

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ALANA SILVA OLIVEIRA SOUZA

PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO EM LARGA ESCALA DE
MORTE CELULAR E AUTOFAGIA EM GLIOBLASTOMAS

RIO DE JANEIRO

2018

ALANA SILVA OLIVEIRA SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO EM LARGA ESCALA DE MORTE
CELULAR E AUTOFAGIA EM GLIOBLASTOMAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Formação para a Pesquisa Biomédica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Pesquisa Biomédica

Orientadora: Helena Lobo Borges

RIO DE JANEIRO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Alana Silva Oliveira

Padronização da detecção em larga escala de morte celular e autofagia em glioblastomas / Alana Silva Oliveira Souza. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho, 2018.

87 p. ; il. ; 31 cm.

Orientadora: Helena Lobo Borges.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Formação para Pesquisa Biomédica, 2018.

Referências: p. 80-85.

1. Glioblastoma. 2. Sistema Nervoso Central. 3. Autofagia. 4. Ensaio de Triagem em Larga Escala. – Dissertação. I. Borges, Helena Lobo. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Formação para Pesquisa Biomédica. III. Título.

ALANA SILVA OLIVEIRA SOUZA

PADRONIZAÇÃO DA DETECÇÃO EM LARGA ESCALA DE MORTE
CELULAR E AUTOFAGIA EM GLIOBLASTOMAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Formação
para a Pesquisa Biomédica, Instituto de
Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título
de mestre em Pesquisa Biomédica

Aprovada por:

(Christina Maeda Takiya, Professora Associada do Instituto de Ciências
Biomédicas/Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Membro da banca

(Luciana Chiarini, Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho/Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Membro da banca

(Isalira Peroba Rezende Ramos, Tecnóloga do Instituto Nacional de Biologia
Estrutural e Bioimagem, Orientadora do Mestrado Profissional para a Formação em
Pesquisa Biomédica /Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Membro da banca

(Tais Hanae Kasai Brunswick, Pós-Doutora do Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Orientadora do Mestrado Profissional para a Formação em Pesquisa
Biomédica/Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Revisora e Suplente Interna

(Celina Garcia da Fonseca, Pós-Doutora do Instituto de Ciências
Biomédicas/Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Suplente Externa

Rio de Janeiro, Agosto de 2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ser meu porto seguro e a minha força em todos os momentos da minha vida. Agradeço aos meus pais por todo amor, educação e esforços não medidos, por serem a minha base e os principais responsáveis pelas minhas conquistas. Pela confiança e oportunidade de sair com 18 anos de uma cidade pequena do interior e morar sozinha no Rio de Janeiro. E que mesmo longe, se fazem presentes todos os dias. Agradeço à minha irmã, por tudo! Ela é minha companhia diária, minha amiga, um pouco mãe (apesar de ser mais nova). Meus dias passaram a ser bem melhores quando ela foi aprovada no vestibular da UFRJ e veio morar comigo. Agradeço ao meu namorado, pelo companheirismo, amor e cuidado. Os 260 quilômetros que nos distanciam não se tornaram empecilhos, sendo percorridos ora por mim, ora por ele, semanalmente, por mais de 7 anos. Agradeço aos meus colegas de laboratório, pela ótima convivência de todos os dias. Trabalho com as melhores pessoas dessa vida. Porém, agradeço, principalmente ao João Marcos e à Karina. João, por te me acompanhado ao longo desse trabalho e por ser responsável por todo conhecimento adquirido em bancada, equipamentos, por sempre tirar minhas dúvidas e por ser meu socorro em momentos de desespero. Karina, por ter colocado a mão na massa junto comigo nesse estudo e pelas placas levadas toda semana, de ônibus, do Fundão ao IDOR. Obrigada mesmo. Agradeço também a Isabele, que de técnica do laboratório virou uma amiga. E que nunca me decepcionou, cumprindo suas funções muito bem, desde não faltar soluções a me ouvir (rs). Acho que ela conhece todas as pessoas de Pádua (minha cidade) sem nunca ter ido. Agradeço ao Thiago, que chegou há pouco tempo no laboratório, mas sempre estou atrás dele para pedir uma ajudinha. Agradeço ao Madeiro e a Letícia, do IDOR, por todas as leituras e ensinamentos do Operetta. Por fim, agradeço a Helena, por ser uma orientadora incrível, por ter me recebido muito bem em seu laboratório e ser responsável por minha evolução ao longo de todos esses anos de convivência. Obrigada pela paciência e confiança. Obrigada mesmo, por tudo!

RESUMO

SOUZA, Alana Silva Oliveira. **Padronização da detecção em larga escala de morte celular e autofagia em glioblastomas**. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação em Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

O câncer do sistema nervoso central está entre os dez tipos mais incidentes no país. Entre eles, os glioblastomas são os mais agressivos e resistentes às terapias. A HCS (*High Content Screening*), plataforma multiparamétrica em larga escala, trata-se de uma estação de imageamento com rotinas de análise de imagens pré-definidas, sendo bastante usada para descobertas de fármacos, e mais recentemente, no rastreamento de células tumorais a fim de analisar morte celular. Seria, então, interessante o uso da HCS para avaliar a ampla gama de quimioterápicos usados na clínica e suas combinações para o tratamento do câncer, juntamente com as novas drogas disponíveis no mercado, os inibidores de CDKs, na morte das células cancerígenas e também na indução de autofagia, provocada por alguns desses quimioterápicos. A autofagia vem sendo descrita como um marcador para a terapia do câncer, podendo estar relacionada ao desenvolvimento da quimiorresistência. Neste trabalho, a padronização da detecção em larga escala de morte celular e autofagia em glioblastomas é o principal objetivo. Foram definidos parâmetros como: melhor sonda para identificação de morte celular e autofagia, concentração, tempo de incubação e tempo de exposição das sondas, melhor lente objetiva 20x a ser utilizada, densidade celular ótima de plaqueamento, cálculo da intensidade de fluorescência para detecção de autofagia, leitura da placa em células vivas e fixadas, distribuição dos campos no poço para aquisição da imagem e o *pipeline* de análise. O kit *LIVE/DEAD Cell*, foi o mais eficiente para avaliar morte celular. Não houve diferenças entre as sondas utilizadas para detectar autofagia. O tempo de exposição ideal das sondas para aquisição da imagem foi de 200 ms. A melhor lente objetiva 20x foi a LD. A densidade ótima de plaqueamento foi 1.500 células/0,34 cm² para T98G e 2.500 células/0,34 cm² para U87 em placa de 96 poços para tratamento de 72 horas. O cálculo da intensidade de fluorescência se mostrou mais adequado fazendo o RGIF. A leitura da placa com células vivas foi eficiente. A distribuição de 17 campos espalhados pelo poço foi suficiente para análise das imagens. E foi estabelecido um protocolo detalhado para analisar morte celular e autofagia em linhagens de glioblastomas tratadas com quimioterápicos de primeira linha e inibidores de CDKs.

Palavras-chave: glioblastomas; rastreamento de alto conteúdo; morte celular; autofagia

ABSTRACT

Cancer of the central nervous system is among the ten most incident types in Brazil. Among them, glioblastomas are the most aggressive and resistant to therapies. The High Content Screening (HCS), a large-scale multiparametric platform, is an imaging station with predefined image analysis routines, and is widely used for new drug discovery and, more recently, for tracking tumor cells with the purpose of analyze cell death. It would, therefore, be interesting to use HCS to evaluate the wide range of chemotherapy used in the clinic and its combinations for the treatment of cancer, along with new drugs available on the market, inhibitors of CDKs, on death of cancer cells and also in the induction of autophagy, caused by some of these chemotherapies. Autophagy has been described as a marker for cancer therapy and may be related to the development of chemoresistance. In this work, the standardization or large-scale detection of cell death and autophagy in glioblastomas is the main objective. We defined parameters such as: best probe for identification of cell death and autophagy, concentration, incubation time and exposure time of probes, best 20x objective lens to be used (LD or WA), optimum cell density of plating, calculation of fluorescence intensity for autophagy detection, reading of plaques in fixed and live cells, field distribution in the well for image acquisition and the analysis pipeline. The LIVE/DEAD Cell kit was the most efficient probe to evaluate cell death. It seems to be no differences between the probes used to detect autophagy. The ideal exposure time for probes for image acquisition was 200 milliseconds. The best 20x objective lens was LD. The optimum plating cell lines density was 1.500 cells/0,34 cm² for T98G and 2.500 cells/0,34 cm² for U87 in 96 well plates for treatment of 72 hours. The calculation of the fluorescence intensity was more adequate by applying the RGIF. The plate reading with live cells was efficient and distribution of 17 fields well spread per well was sufficient for analysis of the images. Finally, a detailed protocol was established to analyze cell death and autophagy in glioblastoma cell lines treated with first-line chemotherapy and CDK 4/6 inhibitors.

Key words: glioblastomas; high content screening; cell death; autophagy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografias de cortes histológicos de astrocitomas de grau II segundo a classificação da OMS.....	23
Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos de glioblastoma (grau IV) segundo a classificação da OMS.....	23
Figura 3 – Diagrama das duas vias de formação de GBM.....	24
Figura 4 – Regulação do ciclo celular.....	26
Figura 5 – Fluxograma das etapas da autofagia.....	27
Figura 6 – Fluxograma dos eventos que ocorrem na morte por necrose e apoptose.....	29
Figura 7 – Fotografia do sistema de imageamento de alto conteúdo – Operetta.....	30
Figura 8 – Teste de densidade celular ótima das linhagens U87MG (A) e T98G (B) em placa de 96 poços.....	39
Figura 9 – Gráfico de contagem do número de núcleos das linhagens T98G e U87MG após a simulação de 72 horas de tratamento em placa de 96 poços.....	40
Figura 10 - Teste do tempo de incubação, concentração e exposição das sondas.....	41
Figura 11 – Teste do número e disposição dos campos em cada poço da placa de 96 poços.....	42
Figura 12 – Teste da lente objetiva 20x a ser utilizada (LD).....	43
Figura 13 – Teste da lente objetiva 20x a ser utilizada (WA).....	43

Figura 14 - Teste de sondas para detecção de autofagia (<i>Lysotracker green</i>).....	44
Figura 15 – Gráfico do número de <i>spots</i> por número de células da linhagem T98G.....	45
Figura 16 – Teste de sondas para detecção de autofagia (Laranja de acridina).....	46
Figura 17 – Gráficos do número de <i>spots</i> (A), da média da intensidade de fluorescência do vermelho (B) e da razão da média da intensidade de fluorescência do vermelho sobre a média da intensidade de fluorescência do verde, RGIF (C) por número de células da linhagem T98G.....	47
Figura 18 – Teste de sondas para detecção de morte celular (BOBO-3 – 75 μ M).....	49
Figura 19 – Teste de sondas para detecção de morte celular (BOBO-3 – 0,1 μ M).	50
Figura 20 – Gráfico da intensidade de BOBO-3 no núcleo por número de células da linhagem T98G.....	51
Figura 21 – Teste de sondas para detecção de morte celular (CellEvent-caspase 3/7 2 μ M por 40 minutos).....	52
Figura 22 – Teste de sondas para detecção de morte celular (CellEvent-caspase 3/7 2 μ M por 30 minutos).....	53
Figura 23 – Teste de sondas para detecção de morte celular (CellEvent-caspase 3/7 1 μ M por 30 minutos).....	54
Figura 24 – Teste de sondas para detecção de morte celular (Kit <i>LIVE/DEAD Cell</i>).....	55
Figura 25 – Gráfico do número de células vivas (A) e de porcentagem de células mortas (B) da linhagem T98G tratada com 10 μ M de etoposídeo por 24 horas.....	56
Figura 26 – Teste de leitura da placa em células vivas ou fixadas.....	57

