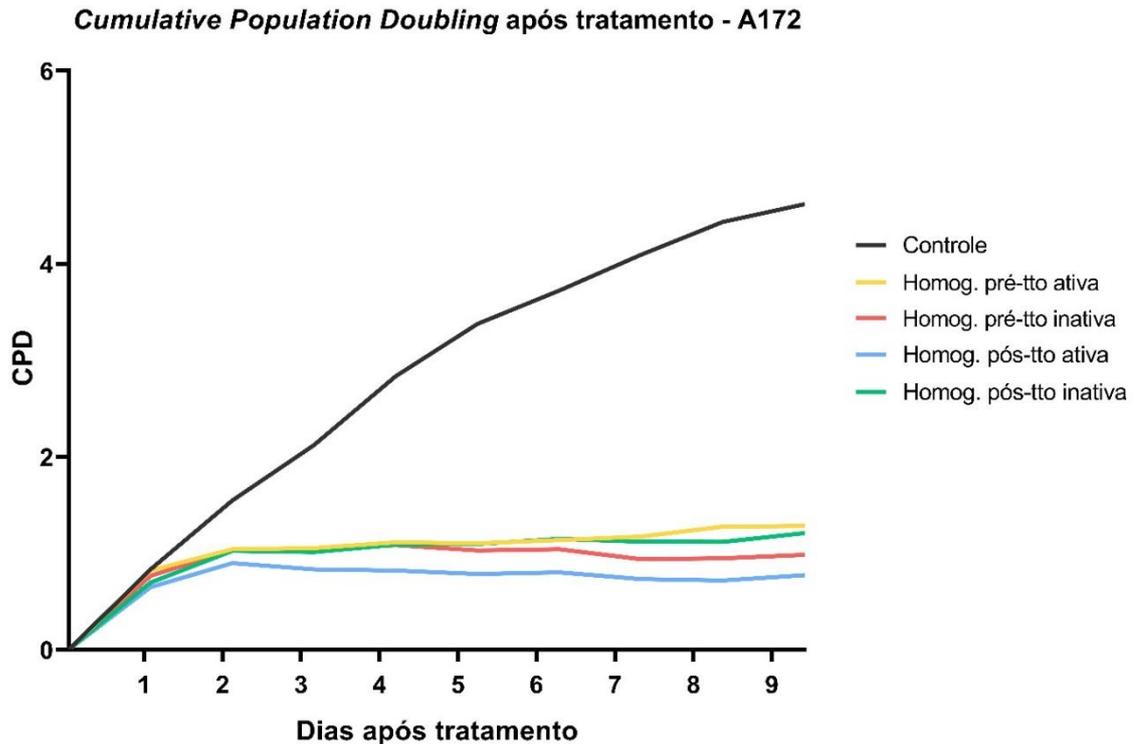


Figura 7. *Cumulative Population Doubling* (CPD) para os diferentes grupos a partir do tratamento com TMZ e dias subsequentes, refletindo os níveis de proliferação. Homog., homogeneização; Pré-tto, pré-tratamento.

Ademais, o CPD foi calculado também para os desfechos da linhagem MRC5. Um dado interessante demonstrado por essa avaliação é que o TRAM sozinho não possui efeito citotóxico sobre as células, uma vez que essa população proliferou de maneira muito similar ao controle (Fig. 8, linha vermelha). Contudo, o tratamento com TMZ causou uma rápida resposta de morte celular, não restando células sobreviventes ao final do décimo dia pós-tratamento (Fig. 8, linha azul). Portanto, nota-se que o efeito do TMZ na proliferação celular varia entre uma linhagem tumoral e normal. Para a população MRC5, não restaram células sobreviventes ao final do décimo dia pós tratamento, um comportamento muito diferente do verificado na linhagem tumoral de glioblastoma, no qual algumas células resistem e estão presentes neste período.