Figura 27 – Análise dos núcleos das células T98G pelo <i>software Columbus</i>	58
Figura 28 – Análise dos núcleos das células T98G pelo <i>software Columbus</i> para exclusão dos núcleos da borda.....	59
Figura 29 – Passo 3 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Morphology Properties</i>	59
Figura 30 – Análise dos núcleos das células T98G pelo <i>software Columbus</i> para exclusão dos núcleos conforme área e circularidade.....	60
Figura 31 – Passo 5 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Intensity Properties</i> para o homodímero de etídeo.....	61
Figura 32 – Análise do citoplasma das células T98G pelo <i>software Columbus</i>	61
Figura 33 – Passo 7 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Morphology Properties</i>	62
Figura 34 – Passo 8 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Intensity Properties</i> para a calceína.....	62
Figura 35 – Análise da população de células T98G vivas pelo <i>software Columbus</i>	63
Figura 36 – Análise da população de células T98G mortas pelo <i>software Columbus</i>	64
Figura 37 – Análise dos núcleos das células T98G pelo <i>software Columbus</i>	65
Figura 38 - Análise dos núcleos das células T98G pelo <i>software Columbus</i> para exclusão dos núcleos da borda.....	65
Figura 39 - Passo 3 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Morphology Properties</i>	66

Figura 40 - Análise dos núcleos das células T98G pelo <i>software Columbus</i> para exclusão dos núcleos conforme área e circularidade.....	66
Figura 41 - Análise do citoplasma das células T98G pelo <i>software Columbus</i>	67
Figura 42 - Passo 6 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Morphology Properties</i>	67
Figura 43 - Passo 7 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Intensity Properties</i> no canal de fluorescência verde do laranja de acridina.....	68
Figura 44 - Passo 8 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo <i>Calculate Intensity Properties</i> no canal de fluorescência vermelha do laranja de acridina.....	68
Figura 45 - Análise dos <i>spots</i> das células T98G pelo <i>software Columbus</i>	69
Figura 46 – Teste de viabilidade celular - Curva dose-resposta de viabilidade na linhagem T98G e U87MG realizada segundo o método de MTT tratadas com irinotecano.....	70
Figura 47 – Teste de viabilidade celular - Curva dose-resposta de viabilidade na linhagem T98G (A) e U87MG (B) realizada segundo o método de MTT tratadas com temozolamida.....	71
Figura 48 – Teste de viabilidade celular - Curvas dose-resposta de viabilidade realizada na linhagem T98G (A) e U87MG (B) segundo o método de MTT tratadas com palbociclibe e abemaciclibe nas doses indicadas por 5 dias.....	72
Figura 49 – Expressão da proteína pRB após tratamento com inibidores de CDKs nas linhagens U87MG (A) e T98G (B).....	74
Figura 50 - Gráfico de porcentagem do número de células vivas (A) e do número de células mortas (B) da linhagem T98G.....	75
Figura 51 - Gráfico de porcentagem do número de células vivas da linhagem T98G.....	77

Figura 52 - Gráfico de porcentagem do número de células vivas da linhagem T98G.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes, por sexo, estimados para o ano de 2018.....	21
Tabela 2 - Classificação dos gliomas malignos e sobrevivência segundo o Programa de Registro de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (SEER).....	22
Tabela 3 - Estimativa do EC ₂₀ das linhagens de glioblastoma com seus respectivos quimioterápicos e inibidores de CDKs.....	73

LISTA DE SIGLAS

ABE – Abemaciclibe

ANOVA – Análise de variância entre grupos (do inglês *Analysis of variance between groups*)

ATCC – Tecido de cultura tipo americano (do inglês *American type culture tissue*)

BSA – Albumina de soro bovino

CDK – Cinase dependente de ciclina (do inglês *Cyclin dependent kinase*)

CTRL – Controle

DEVD – Peptídeo de quatro aminoácidos conjugado com um ácido nucleico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EC₂₀ – Concentração efetiva da droga que induz 20% do efeito máximo

FDA – Administração de drogas e alimentos (do inglês *Food and drug administration*)

GBM – Glioblastoma

HBSS – Solução salina balanceada de Hank (do inglês *Hank's balanced salt solution*)

HCS – Rastreamento de alto conteúdo (do inglês *High content screening*)

HER2 – Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (do inglês *Human epidermal growth factor receptor 2*)

HOESCHT 33342 – 2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate

IDH – Desidrogenase isocitrática (do inglês *isocitrate dehydrogenase*)

IDOR – Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino

IFVE – Intensidade de fluorescência do verde

IFVM – Intensidade de fluorescência do vermelho

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LC3II – Proteína de cadeia leve associada a microtúbulos lipidados -3

LD – Lente objetiva de longa distância (do inglês *Long distance*)

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

OMS – Organização Mundial da Saúde

PALBO – Palbociclibe

PBS – Tampão salina fosfato (do inglês *Phosphate buffered saline*)

RB – Retinoblastoma

RGIF – Razão da intensidade de fluorescência do vermelho sobre o verde

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Dodecilsulfato de sódio (do inglês *Sodium dodecyl sulfate*)

SEER – Programa de registro de vigilância, epidemiologia e resultados finais (do inglês *Surveillance, epidemiology, and end results program*)

SNC – Sistema nervoso central

STR – Sequenciamento para busca de pequenas repetições em *tandem* (do inglês *Short tandem repeats*)

TMRM – Tetrametilrodamina

TMZ – Temozolamida

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UTB – Tampão com ureia, tris e betamercaptoetanol

VP-16 – Etoposídeo

VPS – Classificação de proteína vacuolar (do inglês *Vacuolar protein sorting*)

WA – Lente objetiva com amplo campo de visão (do inglês *Wide angle*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	20
2.1.1 Glioblastomas (GBMs).....	22
2.2 INIBIDORES DE CINASES DEPENDENTE DE CICLINA (iCDKs).....	25
2.3 AUTOFAGIA.....	27
2.4 MORTE CELULAR.....	28
2.5 HIGH CONTENT SCREENING (HCS).....	29
2.6 SONDAS.....	31
3 OBJETIVO	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR.....	32
4.2 TESTE INICIAL DE RASTREAMENTO DE MORTE CELULAR EM LARGA ESCALA.....	33
4.3 TESTE DE DENSIDADE CELULAR.....	33
4.4 PLAQUEAMENTO DA LINHAGEM T98G PARA TESTE DE SONDAS.....	34
4.5 TESTE DA LENTE OBJETIVA 20X LONG DISTANCE (LD) E WIDE ANGLE (WA).....	34
4.6 TESTE DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE AUTOFAGIA (LYSOTRACKER GREEN X LARANJA DE ACRIDINA).....	34
4.6.1 Cálculo da intensidade de fluorescência para detecção de autofagia.....	34
4.7 TESTE DE SONDAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR.....	35
4.7.1 Bobo-3.....	35

4.7.2 Caspase 3/7.....	35
4.7.3 Kit LIVE/DEAD Cell.....	36
4.8 TESTE DE LEITURA DA PLACA EM CÉLULAS FIXADAS.....	36
4.9 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE (MTT).....	36
4.10 CÁLCULO DO EC ₂₀ DOS QUIMIOTERÁPICOS E INIBIDORES DE CDKS.....	37
4.11 WESTERN BLOTTING.....	37
4.12 RASTREAMENTO DE MORTE CELULAR EM LARGA ESCALA DA LINHAGEM T98G.....	38
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 TESTE DE DENSIDADE CELULAR.....	39
5.2 TESTE DO TEMPO DE INCUBAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DAS SONDAS.....	40
5.3 TESTE DO NÚMERO E DISPOSIÇÃO DOS CAMPOS NO POÇO DE UMA PLACA DE 96 POÇOS.....	41
5.4 TESTE DA LENTE OBJETIVA DE 20X A SER UTILIZADA.....	42
5.5 TESTE DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE AUTOFAGIA.....	43
5.6 TESTE DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE MORTE CELULAR.....	48
5.7 TESTE DE LEITURA DA PLACA EM CÉLULAS VIVAS OU FIXADAS.....	56
5.8 PIPELINE DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE MORTE CELULAR.....	57
5.9 PIPELINE DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE AUTOFAGIA.....	64
5.10 TESTE DE VIABILIDADE NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA COM SEUS RESPECTIVOS TRAMENTOS DE PRIMEIRA LINHA E COM INIBIDORES DE CDKS.....	69
5.11 EXPRESSÃO DE RB NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA.....	74

5.12 RASTREAMENTO DA LINHAGEM T98G PARA DETECÇÃO DE MORTE CELULAR.....	75
6 CONCLUSÃO.....	78
7 REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças em que há proliferação desordenada de células capazes de invadir tecidos e podendo ocasionar metástase. As células cancerosas tendem a ser bastante agressivas e incontroláveis, e o acúmulo dessas células é determinante para formação dos tumores. (INCA, 2018a). Aproximadamente, um terço das mortes por câncer, estão relacionadas a 5 principais fatores: elevado índice de massa corporal, sedentarismo, pouco consumo de frutas e vegetais, ingestão de bebida alcoólica e uso de tabaco (OMS, 2018).

Na clínica, os tratamentos para câncer englobam radioterapia, ressecção cirúrgica e quimioterapia. Nesta, vários tipos de drogas são usadas para tratar pacientes com os mais variados tipos de câncer ao longo dos diferentes estágios de progressão da doença, abrangendo o uso de vários quimioterápicos de primeira linha e segunda linha, que podem ser usados individualmente ou em uma vasta gama de combinações.

Novas classes de drogas têm surgido como alternativas para o tratamento do câncer, podendo ser usadas individualmente ou em combinação com drogas citotóxicas. É o caso dos inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Estas são moléculas importantes no processo tumoral, uma vez que permitem a progressão do ciclo celular e conseqüentemente a proliferação (BAI; LI; ZHANG, 2017).

A variedade de diferentes combinações, que podem ser usadas para o tratamento do câncer, pode apresentar algum grau de incerteza na melhor escolha do coquetel anti-câncer a ser usado. Dessa forma, testar essas combinações *in vitro* em linhagens tumorais é uma maneira fácil e rápida de visualizar possíveis novas combinações na busca de novos tratamentos para o câncer.

Nosso grupo de pesquisa, devido à alta letalidade, tem particular interesse em glioblastomas. Estes tumores apresentam características muito agressivas e são altamente resistentes à radiação ionizante (LIMA *et al.*, 2012).

A proposta é definir os melhores parâmetros a serem usados para aquisição e análise de imagens, a partir de um rastreamento em nossas linhagens de glioblastomas, frente a quimioterápicos de primeira e de segunda linha, e inibidores de CDK, usando uma plataforma de análise multiparamétrica em larga escala (*High Content Screening* – HCS), colaboração com a equipe do Prof. Stevens Rehen do Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino (IDOR), com a finalidade de identificar morte celular e autofagia.

O rastreamento de alto conteúdo tornou-se um método de avaliação bastante utilizado na descoberta de fármacos, na análise de toxicidade *in vitro* e na pesquisa do câncer (GILBERT; BOUTROS, 2016). Porém, o estabelecimento de parâmetros (densidade celular, tempo de exposição, lente objetiva, kit de sondas) torna-se importante, já que as células apresentam morfologia e forma de crescimento bastante diferente, que acabam interferindo na análise da imagem gerada pelo HCS.