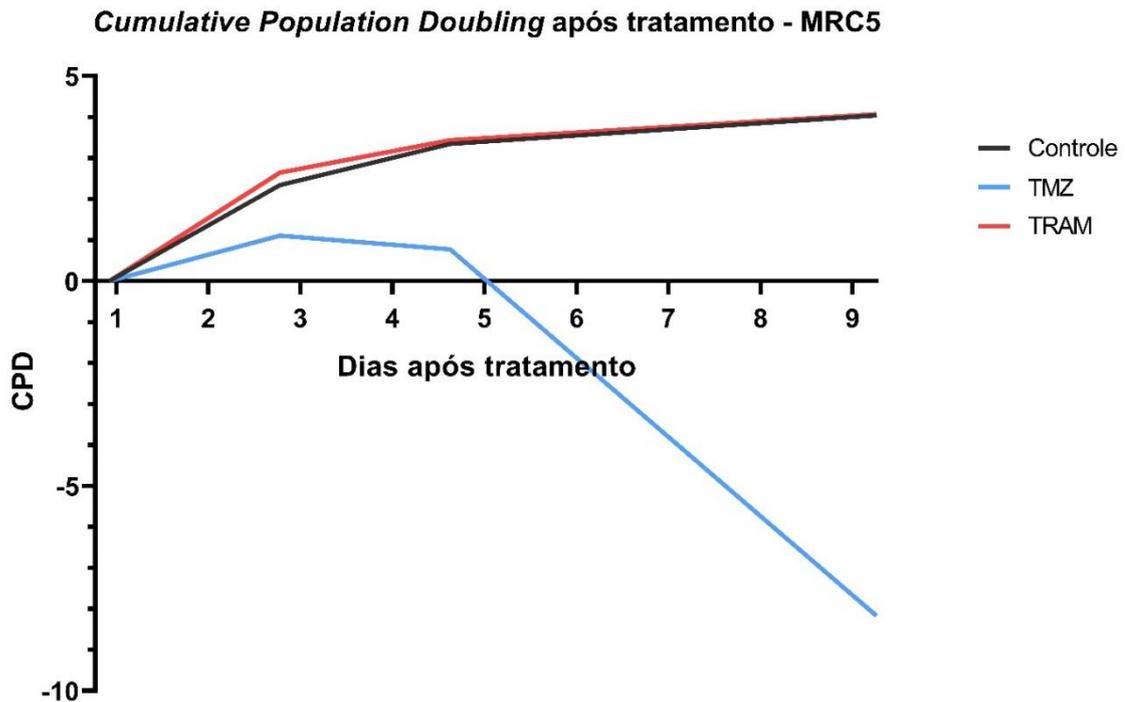


Figura 8. Cumulative Population Doubling (CPD) para as populações da linhagem normal MRC5 a partir do tratamento com TMZ e dias subsequentes, refletindo os níveis de proliferação celular. TMZ, temozolomida; TRAM, trametinib.

3.4 EFEITOS DO RETRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO NA SINALIZAÇÃO DE ERK EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA

Até o momento, a análise dos resultados mostrou comportamentos distintos de sinalização de ERK entre populações celulares que foram homogeneizadas antes e após o tratamento com TMZ. Para aprofundar essas observações e, sabendo que na clínica médica a quimioterapia realizada pelos pacientes ocorre em ciclos, as células foram retratadas com TMZ dez dias após o primeiro tratamento. Ademais, a população de homogeneização pós-tratamento inativa agora foi subdividida em 2 grupos, sendo que um deles recebeu o retratamento apenas com TMZ enquanto o outro recebeu mais uma vez ambos TMZ e TRAM. Para diferenciação, essas populações serão chamadas homogeneização pós-tratamento inativa (Rtto TMZ) e homogeneização pós-tratamento inativa (Rtto TMZ e TRAM) (Fig. 1). Da mesma forma, o coeficiente de variância foi observado até o quinto dia pós-retratamento, a fim de verificar como seriam os comportamentos de sinalização de ERK de cada população em resposta a um retratamento quimioterápico.

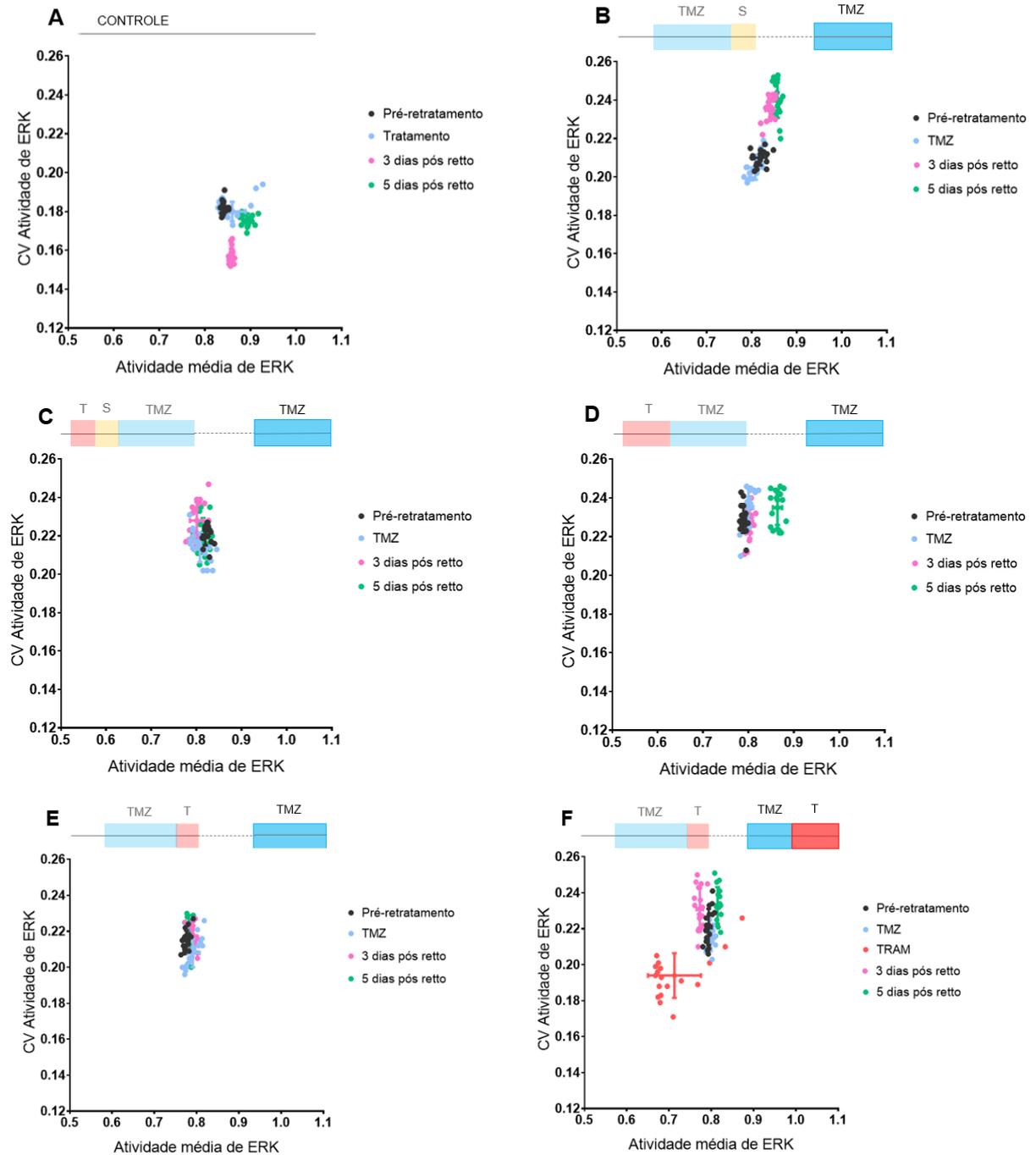


Figura 9. Coeficiente de variância de sinalização de ERK após o retratamento com TMZ. (A) Controle. (B) Homogeneização pós-tratamento ativa retratada com TMZ. (C) Homogeneização pré-tratamento ativa retratada com TMZ. (D) Homogeneização pós-tratamento inativa retratada com TMZ. (E) Homogeneização pós-tratamento inativa retratada com TMZ e TRAM. Cada ponto no gráfico refere-se a variância de todas as células da população em um determinado tempo. Cada período analisado consiste em fotos a cada 10 minutos durante 3 horas. Retto, retratamento; TMZ, temozolomida; TRAM, trametinib; CV, coeficiente de variância.

Uma importante característica observada foi que as reduções do coeficiente de variância durante o tratamento com TMZ ocorreram apenas durante a primeira adição da droga (Fig. 5). Agora, durante o retratamento, a sinalização de ERK de todas as populações se manteve estável e muito similar à condição de pré-retratamento (Fig. 9). Nos dias subsequentes ao retratamento, a heterogeneidade de sinalização de ERK também permaneceu estável para os grupos, com exceção da população de homogeneização pós-tratamento ativa, que continuou apresentando aumentos gradativos de heterogeneidade até o último dia.

O grupo de homogeneização pós-tratamento inativa (Rtto TMZ e TRAM) apresentou uma redução em seu CV em resposta a inibição com TRAM, demonstrando um fenótipo de sinalização de ERK mais homogêneo (Fig. 9F). Não obstante, essa homogeneização foi menos eficiente do que a registrada durante o primeiro tratamento com TRAM (Fig. 5), demonstrando uma mudança na sensibilidade dessa população ao efeito inibitório da atividade de ERK. Os dados de variância para esses grupos durante o retratamento não demonstraram alterações significativas. Somente o grupo de homogeneização pré-tratamento inativa e homogeneização pós-tratamento ativa apresentaram aumentos de heterogeneidade no quinto dia após o retratamento com TMZ (Fig. 10A, 10B).