A padronização de técnicas para estabelecer a detecção de morte celular e autofagia em glioblastomas, através do HCS, irá facilitar a aplicabilidade dos ensaios *in vitro* de sensibilidade a diferentes drogas e combinações na terapia anti-câncer. A autofagia é um processo de degradação e reciclagem dos componentes celulares para manutenção da homeostase. No câncer, o papel da autofagia se resume nas suas funções de pró-sobrevivência e pró- morte. Ela pode ajudar as células cancerosas a sobreviverem mesmo na falta de nutrientes, levando-as a desenvolverem quimiorresistência, ou pode funcionar como um mecanismo de morte para essas células, espontaneamente ou devido à exposição à radioterapia e quimioterapia (PANDA *et al.*, 2015).

Esses ensaios, utilizando a plataforma HCS, por sua vez poderão ajudar na escolha das melhores drogas para o tratamento de determinado tipo de câncer. Futuramente, células cancerígenas de pacientes poderiam ser expostas a esse rastreamento, já que as respostas do tratamento quimioterápico são diferentes em cada indivíduo, possibilitando assim o desenvolvimento de uma nova ferramenta para medicina personalizada com foco em Oncologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Cânceres do SNC abrangem um grupo de tumores raros e heterogêneos, representando, globalmente, cerca de 3% dos casos de câncer (MIRANDA-FILHO *et al.*, 2017). Para esses tumores, estima-se 5.810 novos casos em homens e 5.510 em mulheres para o biênio de 2018/2019 no Brasil, conforme observado na **tabela 1** (INCA, 2017b).

Os tumores primários do SNC são conhecidos pela alta morbidade e mortalidade que ocasionam em adultos e crianças (DE ROBLES *et al.*, 2015). Em 2015, no Brasil, 4.718 óbitos em homens e 4.315 óbitos em mulheres, ocorreram por decorrência de câncer no SNC (INCA, 2017b). Ainda, neste ano, nos Estados Unidos, cerca de 80 mil novos casos devem ser

diagnosticados, sendo que, aproximadamente, 32% desses tumores do SNC são malignos (AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION, 2018).

Tabela 1: Distribuição dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados, por sexo, para o ano de 2018

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Os tumores do SNC encontram-se em 10ª posição em homens e 9ª posição em mulheres (INCA, 2017b).

Os gliomas representam, aproximadamente, 40% a 60%, dos tumores primários do SNC e são os que ocorrem com mais frequência, principalmente em adultos (INCA, 2017b). O sistema de classificação da organização mundial da saúde (OMS) reúne os gliomas em 4 graus histológicos, estabelecidos por algumas características: aumento da indiferenciação, anaplasia e agressividade (LOUIS, 2007a). Na classificação dos gliomas malignos, encontram-se: os glioblastomas e variantes (tumores de grau IV) e os astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas anaplásicos (tumores de grau III). Os tumores de grau I são benignos e podem ser retirados através de cirurgia. Os de grau II são mais diferenciados, podendo se desenvolver em um tumor de grau mais agressivo com o tempo (OMURO; DEANGELIS, 2013). A **tabela 2** mostra a classificação dos gliomas malignos e a porcentagem de sobrevivência. Esta é muito baixa, cerca de 4,7% de pessoas com tumores de grau IV (glioblastomas) têm sobrevida de 5 anos, diferentemente dos tumores de grau III, em que a sobrevida chega a ser 6 vezes maior nesse mesmo tempo.

Tabela 2: Classificação dos gliomas malignos e sobrevivência segundo o Programa de Registro de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (SEER).

	Sobrevivência (%)	
	1 Ano	5 Anos
Tumores (a) de grau IV OMS		
Glioblastomas e variantes (b)	35.7	4.7
Tumores (a) de grau III OMS		
Astrocitoma Anaplásico	60.1	25.9
Oligodendroglioma Anaplásico	81	49.4
Oligoastrocitoma Anaplásico	NA	NA

(a) A classificação da OMS de grupos de gliomas dentro dos 4 graus com base no aumento da indiferenciação, anaplasia e agressividade. Os gliomas malignos segundo a OMS compreendem os tumores de grau III e IV. (b) Gliossarcomas, glioblastomas de células gigantes e glioblastomas de pequenas células. Abreviação: NA, não avaliado (Modificada a partir de OMURO; DEANGELIS, 2013).

As causas do aparecimento dos tumores do SNC ainda não são bem estabelecidas, porém, sabe-se que podem estar relacionadas a alguns fatores de risco. Dentre estes podemos observar que os tumores cerebrais acometem 2 vezes mais caucasianos do que negros e o pico de incidência dos gliomas ocorre entre 75-84 anos de idade. Há uma maior incidência em homens do que em mulheres e o histórico familiar em síndromes genéticas, também são fatores de risco (FLORIAN; UNGUREANU; BERCE, 2013). Braganza e colaboradores descrevem que a exposição a doses moderadas a altas de radiação ionizante podem estar envolvidas no desenvolvimento desses tumores (BRAGANZA *et al.*, 2012).

2.1.1 Glioblastomas (GBMs)

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor primário do SNC que apresenta a maior malignidade. A taxa de sobrevivência de pacientes com este tipo de tumor é bastante baixa, com sobrevida média de 15 a 23 meses (SHERGALIS *et al.*, 2018). GBMs são caracterizados por terem alta taxa de proliferação e, além de serem agressivos e invasivos, também apresentam elevada resistência à radioterapia e quimioterapia (ALVES *et al.*, 2011).

A **figura 1** mostra as características histológicas de um glioma grau II, de baixa malignidade, onde há moderada celularidade com variações de forma e volume, não havendo proliferação de vasos sanguíneos e a **figura 2** mostra um glioma grau IV (glioblastoma), altamente maligno, apresentando rápida proliferação, invasão difusa, proliferação de vasos sanguíneos e necrose. Cerca de 70% de gliomas de grau II podem se tornar, entre 5 a 10 anos, tumores de grau III e IV (MAHER *et al.*, 2001).

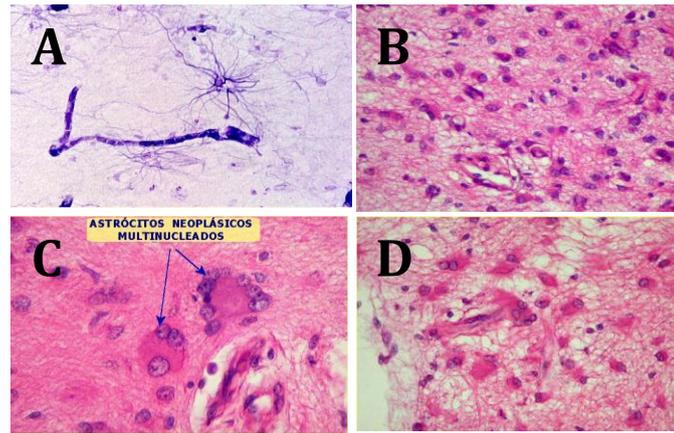


Figura 1: Fotomicrografias de cortes histológicos de astrocitomas de grau II segundo a classificação da OMS. (A) Representa astrócitos normais demonstrados pela técnica de Holzer, (B) astrocitomas de moderada celularidade e não há proliferação de vasos, (C) astrócitos tumorais multinucleados e (D) astrócitos tumorais apresentando variação de forma e volume (UNICAMP, 2018a).

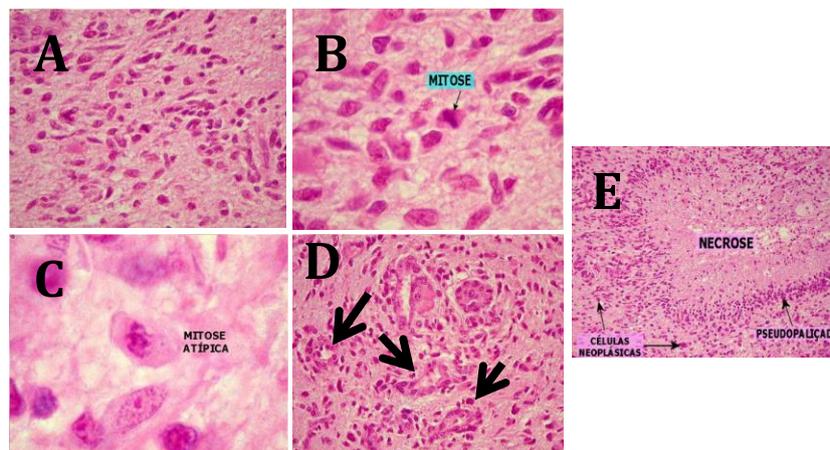


Figura 2: Fotomicrografias de cortes histológicos de glioblastoma (grau IV) segundo a classificação da OMS. Em (A) células cancerígenas infiltrando de maneira difusa o tecido nervoso, (B) ocorrência de mitoses comuns, mostrando também núcleos alongados e escassez do citoplasma, (C) mostra mitose atípica, (D) as setas pretas indicam os vasos sanguíneos mostrando a proliferação vascular e (E) ocorrência de necrose (UNICAMP, 2018b).

Os glioblastomas podem ser classificados em primários ou secundários. Os tumores primários, que ocorrem em mais de 90% dos casos, surgem sem qualquer evidência de uma formação anterior de um tumor de grau inferior. Já os glioblastomas secundários surgem a partir de um tumor de grau mais baixo, o II, por exemplo (PRICE; CHIOCCA, 2014). A **figura 3** esquematiza esses subtipos e mostra as principais características clínicas de cada um deles (MAHER *et al.*, 2001b).

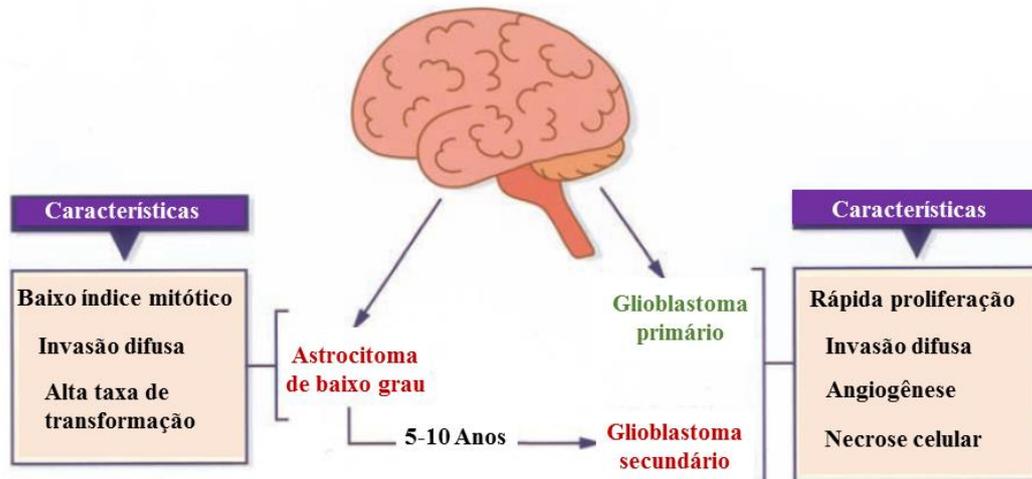


Figura 3: Diagrama das duas vias de formação de GBM. O GBM pode ser desenvolvido após 5 a 10 anos a partir de um astrocitoma de baixo grau (GBM secundário) ou pode ser uma patologia inicialmente diagnosticada sem nenhuma evidência prévia de formação de tumor (GBM primário) (Modificada a partir de: MAHER *et al.*, 2001).