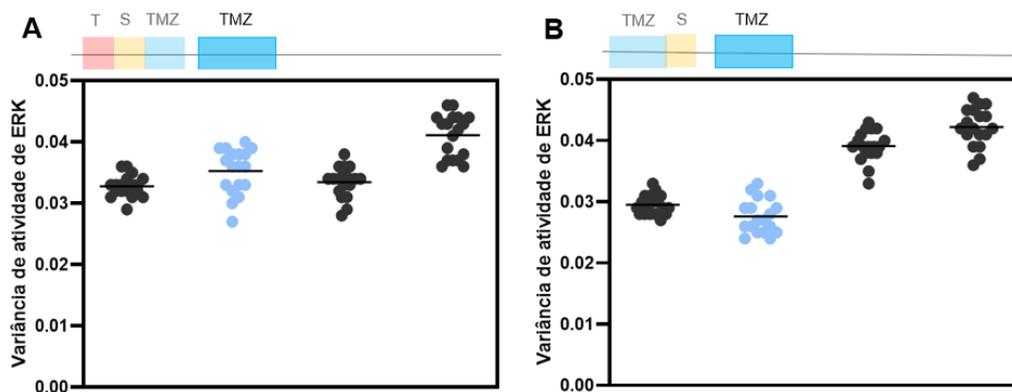


Figura 10. Variância de sinalização de ERK entre células de glioblastoma em resposta ao retratamento quimioterápico com TMZ. (A) População de homogeneização pré-tratamento ativa retratada com TMZ. (B) População de homogeneização pós-tratamento ativa retratada com TMZ. Cada ponto no gráfico refere-se a variância de todas as células da população em um determinado tempo. Cada período analisado consiste em fotos a cada 10 minutos durante 3 horas. TMZ, temozolomida.

Para analisar os níveis de proliferação celular em resposta ao retratamento quimioterápico, o CPD foi novamente calculado para as populações. Os

comportamentos das populações se mantiveram semelhantes ao que já havia acontecido após o primeiro tratamento, sem grandes diferenças entre um grupo e outro, porém agora os níveis de proliferação atingiram valores ainda menores (Fig. 11).

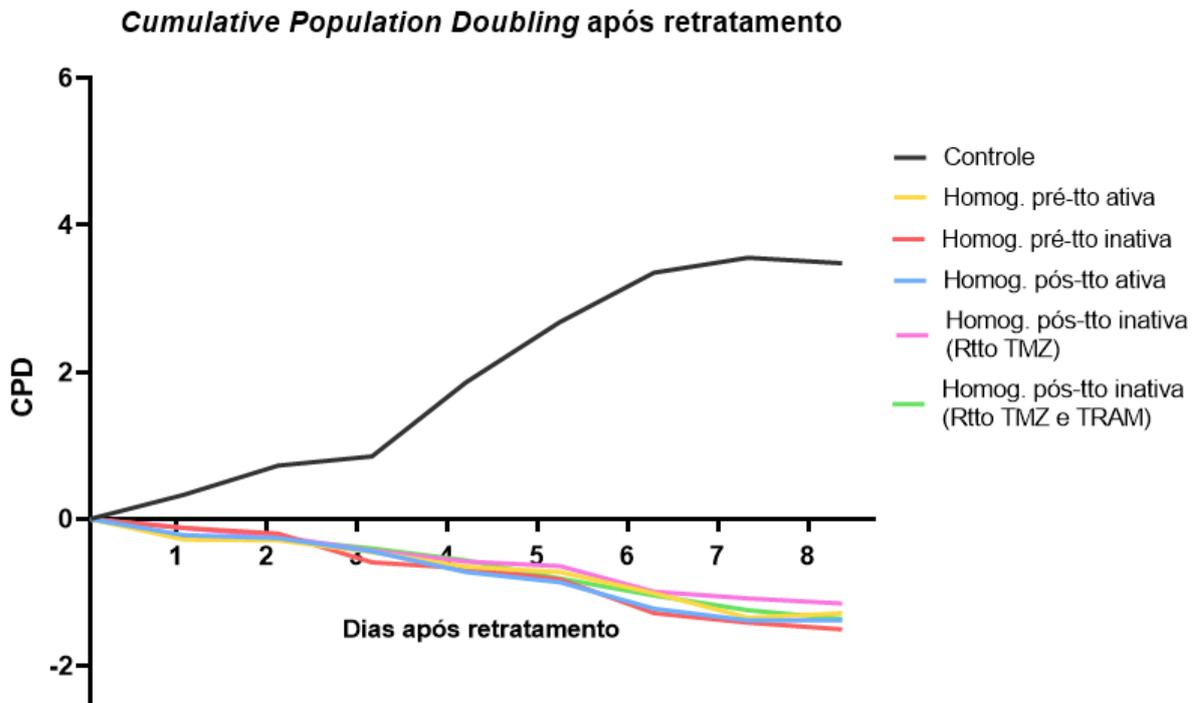


Figura 11. *Cumulative Population Doubling* (CPD) para os diferentes grupos a partir do retratamento com TMZ e dias subsequentes, refletindo os níveis de proliferação das células de glioblastoma. Homog., homogeneização; Tto, tratamento; TMZ, temozolomida; TRAM, trametinib.

O estresse gerado pela exposição ao tratamento quimioterápico pode desencadear o processo de senescência celular, no qual as células ficam incapazes de proliferar e geram uma parada na progressão do tumor (COLLADO, M; SERRANO, M, 2010). Nesse sentido, as células de cada população foram analisadas após o quinto dia de cada tratamento com TMZ através da ferramenta de Análise Morfométrica Nuclear (do inglês *Nuclear Morphometric Analysis*, NMA), que identifica a proporção de células em senescência, apoptose ou com irregularidades nucleares a partir da morfologia nuclear (FILIPPI-CHIELA, 2012).

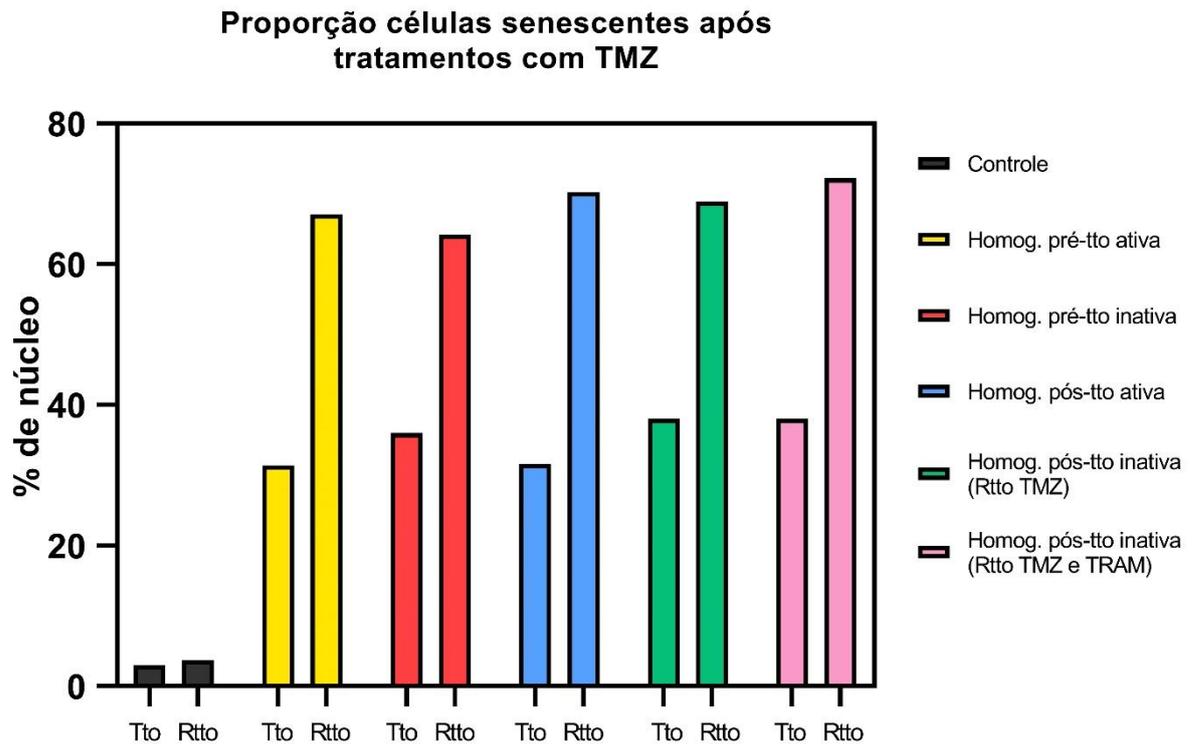


Figura 12. Análise Morfométrica Nuclear (NMA) para a identificação da proporção de células senescentes nas populações de glioblastoma após o tratamento (Tto) e retratamento (Rtto) quimioterápico com TMZ. Homog., homogeneização.

Com base nos resultados, novamente nota-se que os tratamentos com TMZ geram respostas muito similares entre os grupos, independente de seu estado de homogeneização. Contudo, uma diferença vista aqui é que a proporção de células senescentes, embora iguais entre os grupos, aumenta após o retratamento com TMZ. Sendo assim, no quinto dia após o primeiro tratamento, a proporção de células senescentes é de cerca de 30-35%, enquanto que após o retratamento essa proporção aumenta para 70% das células das populações (Fig. 12).

Por fim, os resultados obtidos diferem-se da hipótese estabelecida (Fig. 1). Nas condições testadas, a homogeneização de sinalização de ERK não parece impactar os desfechos das células tumorais de glioblastoma, as quais mantêm sua proliferação muito similar independente da combinação de tratamento que receberam (Fig. 13).