No GBM secundário frequentemente aparece mutações em uma enzima chamada desidrogenase isocitrática (IDH) 1 e 2. Os gliomas com mutações nessas enzimas têm melhor prognóstico em comparação aos gliomas IDH selvagem. No GBM primário, mutações na IDH são raras, prevalecendo a IDH selvagem (LOUIS, 2016b).

O tratamento usual de primeira linha para GBMs é a cirurgia e radioterapia combinada com o quimioterápico temozolamida (TMZ) (ZONG; VERHAAK; CANOLL, 2012). A TMZ é um medicamento que sofre rápida conversão química quando hidrolisada *in vivo* transformando-se no composto alquilante MTIC - 5- (3- metiltriazeno-1-il) imidazol-4-carboxamida (NAJMAN; GADELHA, 2002; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2017) fornecendo um grupo metil para as bases adenina e guanina do DNA (O6-guanina, N7-guanina e N3-adenina), e a primeira lesão citotóxica, O6-guanina, pode ser retirada por uma metiltransferase em tumores que expressam essa enzima ou ser toleradas por eles, podendo conferir resistência ao tratamento com TMZ (ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012). Além da TMZ, na prática clínica, existe uma variedade de quimioterápicos de primeira e segunda linha para GBMs que podem ser usados individualmente ou em uma vasta gama de combinações dependendo do tipo do tumor. Em adultos, entre os possíveis utilizados estão: vincristina, cisplatina, carboplatina, etoposídeo, ciclofosfamida, procarbazina, irinotecano, entre outros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). O etoposídeo e irinotecano são inibidores das topoisomerases 2 e 1, respectivamente, impossibilitando o desnovelamento do DNA para replicação. A vincristina é um alcaloide que se liga as proteínas dos microtúbulos do fuso mitótico bloqueando a divisão celular. Cisplatina, carboplatina e ciclofosfamida são

agentes alquilantes que se ligam ao DNA através de ligações cruzadas, modificando a configuração da hélice e inibindo a síntese deste. A procarbazina também é um agente alquilante, porém tem vários sítios de atuação, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas (MANUAL DE ONCOLOGIA CLÍNICA DO BRASIL, 2018).

2.2 INIBIDORES DE CINASES DEPENDENTE DE CICLINA (iCDKs)

Novas classes de fármacos surgiram na última década como alternativas para o tratamento de cânceres em estágios avançados. Dentre elas estão drogas antiangiogênicas, bloqueadores de receptores de fator de crescimento epidérmico e inibidores de cinases (RECONDO JR *et al.*, 2014).

Proteínas cinases, por meio de reações de fosforilação, são responsáveis pela regulação de vários processos celulares, como proliferação, desenvolvimento e homeostasia, possuindo papéis estabelecidos no surgimento do câncer (MARIAULE; BELMONT, 2014). Faz parte dessa família de proteínas as Cinases Dependente de Ciclina (CDKs), podendo ser separadas em dois grupos: aquelas que participam da progressão do ciclo celular (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6, CDK10, CDK11) e as que regulam a transcrição (CDK7, CDK8 e CDK9).

A CDK 2 é ativada pelas ciclinas E e A entre as fases G1/S do ciclo celular ocorrendo a progressão para a fase G2 do ciclo. Já o complexo B/CDK1 levam as células a mitose. Os complexos ciclina D/CDK4,6 funcionam na fase G1 do ciclo celular e fosforilam a proteína retinoblastoma (RB), fazendo com que haja a progressão para fase S, onde ocorre a duplicação do DNA (SÁNCHEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2015), como pode ser mostrado na **figura 4**.

A proteína retinoblastoma é uma supressora tumoral. Seu papel é inibir a progressão da fase G1 para S do ciclo celular através da ligação e inibição do fator de transcrição E2F, mas isso é revertido quando ela é fosforilada pelo complexo ciclina D/CDK4,6, havendo progressão do ciclo celular (SURYADINATA; SADOWSKI; SARCEVIC, 2010).

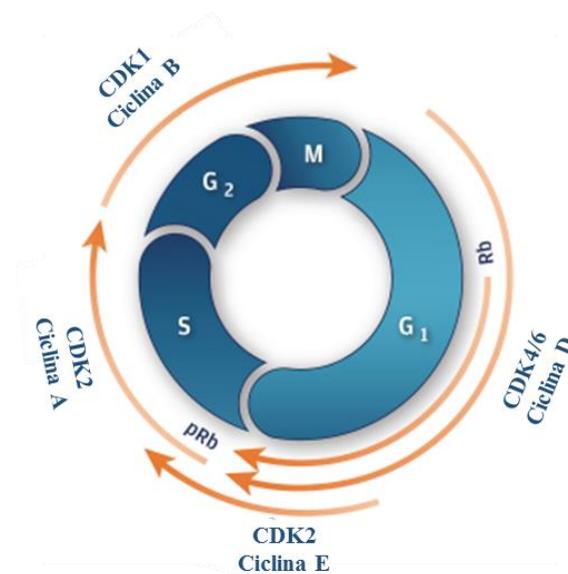


Figura 4: Regulação do ciclo celular. O ciclo celular consiste nas fases G₁, S (síntese de DNA), G₂ e M (mitose). G₁ e G₂ são chamados de *gaps*, intervalos entre as fases S e M. E vários complexos ciclina-CDK regulam a progressão do ciclo celular (Modificada a partir de: G₁ TERAPÊUTICOS, 2017).

A inibição de CDK4/6, surge então, como uma nova estratégia à terapia anticâncer. Abemaciclibe e Palbociclibe são fármacos inibidores de CDK4/6 ocasionando como consequência a inibição da fosforilação de RB e arresto do ciclo celular em G₁ (PATNAIK *et al.*, 2016; KIM; SCOTT, 2017). Palbociclibe, chamado comercialmente de Ibrance, foi o primeiro dentre essas classes de inibidores, aprovado pelo *US Food and Drug Administration* (FDA), a ser introduzido na clínica como tratamento de primeira linha para câncer de mama metastático com receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) positivo e negativo combinado com letrozol (ETTL; HARBECK, 2017), um inibidor da enzima aromatase, esta, por sua vez, tem papel importante na síntese de estrogênio, ou fulvestranto, bloqueador da ação do estrogênio. O Abemaciclibe, comercialmente chamado de Verzenio, foi aprovado pelo FDA em 2017 e indicado como monoterapia ou em combinação com fulvestranto para tratamento de câncer de mama metastático com receptor 2 de fator de crescimento epidermal (HER2) positivo e negativo (US FDA, 2018). Estudos mostram que o Abemaciclibe consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica em modelo de xenoinxerto de glioblastoma aumentando a taxa de sobrevida (RAUB *et al.*, 2015). Abemaciclibe e Palbociclibe estão sendo avaliados em ensaios clínicos para tratamento de glioblastoma, fase II e fase I, respectivamente (SHERGALIS *et al.*, 2018).

2.3 AUTOFAGIA

Autofagia é um processo intracelular de degradação que ocorre por ação dos lisossomos, em que são destruídas organelas velhas, danificadas, e proteínas mal enoveladas, contribuindo para homeostase celular (YANG *et al.*, 2018). Na maioria das vezes a autofagia ocorre como um mecanismo de sobrevivência celular, porém a desregulação desse processo pode levar a morte celular (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Como mostra a **figura 5**, os processos da autofagia envolvem: a formação do fagóforo, autofagossomo, fusão do autofagossomo com lisossomo, e por fim, a degradação do material intracelular pelas enzimas hidrolíticas.

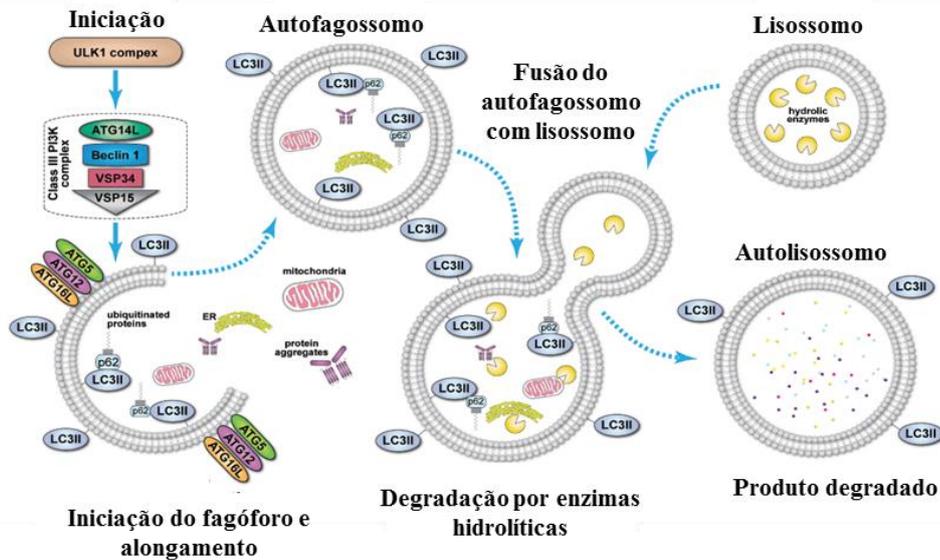


Figura 5: Fluxograma das etapas da autofagia. A etapa inicial da autofagia é mediada pelo complexo ULK1 que é responsável por vários sinais celulares. A formação do fagóforo necessita de um complexo chamado classe III fosfoinositídeo cinase-3 (PI3K) que é integrado por algumas moléculas: proteína vacuolar (VPS34), ATG14L, VSP15 e beclina 1. O alongamento do fagóforo ocorre pela ação de um complexo formado por ATG5, ATG12 e ATG16, e pela molécula LC3II. Estes também são requeridos para formação do autofagossomo. p62 ligada a ubiquitinas marcadas para degradação se liga à proteína de cadeia leve associada a microtúbulos lipídicos -3 (LC3II) durante a formação do autofagossoma enquanto os materiais intracelulares são engolfados neste autofagossoma em formação. Em seguida, o autofagossoma se funde com o lisossomo, composto por enzimas hidrolíticas, degradando o material intracelular (Modificada a partir de: NDOYE; WEERARATNA, 2016).

O papel da autofagia no câncer ainda é bem discutido já que a indução desta por quimioterápicos poderia contribuir para a morte da célula tumoral, ou então, levar à proteção dessas células e assim o desenvolvimento da quimiorresistência (LIU *et al.*, 2016a). Isso porque a autofagia é importante na manutenção de células cancerosas na presença de condições de estresse metabólico, e assim, gera resistência às terapias anti-câncer, e em outra vertente, a desregulação da autofagia pode levar ao consumo dos componentes intracelulares e ocasionar a morte celular (JANKU *et al.*, 2011). Dessa forma, a autofagia pode ser entendida tanto como um mecanismo de supressão tumoral, como também um mecanismo de promoção do tumor. Já foi descrito que camundongos que perderam um alelo do gene Beclina-1 tiveram o processo

autofágico prejudicado e desenvolveram carcinomas no fígado, mostrando que a autofagia pode funcionar como um supressor tumoral (YUE *et al.*, 2003). Outros estudos, envolvendo cânceres humanos, como o de pâncreas, através da avaliação da expressão de LC3, componente importante do processo que leva a autofagia, notaram que quando há um nível elevado de autofagia, o tratamento do câncer é prejudicado (FUJII *et al.*, 2008). Além disso, drogas que inibem a autofagia, como a cloroquina, melhoram a resposta ao tratamento antineoplásico (AMARAVADI *et al.*, 2011). Um trabalho envolvendo GBMs, mostrou que o *knockdown* da proteína retinoblastoma (RB) nessas células combinadas com o quimoterápico cisplatina, que leva à resistência das células por induzir autofagia, pode melhorar a eficiência dessa droga em relação a essa resistência (LIU *et al.*, 2016). O supressor tumoral, RB, tem sido visto, recentemente, como um regulador de apoptose e autofagia (DELOU; BIASOLI; LOBO, 2016). Foi descrito, também em glioblastomas, que a supressão de RB prejudica o processo de autofagia induzida por etoposídeo (VP-16) inibindo a fusão de autofagossomos com lisossomos, e levando a morte celular (BIASOLI *et al.*, 2013).

2.4 MORTE CELULAR

A morte celular é um processo biológico essencial ao nosso organismo para manutenção da homeostase, ocasionada por uma resposta ao estresse. Pode ser dividida em dois tipos principais: necrose e apoptose. Nas células necróticas, ocorre a degradação da cromatina e devido ao aumento do volume celular, há ruptura da membrana plasmática (SMITH; SMITH, 2012), induzindo inflamação ao redor dessas células devido a liberação do conteúdo intracelular (ELKON, 2013). Já a apoptose é um processo fisiológico, que acarreta a morte celular programada evoluindo uma sequência de eventos bioquímicos através de vias de transdução de sinal (GALLUZZI *et al.*, 2015). A célula sofre alterações morfológicas características, como: arredondamento da célula, retração citoplasmática, diminuição do volume celular, condensação da cromatina (picnose), fragmentação nuclear (cariorrexe), *blebbing* da membrana plasmática, porém mantendo sua integridade, formação de corpos apoptóticos e por fim, o englobamento por fagócitos para degradação (GOLSTEIN; KROEMER, 2007). A **figura 6** mostra as diferenças que ocorrem na necrose e apoptose.

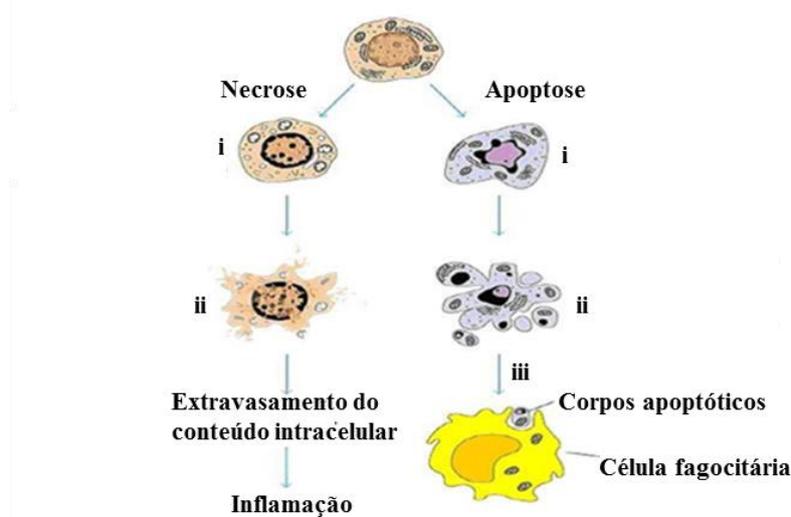


Figura 6: Fluxograma dos eventos que ocorrem na morte por necrose e apoptose. (i) Na morte por necrose ocorre a condensação irregular da cromatina, inchaço das organelas, principalmente das mitocôndrias e ruptura das membranas, (ii) levando a desintegração celular e ao extravasamento do conteúdo intracelular induzindo uma resposta inflamatória. (i) Já uma célula que sofre apoptose ocorre a condensação e fragmentação da cromatina, a retração citoplasmática da célula, (ii) *blebbing* de membrana e a formação de corpos apoptóticos, não havendo ruptura da membrana plasmática. (iii) Por fim, esses corpos apoptóticos são fagocitados (Modificada a partir de: CHOUDHURY *et al.*, 2012).

Em relação ao câncer, a detecção no aumento de morte celular *in vitro* pode ser utilizada como uma ferramenta para medir o sucesso terapêutico. A visualização de células mortas é uma identificação inicial se o tumor é responsivo ou não ao tratamento anti-câncer empregado.

2.5 HIGH CONTENT SCREENING (HCS)

High Content Screening (HCS) ou triagem baseada em microscópio automatizada é uma estação de imageamento com rotinas de análises de imagens pré-definidas (*Operetta Perkin Elmer*), como mostra a **figura 7**. Esta plataforma é capaz de mensurar a atividade biológica em células ou modelos tridimensionais, após o tratamento com uma ampla variedade de compostos ou siRNAs, em placas que variam de 6 até 384 poços. Múltiplas características das células podem ser visualizadas e medidas com o uso de um ou mais corantes fluorescentes. Os ensaios podem ser realizados em células fixadas ou vivas, uma vez que esse equipamento tem a opção de manter condições de temperatura e CO₂ favoráveis à manutenção das células em cultivo *in vitro*, e ainda pode ser integrado com plataformas de automação robótica.

Outras plataformas multiparamétricas estão disponíveis no mercado, apresentando características e funções muito similares ao *Operetta*, como é o caso da *CellInsight CX7 LZR* (ThermoFisher), *Opera Phenix* (PerkinElmer), *IN Cell Analyzer* (GE Healthcare Life Sciences), *ImageXpress* (Molecular Devices LLC), entre outras.

O uso do HCS aplica-se ao monitoramento de vários eventos celulares, como: apoptose, autofagia, ciclo celular, migração, diferenciação e proliferação celular. É capaz de avaliar também mudanças na morfologia da célula, rearranjos do citoesqueleto, expressão de proteínas, hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Além de poder ser usado para avaliar a eficácia de drogas em ensaios de citotoxicidade.

Recentemente, muitos estudos têm-se utilizado das plataformas de alto conteúdo para avaliar morte celular em células cancerosas.



Figura 7: Fotografia do sistema de imageamento de alto conteúdo – Operetta (PERKINELMER, 2018).

Um trabalho publicado em 2017 investigou o efeito citotóxico do anastrozol (inibidor da síntese de estrogênio através de competição reversível com a enzima aromatase, responsável pela produção de estrogênio) em células de câncer de mama, próstata e fígado, em que a permeabilidade celular, potencial de membrana mitocondrial, nível de citocromo c e intensidade nuclear, foram avaliados para detecção da apoptose após 24 horas de exposição à droga (HASSAN *et al.*, 2017). Na literatura, já é descrito um ensaio de sensibilidade a quimioterapia, chamado *ChemoID*, com intuito de medir a resposta das células tumorais cerebrais de pacientes a combinações de drogas que imitam o cronograma clínico. Porém, esse ensaio, utiliza o WST8, que é semelhante ao 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), um ensaio indireto da viabilidade celular por medir atividade metabólica mitocondrial baseado na redução metabólica do MTT a formazam (DENIZOT; LANG, 1986), para avaliação da viabilidade celular (MATHIS *et al.*, 2014) não utilizando o HCS, que seria mais vantajoso, trazendo rapidez aos testes de sensibilidade. Um estudo, recentemente publicado, usou a HCS para avaliar *in vitro* a sensibilidade de células de glioblastoma (em monocamada e

neuroesferas), derivadas de pacientes, frente a 83 quimioterápicos com e sem irradiação. A morte celular foi detectada através do corante DRAQ7, que não atravessa a membrana de células vivas (YU *et al.*, 2018). Dessa forma, foi possível avaliar o efeito citotóxico dessas drogas nas células de cada paciente.

Diante do que foi exposto, a utilização da HCS para avaliação da resposta de glioblastomas após tratamento com inibidores de CDKs e quimioterápicos pode se tornar uma poderosa ferramenta na detecção preditiva de sensibilidade ou resistência destes tumores frente a diferentes combinações de tratamento.

2.6 SONDAS

A morte celular e a autofagia, induzidas por quimioterápicos, podem ser avaliadas *in vitro* através da incubação com sondas na plataforma multiparamétrica. Para a marcação de morte celular sondas como BOBO-3, *CellEvent* (Caspase 3/7) e Kit *LIVE/DEAD Cell* podem ser usadas. BOBO-3 é uma sonda fluorescente com alta afinidade por ácidos nucleicos e impermeável às membranas celulares, usada para marcar células necróticas, onde há perda de integridade da membrana (THERMO FISHER, 2018a). O kit *CellEvent* é composto de um substrato, não fluorescente e permeável, da enzima caspase 3/7, que entra nas células e ao ser metabolizado por esta enzima, gera uma sonda fluorescente, o que serve como marcador da ativação de caspase 3/7 no citoplasma celular (THERMO FISHER, 2018b) A presença de caspase 3/7 ativada caracteriza a apoptose. Já o Kit *LIVE/DEAD Cell* avalia a viabilidade das células através da integridade da membrana plasmática e da atividade da esterase (THERMO FISHER, 2018c). Para a detecção de autofagia podem ser utilizadas sondas marcadoras de compartimentos ácidos. Dentre elas estão o laranja de acridina e o *lysotracker green*. A primeira cora o núcleo e o citoplasma das células com fluorescência verde e em um ambiente ácido passar emitir fluorescência vermelha (THOMÉ, 2013), e a segunda é uma sonda fluorescente verde, corando as vesículas ácidas em células vivas (THERMO FISHER, 2018d). E para a identificação dos núcleos celulares pode-se utilizar o Hoescht 33342, uma permeável às células emitindo fluorescência azul quando ligada ao DNA (THERMO FISHER, 2018e).

3 OBJETIVO

Definir os melhores parâmetros de aquisição e análise de imagens, bem como os melhores kits de sondas, com a finalidade de estabelecer um protocolo base para analisar morte celular e

autofagia em linhagens de glioblastoma, tratadas com quimioterápicos de primeira linha e inibidores de CDK.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar testes que possam definir:

- Densidade celular ótima em placa de 96 poços para permitir uma análise confiável;
- Tempo de incubação, concentração das sondas e tempo de exposição para aquisição da imagem;
- Número e disposição dos campos em cada poço da placa de 96 poços;
- Melhor lente objetiva a ser utilizada (20x, LD – *Long Distance* ou WA – *Wide Angle*);
- Sondas apropriadas para identificar autofagia (Laranja de acridina ou *Lysotracker Green*);
- Cálculo da intensidade de fluorescência para analisar autofagia: Fluorescência no vermelho ou RGIF – Razão da fluorescência do vermelho sobre o verde (THOMÉ et al., 2016);
- Sondas apropriadas para identificar morte celular (BOBO-3, *Live/Dead Cell* ou Caspase 3/7);
- Leitura da placa em células vivas ou fixadas;
- *Pipeline* de análise no *software Columbus*;
- Aplicação da padronização nas linhagens de glioblastoma utilizando quimioterápicos e inibidores de CDKs.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES E CULTIVO CELULAR

As linhagens tumorais **T98G** (glioblastoma humano - código ATCC: CRL-1690), **U87MG** (glioblastoma humano, Astrocitoma, classificadas como grau IV a partir de 2007 - código ATCC: HTB-14), foram originalmente vendidas pela *American Type Culture Tissue* (ATCC, EUA). Todas as linhagens tumorais são mantidas congeladas em nitrogênio líquido e cultivadas em meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Essas linhagens celulares são testadas uma vez por mês para contaminação por micoplasma usando o Kit *MycoAlert Plus* (Lonza). As linhagens foram inicialmente certificadas por tipagem genética,

por perfis de *Short tandem repeats* (STR), para certificação das linhagens, pelo Laboratório Sonda na UFRJ.