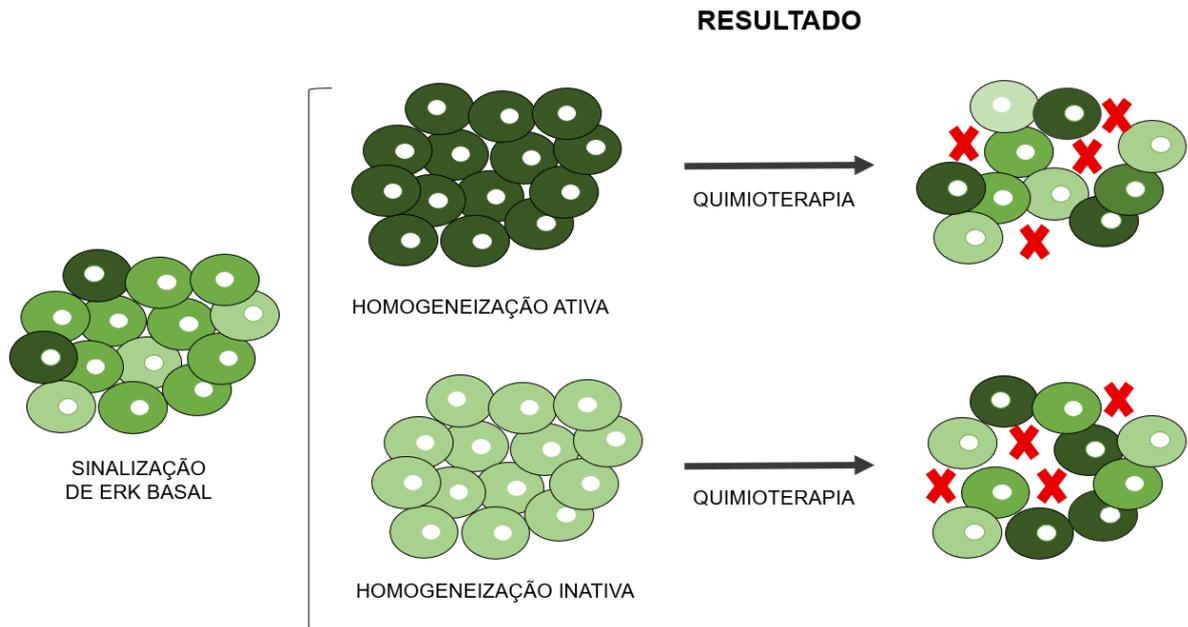


Figura 13. Resultado obtido no trabalho, no qual se verificou um aumento da heterogeneidade de sinalização de ERK após a quimioterapia com TMZ e os níveis de proliferação se mantiveram similares ao tratamento padrão (Fig. 1A).

4. DISCUSSÃO

Neste ano, Hanahan (2022) incluiu o desbloqueio de plasticidade fenotípica e a reprogramação epigenética não mutacional às Marcas do Câncer (do inglês *Hallmarks of Cancer*), um estudo que desde 2000 vem sendo alicerce para a compreensão do câncer e suas principais características. Referências como essa reforçam ainda mais a importância de um olhar minucioso sobre comportamentos de células tumorais e suas variações e adaptações em meio a diversas condições. Sendo assim, o presente trabalho traz resultados que refletem a plasticidade de sinalização de ERK em células de glioblastoma quando tratadas com TMZ, e como perturbações nessa via são capazes de modular essas respostas. Além disso, demonstra também a capacidade de reprogramação de sinalização dessas células, que durante o primeiro tratamento com TMZ sofrem uma homogeneização na atividade da via, porém em um retratamento permanecem estáveis em um nível maior de heterogeneidade.

Em 2016, um estudo demonstrou que a fosforilação de ERK é diminuída em células tumorais de glioma quando tratadas com TMZ, e que essa diminuição é acentuada ao se utilizar inibidores da via da ERK e atenuada quando a via é

estimulada (WANG, 2016). Nesse trabalho, foi demonstrado pela primeira vez que o tratamento com TMZ também diminui a variabilidade de sinalização de ERK em células tumorais de glioblastoma, possivelmente através de reduções em sua atividade média. Além disso, inibir a atividade da via reforça ainda mais a homogeneização causada pelo TMZ, sendo o contrário também verdadeiro: estimular a via da ERK atenua a ação do TMZ, resultando em uma população mais heterogênea e ativa.

Ao comparar os comportamentos de sinalização de ERK das células tumorais de glioblastoma com uma linhagem celular normal, nota-se que a inibição e homogeneização da sinalização de ERK gerada pelo TMZ ocorreu somente na linhagem tumoral. Nesse sentido, essa resposta parece ser linhagem-dependente, gerando mais impacto na atividade de ERK das células tumorais, enquanto que o posterior aumento da heterogeneidade ocorre para ambas linhagens, possivelmente em resposta ao dano de DNA causado pelo quimioterápico.

As homogeneizações do fenótipo de sinalização de ERK apresentaram pouco impacto na proliferação celular após os tratamentos com TMZ, uma vez que os níveis de todos os grupos testados permaneceram bastante similares durante todo o experimento. Esse resultado pode estar relacionado com a metodologia do trabalho, visto que o ambiente de cultivo *in vitro* 2D é pouco desafiador e possivelmente não demanda modulações robustas nos comportamentos celulares (MARJANOVIC, 2020). Sendo assim, essa análise seria melhor desenvolvida em modelos *in vivo*, nos quais o ambiente proporciona uma maior geração de comportamentos heterogêneos (MARJANOVIC, 2020).

O estresse gerado pelo tratamento quimioterápico pode desencadear processos de senescência celular na população tumoral, resultando em uma redução da progressão do tumor (COLLADO, M; SERRANO, M, 2010). Aqui, constatamos o aumento da proporção de células senescentes nas populações de glioblastoma, que aumenta gradativamente conforme ocorre o tratamento com temozolomida, sendo de 30% durante o primeiro tratamento e aumentando para 70% após o retratamento. Esse resultado corrobora e se relaciona com a redução nos níveis de proliferação celular indicadas através das análises de CPD, que também se tornam mais expressivas após o retratamento com a droga.

A relação entre o tratamento quimioterápico com TMZ e a via de sinalização de ERK impacta também a proliferação celular, possivelmente pela redução da atividade

da via (WANG, 2016). Nos presentes resultados, foi observada a homogeneização da atividade de ERK nas células em resposta ao tratamento com TMZ, e a velocidade de proliferação celular se mantém positiva e constante ao longo dos dias. Já durante o retratamento, as células se mantiveram em níveis mais elevados de heterogeneidade de sinalização de ERK, e a proliferação celular caiu mais rapidamente, atingindo níveis negativos.

Ademais, o tratamento quimioterápico com TMZ gerou um gradativo aumento da variabilidade de sinalização de ERK até o décimo dia subsequente, indicando que a população tumoral se tornou mais heterogênea para esse fenótipo. Em geral, a heterogeneidade intratumoral afeta parâmetros que impactam o prognóstico e a resposta terapêutica do câncer, contribuindo inclusive para o desenvolvimento de resistência ao tratamento (BURRELL et al, 2013). Além disso, a plasticidade de vias de sinalização também corresponde a uma manifestação de heterogeneidade temporal em resposta a uma pressão seletiva terapêutica (DAGOGO-JACK e SHAW, 2018). Ademais, essa plasticidade pode ainda permitir a adaptação do tumor em microambientes desafiadores (MELCHOR et al, 2014). Por isso, controlar a geração de heterogeneidade na população tumoral pode contribuir para melhores compreensões e repostas ao tratamento do câncer (LENZ et al, 2022).

5. CONCLUSÃO

Em suma, conclui-se que as respostas da via de sinalização de ERK ao tratamento com TRAM são mais robustas na linhagem tumoral de glioblastoma em comparação a uma linhagem normal. Além disso, as linhagens também apresentam comportamentos de ERK distintos durante a adição do quimioterápico TMZ, mas ambas atingem maiores níveis de heterogeneidade nos dias subsequentes ao tratamento. Além disso, a geração de uma população de células tumorais com sinalização de ERK homogeneamente inativa foi alcançada com o uso de TRAM, porém um fenótipo homogêneo com sinalização ativa de ERK não foi atingido com êxito através do uso de SFB. Por fim, observou-se a relação do TMZ com o comportamento da via da ERK, que quando modulada pode atenuar ou reforçar os efeitos do quimioterápico na homogeneização da sinalização. Contudo, os diferentes estados fenotípicos de sinalização de ERK não parecem gerar impactos no desfecho

das células de glioblastoma, as quais apresentam níveis similares tanto de proliferação quanto de células senescentes em sua população, independente da combinação de TRAM e TMZ adicionada.

5.1 PERSPECTIVAS

Novas metodologias podem ser desenvolvidas a fim de aprofundar a análise e compreensão acerca da homogeneização do comportamento da sinalização de ERK e seus impactos no tratamento quimioterápico de glioblastoma. Nesse sentido, selecionar uma fração celular com características específicas pode revelar detalhes importantes que passam despercebidos quando se considera a população geral. O processo de homogeneização pode ser realizado, por exemplo, em uma população celular previamente condicionada a um estado de resistência ao quimioterápico TMZ, visto que o tratamento padrão não apresentará grande eficácia e alterações na heterogeneidade podem causar um efeito mais expressivo devido ao ambiente desafiador em que as células se encontram. Ademais, avaliações em uma cultura celular 3D, como esferoides por exemplo, também podem criar um microambiente com maiores interações e adversidades que instiguem comportamentos de sobrevivência nas células.