4.2 TESTE INICIAL DE RASTREAMENTO DE MORTE CELULAR EM LARGA ESCALA

Os testes a serem realizados com as linhagens de glioblastoma foram definidos a partir de um rastreamento da linhagem de cólon HCT116 (carcinoma colorretal humano – código ATCC: CCL – 247) que já tinha sido realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa do laboratório. Foi feita uma placa de 96 poços com 10.000 células por poço que ficou incubada por 24 horas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂. Após isso, houve a aplicação dos seguintes inibidores de CDK e quimioterápico, sozinhos e/ou combinados, por 24 horas:

- Abemaciclibe 1: 120 nM / Abemaciclibe 2: 400nM - MCE MedChem Express/USA #HY-16297. Inibidor de CDK4 e CDK6.

- Palbociclibe 1: 200 nM / Palbociclib 2: 500 nM - MCE MedChem Express/USA #HY-50767. Inibidor de CDK4 e CDK6.

- Irinotecano: 8 µM - Doação INCA. Inibidor de topoisomerase I. Leva ao dano do DNA, que não é corrigido de forma eficaz, resultando em apoptose.

Por fim, essas células foram incubadas por 20 minutos na estufa a 37 °C 5% de CO₂ com um coquetel de sondas de marcação celular: Iodeto BOBO-3 (0,75 µM, Molecular Probes), Hoescht 33342 (1 µM, Molecular Probes) e *CellEvent* (2 µM, Molecular Probes). Essas sondas foram diluídas em *Hank's Balanced Salt Solution* - *HBSS* (Sigma-Aldrich), solução salina isotônica, pH 7,4. Após a incubação, foi feita 1 lavagem com essa solução, permanecendo nesta (100 µL por poço) para a leitura no *Operetta* (Perkin Elmer *Columbus Image Data Storage and Analysis System*) no IDOR. As imagens foram adquiridas com tempo de exposição de 100 ms. Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.3 TESTE DE DENSIDADE CELULAR

As linhagens de glioblastoma, T98G e U87MG, foram plaqueadas em 3 densidades diferentes: 2.500, 5.000 e 7.500 células por poço em uma placa de 96 poços. Esta placa ficou incubada por 5 dias em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Após esse tempo, as células foram marcadas com 1 µM de Hoescht 33342 diluído em *Tyrode* (139 mM NaCl 3 mM KCl 17 mM NaHCO₃ 12 mM Glicose 3 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂, pH 7,4) e incubadas por 20 minutos em estufa, nas mesmas condições anteriores. Em seguida, foram feitas 2 lavagens com *Tyrode*, e adicionados 100 µL desta solução por poço para a leitura no *Operetta*. Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.4 PLAQUEAMENTO DA LINHAGEM T98G PARA TESTE DE SONDAS

As células T98G foram plaqueadas em placas de 96 poços. A densidade celular usada por poço foi escolhida com base no teste de densidade celular de acordo com o tempo de incubação necessário para o tratamento com o quimioterápico. Dessa forma, para uma incubação de 3 dias, correspondente ao tratamento de 24 horas, foram plaqueadas 5.000 células, e para 5 dias (tratamento de 72 horas) foram avaliadas as condições de 1.500 e de 2.000 células por poço.

4.5 TESTE DA LENTE OBJETIVA 20X *LONG DISTANCE* (LD) E *WIDE ANGLE* (WA)

Foi feita uma placa de 96 poços com 20.000 células por poço da linhagem U87MG que ficou incubada por 24 horas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂. Após isso, houve aplicação de dois tipos de controle positivo para autofagia: (1) tampão *Krebs - Ringer* pH 7.4 e (2) 1 e 10 µM de etoposídeo, inibidor de topoisomerase II que sabidamente induz autofagia nas células, por 24 horas (BIASOLI et al., 2013). Essas células foram incubadas por 20 minutos na estufa a 37 °C a 5% de CO₂ com 1 µg/mL de laranja de acridina (Merck Millipore No. 11300), um corante fluorogênico que pode ser utilizado para marcar vesículas ácidas. Essa sonda foi diluída em meio DMEM F12 com 10% de soro fetal bovino. Após a incubação, foi feita 1 lavagem com *Tyrode*, permanecendo neste (100 µL) para a leitura no Operetta. As imagens desse experimento foram adquiridas com a lente objetiva 20x LD.

Outro experimento foi feito com a mesma linhagem, nas mesmas condições apresentadas anteriormente, porém foi utilizada a lente objetiva 20x WA para aquisição das imagens.

Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.6 TESTE DE SONDAS PARA A DETECÇÃO DE AUTOFAGIA (LYSOTRACKER GREEN X LARANJA DE ACRIDINA)

Células T98G foram tratadas com *Krebs* por 3 horas e incubadas em estufa a 37 °C a 5% de CO₂. Após esse tempo, as células foram marcadas com *lysotracker green* - Thermo nas concentrações de 50 nM e 75 nM. Outro grupo de células foi marcado com laranja de acridina nas concentrações: 0,25, 0,5 e 0,75 µg/mL. As sondas foram diluídas em meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro e em *Krebs*, para aplicação nos poços controle e tratados, respectivamente, e incubadas por 30 minutos. A placa foi lavada 3x com *Tyrode* pH 7,4 e deixada neste (100 µL) para a leitura no *Operetta*.

Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.6.1 Cálculo da intensidade de fluorescência para detecção de autofagia

O cálculo da intensidade de fluorescência da célula foi feito baseado no experimento do teste de sondas para detecção de autofagia onde se usou o laranja de acridina como marcador de vesículas ácidas. Para calcular a intensidade de fluorescência no vermelho (IFVM), usamos a fórmula:

$$\frac{\text{Média IFVM}}{\text{Número de células}}$$

Para calcular o RGIF, razão da fluorescência do vermelho (IFVM) sobre o verde (IFVE):

$$\frac{\frac{\text{Média IFVM}}{\text{Número de células}}}{\text{Média IFVE}}$$

Ambas as fórmulas foram inseridas e calculadas no programa de análise *Columbus*.

4.7 TESTE DE SONDAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR

4.7.1 Bobo-3

Células T98G foram tratadas com 10 μM de etoposídeo (VP-16), quimioterápico de segunda linha, e 400 μM de irinotecano por 24 horas, incubadas em estufa a 37 °C 5% CO_2 . Em seguida, as células foram marcadas com 0,5 μM de Hoescht 33342 e 0,75 μM de BOBO-3. No segundo experimento, células T98G foram tratadas com etoposídeo 10 μM por 24 horas e *Krebs - Ringer* (tampão indutor de autofagia, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 4.2 mM NaHCO_3 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM glicose e 10 mM Hepes, pH 7.4) por 3 horas, incubadas em estufa a 37 °C 5% CO_2 . Depois, as células foram marcadas com 0,5 μM de Hoescht 33342 e, 0,5 e 0,1 μM de BOBO-3. As sondas foram diluídas em *Tyrode* pH 7,4 e incubadas por 30 minutos em estufa. Logo após, foram feitas 3 lavagens com *Tyrode* e adicionados 100 μL desta solução para leitura no *Operetta*. As imagens foram adquiridas com tempo de exposição de 200 ms.

Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.7.2 Caspase 3/7

Células T98G foram tratadas com etoposídeo 10 μM por 24 horas e incubadas em estufa a 37 °C 5% CO_2 . Em seguida, as células foram marcadas com 0,5 μM de Hoescht e 2 μM do substrato de caspase 3/7. Um segundo experimento foi feito, nas mesmas condições, mudando

apenas a concentração da caspase 3/7. Foi mantida a concentração de 2 μM do experimento anterior e acrescentada a concentração de 1 μM . As sondas foram diluídas em *Tyrode* pH 7,4 acrescido de 5% de soro fetal bovino e incubadas por 40 minutos em estufa. Logo após, foram feitas 3 lavagens com *Tyrode* e adicionados 100 μL desta solução para leitura no *Operetta*. As imagens foram adquiridas com tempo de exposição de 200 ms.

Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.7.3 Kit *LIVE/DEAD Cell*

As células T98G foram tratadas com etoposídeo 10 μM por 24 horas e incubadas em estufa a 37 °C 5% CO_2 . Depois a placa foi lavada com *Tyrode* para diminuir a atividade da esterase presente no meio suplementado com soro. As células, em seguida, foram marcadas com 0,5 μM de Hoescht 33342 e com o Kit *Live/Dead Cell* – Molecular Probes (0,5 μM de calceína e 2 μM de homodímero de etídeo, *EthD-1*). Esse Kit é composto por 2 sondas, calceína AM e homodímero de etídeo. As sondas foram diluídas em *Tyrode* e incubadas por 30 minutos em estufa. Logo após, foram feitas 3 lavagens com *Tyrode* pH 7,4 e adicionados 100 μL desta solução para leitura no *Operetta*. As imagens foram adquiridas com tempo de exposição de 200 ms.

Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.8 TESTE DE LEITURA DA PLACA EM CÉLULAS FIXADAS

Células T98G foram tratadas com etoposídeo (VP-16) 10 μM e irinotecano 400 μM por 24 horas, incubadas em estufa a 37 °C 5% CO_2 . Em seguida, as células foram marcadas com 1 μM de Hoescht 33342 e 0,75 μM de BOBO-3. As sondas foram diluídas em *Tyrode* pH 7,4 e incubadas por 30 minutos em estufa. Logo após, foram feitas 3 lavagens com *Tyrode* e adicionados, em seguida, 100 μL de formaldeído (PFA) 4%, diluído em PBS (PBS 10x: 1.37 M NaCl 26.8 mM KCl 80.5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 14,7 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) por 15 minutos. A placa foi lavada 3x com *Tyrode* e depois foi adicionado 1 gota de glicerol puro (Sigma-Aldrich) para a leitura no *Operetta*.

Foi realizado 1 experimento em triplicata.

4.9 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE (MTT)

Neste ensaio de viabilidade e proliferação celular, faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço 20 μL da solução de MTT a 5 mg/mL diluído em PBS. Após o término dessas 4 horas, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado.

Em seguida, em cada poço foram adicionados 100 μ L de DMSO. Após solubilização dos cristais de formazam formados pela metabolização do MTT nas células viáveis, a densidade óptica foi lida no leitor de microplacas *FlexStation* a um comprimento de onda de 570 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em 3 experimentos independentes.

4.10 CÁLCULO DO EC₂₀ DOS QUIMIOTERÁPICOS E INIBIDORES DE CDKS

O EC₂₀ (concentração efetiva da droga que induz 20% do efeito máximo) foi calculado pelo software GraphPrism 6.0 através de uma análise XY, curva de regressão não linear, log (inibidor) *versus* resposta normalizada – curva variável e interpolação dos valores de X em curva padrão desconhecida com intervalo de confiança de 95%.

4.11 WESTERN BLOTTING

Na extração de proteínas, as células foram lavadas com PBS gelado e submetidas à lise com tampão de extração UTB (Tris-HCl 75 mM, uréia 9 M), pH 7,4. O extrato proteico contendo 40 μ g de proteína por amostra foi diluído em tampão de amostra (SDS 10%, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 20%, Tris-HCl 0,2 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,05 %) e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em uma concentração de 8%. Para a transferência de proteínas, as membranas de nitrocelulose (*PerkinElmer Life*) foram previamente ativadas com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,2%) acrescentado de 20% de metanol. Em seguida, o gel foi submetido à corrente de 0,22 ampere (A) por 1 hora e 20 minutos, utilizando o equipamento de eletrotransferência da *Bio Rad* e solução tampão para a transferência. As membranas foram bloqueadas com solução de 3% de Albumina de Soro Bovino - BSA (*Sigma-Aldrich*) em TBS-T (cloreto de sódio 150 mM, Tris base 10 mM, tween 20 a 0,1%). Depois, foram incubadas com anticorpo primário para avaliar a presença de RB fosforilado anti-ppRB Ser^{807/811} (*Cell Signaling*, 1:1000) e com anticorpo GAPDH (*Santa Cruz*, 1:1000) e beta-actina (*Sigma*, 1:2000) como controle de carregamento a 4° por, aproximadamente 16 horas. A seguir procedeu-se a lavagem da membrana com TBS-T, seguida com incubação de anticorpo secundário, conjugado à peroxidase HRP na diluição de 1:500 (*rabbit*), 1:1000 (*goat*) e 1:2000 (*mouse*), respectivamente. As bandas foram visualizadas utilizando um sistema de quimioluminescência através do aparelho ChemiDoc XRS System (*BioRad*).

Foi realizado 1 experimento independente.

4.12 RASTREAMENTO DE MORTE CELULAR EM LARGA ESCALA DA LINHAGEM T98G

As células T98G foram tratadas com 400 μM de Temozolamida (TMZ), 0,4% de DMSO (dilúente da TMZ) e 1000 nM de Palbociclibe por 72 horas e incubadas em estufa a 37 °C a 5% CO_2 . Em um outro experimento, as células T98G foram tratadas com 100 e 400 μM de TMZ, 500 e 1000 nM de Abemaciclibe e Palbociclibe (inibidores de CDK-4/6) e 0,1 e 0,4% de DMSO por 72 horas. Nos 2 experimentos, os tratamentos foram feitos usando os compostos individualmente e em combinação. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas com *Tyrode* e incubadas com o *Live/Dead Cell* (0,5 μM de calcéina e 2 μM de homodímero de etídeo) por 30 minutos em estufa. As sondas foram diluídas em *Tyrode* pH 7,4. Em seguida, foram feitas 3 lavagens com *Tyrode* e 100 μL dessa solução foram adicionados nos poços para a leitura no *Operetta*.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata em 3 experimentos independentes.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância dos resultados foi realizada no *software GraphPadPrism 6.0* pelo teste *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Tukey*, um pós-teste de análise de significância de diferenças que compara as amostras entre si e com o controle. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rastreamento em larga escala é uma ferramenta que permite que mudanças morfológicas e bioquímicas na célula sejam identificadas e analisadas rapidamente, possibilitando uma visão ampla, por exemplo, dos efeitos dos quimioterápicos nas células. Dessa forma, combinações de drogas *in vitro* poderiam ser testadas em linhagens tumorais com a finalidade de se obter a melhor combinação de quimioterápicos para o tratamento de um determinado câncer. E eventualmente, essa expertise de testes em larga escala pode ser útil no futuro, para personalizar o tratamento de pacientes com câncer, uma vez que suas células tumorais poderiam ser tratadas previamente *in vitro* com os quimioterápicos e assim definir a melhor combinação de drogas a ser usada (YU *et al.*, 2018).

Mas, para isso, o primeiro passo é estabelecer os melhores parâmetros de aquisição e análise das imagens em uma plataforma de rastreamento para avaliação morte celular.

5.1 TESTE DE DENSIDADE CELULAR

Para saber quais as densidades celulares ótimas das linhagens de glioblastoma a serem plaqueadas em uma placa de 96 poços com a finalidade de permitir a identificação máxima dos núcleos pelo algoritmo *Find Nuclei* do programa de análise, foi realizado um teste de densidade celular com as linhagens U87MG e T98G. Foram plaqueadas 3 densidades para ambas as linhagens: 2.500, 5.000 e 7.500 células/0,34 cm². Ao final da simulação de 72 horas de tratamento, tempo necessário para a incubação com temozolamida (quimioterápico de primeira linha em glioblastomas), foi feita a leitura. Na **figura 8**, observa-se que a forma de crescimento dessas células é bastante diferente.

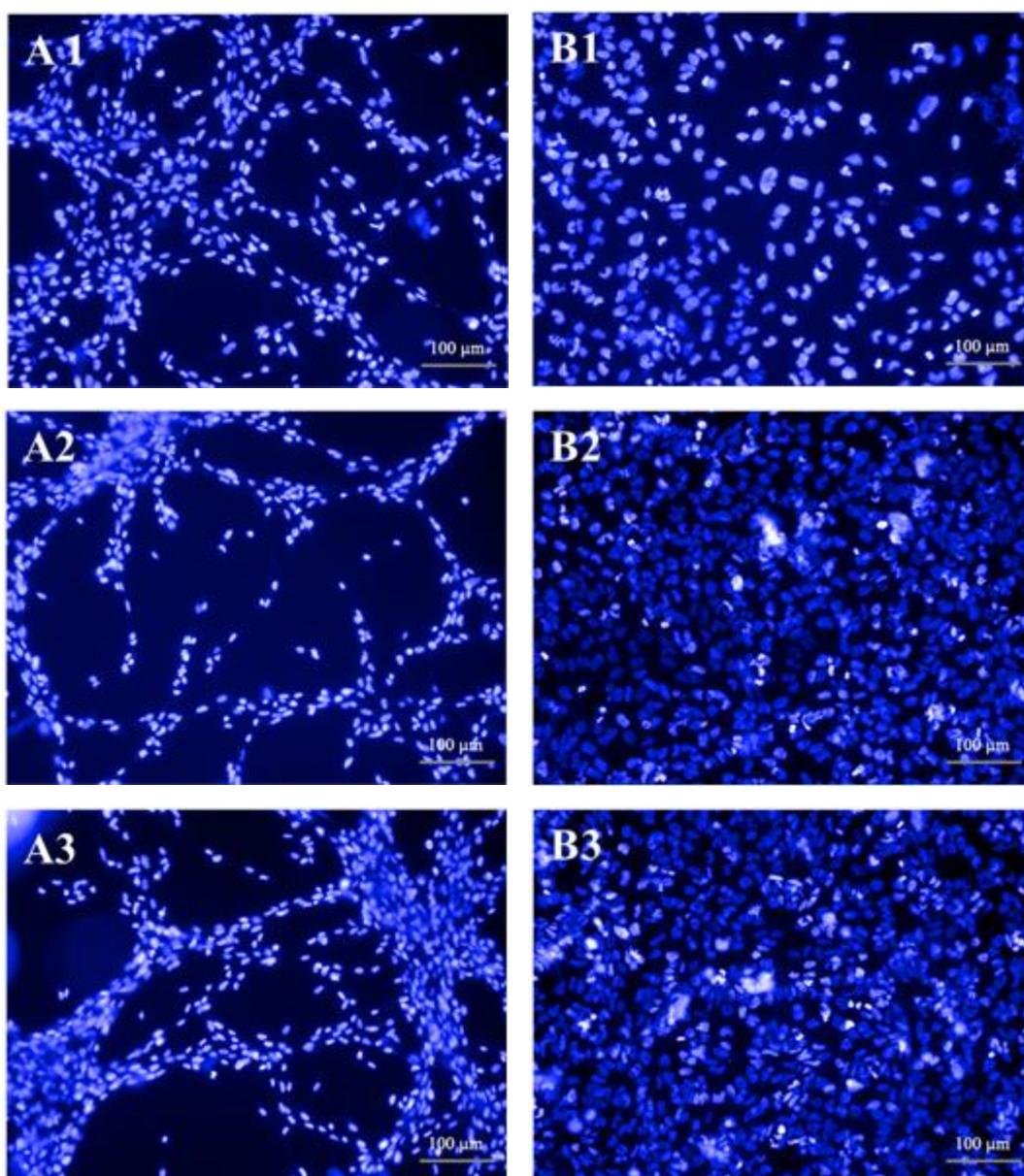


Figura 8: Teste de densidade celular ótima das linhagens U87MG (A) e T98G (B) em placa de 96 poços. Fotomicrografias dos núcleos das células, após a simulação de 72 horas de tratamento, marcados com Hoescht 33342 (Excitação/Emissão: 350/461 nm). As densidades inicialmente plaqueadas foram: 2.500 (1), 5.000 (2) e 7.500 (3) células por 0,34 cm². A concentração da sonda usada foi de 1 µM e incubada por 20 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Uma densidade alta da célula U87MG favorece a formação de grumos, e isso pode dificultar a contagem de núcleos pelo programa de análise, como pode ser visto no gráfico da **figura 9**. No caso da T98G, o programa de análise consegue identificar os núcleos celulares mesmo em uma densidade mais alta.

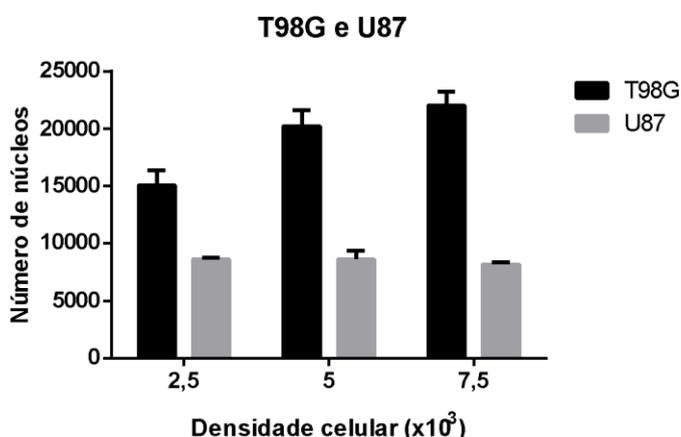


Figura 9: Gráfico de contagem do número de núcleos das linhagens T98G e U87MG após a simulação de 72 horas de tratamento em placa de 96 poços. 3 densidades diferentes de células foram plaqueadas: 2.500 células, 5.000 células e 7.500 células por $0,34 \text{ cm}^2$. N=1 experimento realizado em triplicata.

Dessa forma, sugere-se, que a densidade mais baixa de 2.500 células para um tratamento de 72 horas é suficiente para a linhagem U87MG, possibilitando a identificação dos núcleos pelo programa de análise. Já a T98G, como tem uma taxa de proliferação acelerada, o plaqueamento de 2.500 células ainda foi alto, deixando o controle 100% conflente. Assim, a T98G pode ser plaqueada em uma densidade ainda mais baixa, cerca de 1.500 células/ $0,34 \text{ cm}^2$, para esse mesmo tempo de tratamento, como mostram os experimentos das **figuras 53 e 54**.

5.2 TESTE DO TEMPO DE INCUBAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E TEMPO DE EXPOSIÇÃO DAS SONDAS

Resultados prévios do laboratório mostraram através da linhagem de cólon HCT116, conforme demonstrado na **figura 10 (A)** (DELOU, 2015, dados não publicados), a não identificação de muitos dos núcleos pelo programa de análise, sugerindo a necessidade de padronização em relação ao tempo de incubação, concentração e exposição das sondas, que foi realizada na linhagem utilizada neste trabalho. Com esse teste inicial na linhagem HCT116, concluiu-se que: 1- O tempo de exposição para aquisição da imagem deveria ser aumentado (apenas células muito marcadas estavam sendo identificadas pelo programa de análise); 2- A densidade celular ótima do poço é crucial para identificação correta dos núcleos (alta densidade celular impede a correta identificação dos núcleos); 3- O tempo de incubação e concentração

das sondas (Hoescht 33342, BOBO-3 e Caspase 3/7) precisariam ser alterados. Ajustes tanto no tempo de incubação quanto na concentração foram necessários no Hoescht 33342 para melhor identificação dos núcleos. Hoescht 33342 é uma sonda fluorescente intercalante de DNA permeável às células e usada como um marcador total de núcleos celulares. O tempo de exposição dos filtros utilizados para aquisição da imagem passou de 100 para 200 ms. O tempo de incubação das sondas (Hoescht 33342, BOBO-3 e Caspase 3/7) passou a ser feito em 30 minutos. A concentração do Hoescht (marcador de núcleos) foi diminuída para 0,5 μM .