Identificar as causas geradoras do aumento de heterogeneidade de sinalização de ERK observado após o tratamento quimioterápico também pode contribuir para novas perspectivas do trabalho. Buscar e reconhecer padrões de morte celular relacionados com a sinalização de ERK pode demonstrar se o aumento da heterogeneidade ocorre devido a morte de células com sinalizações mais homogêneas, por exemplo, ou se o aumento reflete uma tentativa das células de ocupar um maior espaço fenotípico visando uma maior probabilidade de sobrevivência. Nesses casos, a metodologia torna-se mais desafiadora, visto que é necessário *tracking* de células únicas durante longos períodos de tempo, o que pode ser inviabilizado pela fototoxicidade dos aparelhos utilizados. Por fim, outros parâmetros celulares relacionados com a via de sinalização de ERK podem ser avaliados e comparados entre as populações, como morfologia e migração celular, a fim de verificar possíveis alterações em resposta aos tratamentos realizados.

REFERÊNCIAS

- BURRELL, RA et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature** vol. 501,7467: 338-45. 2013. Disponível em: doi:10.1038/nature12625
- COLLADO, M; SERRANO, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. **Nature reviews. Cancer** vol. 10,1: 51-7. 2010. Disponível em: doi:10.1038/nrc2772
- DAGOGO-JACK, I e SHAW AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature reviews. Clinical oncology** vol. 15,2: 81-94. 2018. Disponível em: doi:10.1038/nrclinonc.2017.166
- FILIPPI-CHIELA, EC et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PloS one** vol. 7,8: e42522. 2012. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0042522
- JACQUES-SILVA MC, et al. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. **Oncology** vol. 67,5-6: 450-9. 2004. Disponível em: doi:10.1159/000082930
- KUDO, T et al. Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. **Nature protocols** vol. 13,1: 155-169. 2018. Disponível em: doi:10.1038/nprot.2017.128
- LAVOIE H; GAGNON J; THERRIEN M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nature reviews. Molecular cell biology** vol. 21,10: 607-632. 2020. Disponível em: doi:10.1038/s41580-020-0255-7
- LEE, Sang Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & diseases** vol. 3,3 198-210. 11. 2016. Disponível em: doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007
- LENZ, G et al. The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer. **Cancer research** vol. 82,1: 3-11. 2022. Disponível em: doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-1940
- MAIK-RACHLINE G; HACOHEN-LEV-RAN A; SEGER R. Nuclear ERK: Mechanism of Translocation, Substrates, and Role in Cancer. **International journal of molecular sciences** vol. 20,5 1194. 8 Mar. 2019. Disponível em: doi:10.3390/ijms20051194
- MARJANOVIC, ND et al. Emergence of a High-Plasticity Cell State during Lung Cancer Evolution. **Cancer cell** vol. 38,2: 229-246.e13. 2020. Disponível em: doi:10.1016/j.ccell.2020.06.012
- MELCHOR, L et al. Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. **Leukemia** vol. 28,8: 1705-15. 2014. Disponível em: doi:10.1038/leu.2014.13

OSTROM, QT et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. **Neuro-oncology** vol. 23,12 Suppl 2: iii1-iii105. 2021. Disponível em: doi:10.1093/neuonc/noab200

PATEL, AP et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**. New York, vol. 344,6190: 1396-401. 2014. Disponível em: doi:10.1126/science.1254257

REGOT, S et al. High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. **Cell** vol. 157,7: 1724-34. 2014. Disponível em: doi:10.1016/j.cell.2014.04.039

SILVA, AO 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** vol. 348,2: 177-183. 2016. Disponível em: doi:10.1016/j.yexcr.2016.09.014

WANG, Y et al. Temozolomide inhibits cellular growth and motility via targeting ERK signaling in glioma C6 cells. **Molecular medicine reports** vol. 14,6: 5732-5738. 2016. Disponível em: doi:10.3892/mmr.2016.5964

WEI, W et al. Single-Cell Phosphoproteomics Resolves Adaptive Signaling Dynamics and Informs Targeted Combination Therapy in Glioblastoma. **Cancer cell** vol. 29,4: 563-573. 2016. Disponível em: doi:10.1016/j.ccell.2016.03.012

YANG, K et al. ERK inhibition in glioblastoma is associated with autophagy activation and tumorigenesis suppression. **Journal of neuro-oncology** vol. 156,1: 123-137. 2022. Disponível em: doi:10.1007/s11060-021-03896-3