Na **figura 10 (B)**, observa-se que os ajustes feitos para o Hoescht 33342 juntamente com a densidade celular ótima para uma placa de 96 poços (máximo de 2.000 células por poço) na linhagem T98G, corrigiram os problemas iniciais: núcleos muito próximos uns dos outros dificultando a contagem correta do número de células.

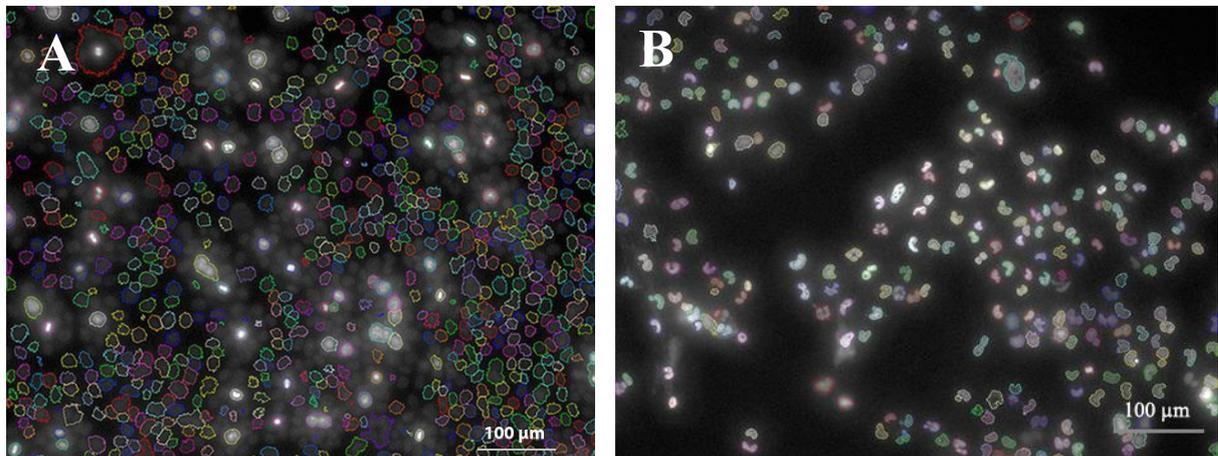


Figura 10: Teste do tempo de incubação, concentração e exposição das sondas. Análise dos núcleos das células HCT116 (A) e T98G (B) identificados com Hoescht 33342 e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Nuclei*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

5.3 TESTE DO NÚMERO E DISPOSIÇÃO DOS CAMPOS NO POÇO DE UMA PLACA DE 96 POÇOS

Nos primeiros experimentos, a disposição dos campos escolhidos para aquisição da imagem era feita em formato de cruz no centro do poço e espalhados nas extremidades, como pode ser observado na **figura 11 (A)**. Porém, o centro do poço tende a ficar mais cheio, fazendo com que as células fiquem mais juntas ou formem grumos, dificultando a contagem de células posteriormente pelo programa de análise. Os campos das extremidades por sua vez, são prejudicados pelas ponteiros das pipetas (que raspam as células) no momento da lavagem da placa. Posteriormente, escolheu-se fazer uma ampla distribuição dos campos pelo poço, somando ao todo 17 campos. Isso evitaria o risco de ter uma área do poço sem células, uma vez que estas, sensibilizadas pelos quimioterápicos, tendem a se soltar da placa (**Figura 11 - B**).

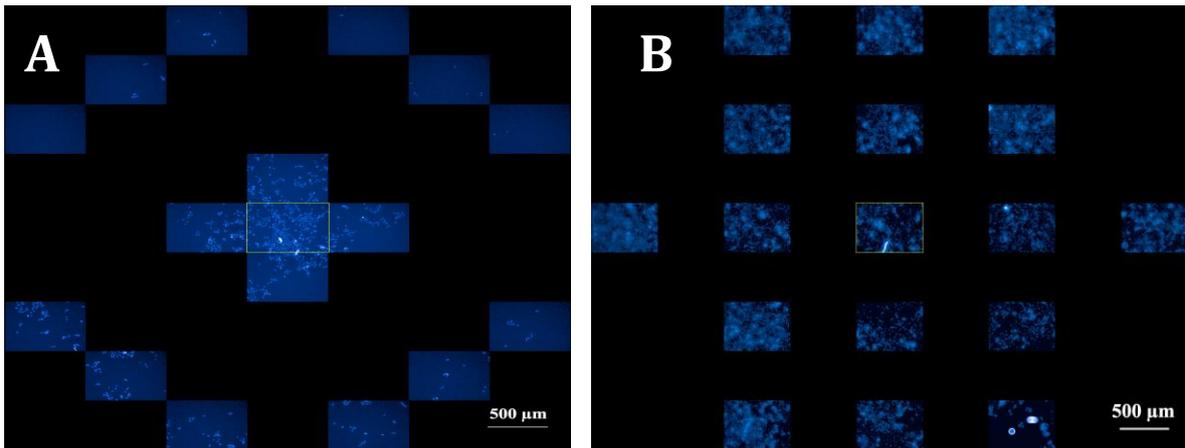


Figura 11: Teste do número e disposição dos campos em cada poço da placa de 96 poços. Fotomicrografias de 1 poço de uma placa de 96 poços da linhagem T98G não tratada (controle) com os núcleos identificados por Hoescht 33342. (A) Os campos estão distribuídos no centro dispostos em cruz e nas extremidades. (B) Campos amplamente distribuídos totalizando 17 campos por poço. As fotos dos campos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

5.4 TESTE DALENTE OBJETIVA DE 20X A SER UTILIZADA

Lentes objetivas diferentes foram testadas neste ensaio: a lente objetiva 20x LD (*Long Distance*), onde a distância de trabalho entre a lente da objetiva e a amostra focalizada é mais longa, podendo ser utilizada em superfícies de cultivo mais espessas, e WA (*Wide Angle*), apresenta distâncias focais menores, possuindo um campo amplo de visão.

Para detectar a ocorrência de autofagia foi feita uma marcação com laranja de acridina em células U87MG. O laranja de acridina cora o citoplasma e o núcleo celulares com fluorescência verde e em um ambiente ácido passa a emitir fluorescência vermelha (THOMÉ, 2013). Dessa forma, células U87MG foram tratadas com *Krebs*, um tampão indutor de autofagia, usado como controle positivo, e etoposídeo 1 e 10 μM , que é um quimioterápico que também induz autofagia nas linhagens de GBM usadas (BIASOLI *et al.*, 2013). Como mostra a **figura 12**, as imagens foram adquiridas com a lente LD e pareceu ser melhor por apresentar uma imagem mais nítida, permitindo visualizar mais claramente as vesículas ácidas, apontadas pelas setas em (B).

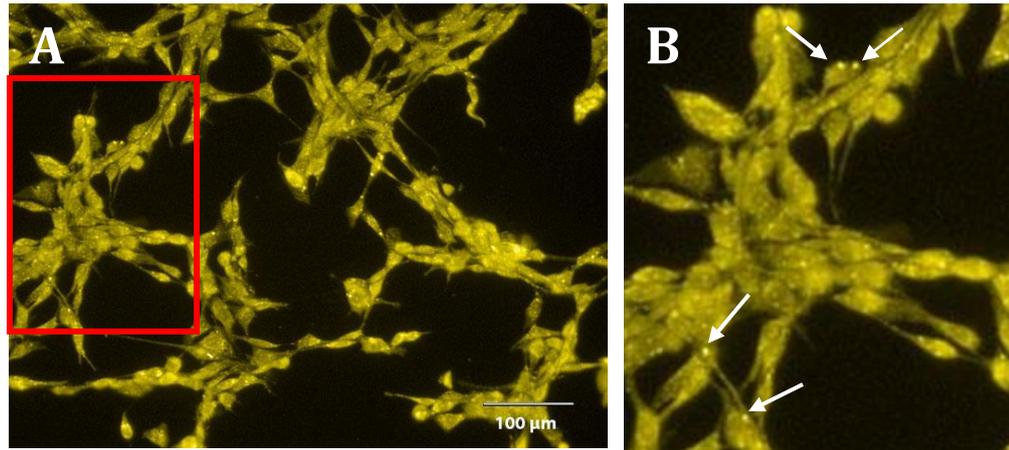


Figura 12: Teste da lente objetiva 20x a ser utilizada (LD). Fotomicrografia de fluorescência vermelha de células U87MG tratadas 24 horas com etoposídeo (VP-16) 1 μ M marcadas com 1 μ g/mL de laranja de acridina (Excitação/Emissão: 490-510/560-630 nm) por 20 minutos tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD (*Long Distance*). Em (A) a região delimitada de vermelho representa a área aumentada, mostrada em (B). As setas indicam as vesículas ácidas. N=1 experimento realizado em triplicata.

Outro ensaio de autofagia foi feito, e a imagem foi adquirida por uma lente objetiva de 20x WA, que teve uma resolução pior que a lente LD (**Figura 13**). Outra desvantagem da lente WA, como fica mais próxima da amostra, tende a esbarrar nas bordas da placa de 96 poços, o que resulta na não utilização dos poços das bordas. Dessa forma com o uso da WA, o aproveitamento de cada placa é menor, já que somente 60 poços podem ser usados. Assim, a melhor opção foi usar a lente 20x LD.

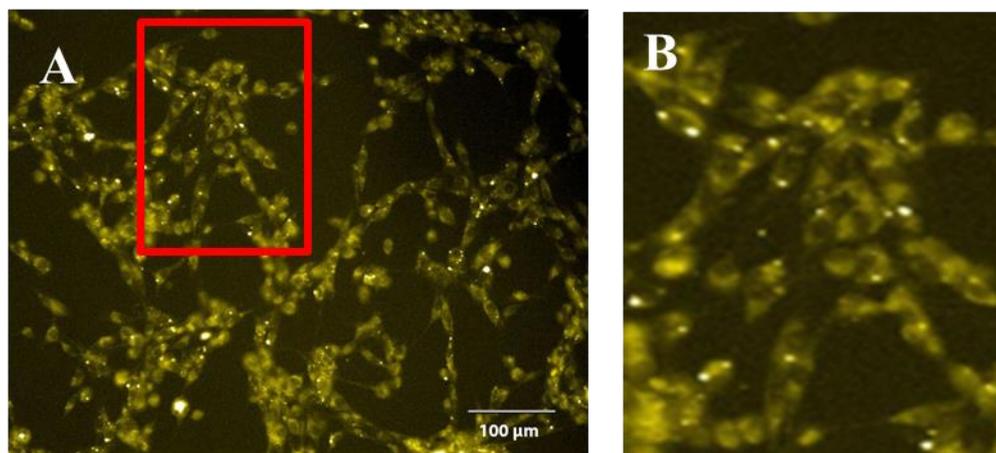


Figura 13: Teste da lente objetiva 20x a ser utilizada (WA). Fotomicrografia de fluorescência vermelha de células U87MG tratadas por 24 horas com etoposídeo (VP-16) 1 μ M marcadas com 1 μ g/mL de laranja de acridina (Excitação/Emissão: 490-510/560-630 nm) por 20 minutos tirada no *Operetta* com objetiva de 20x WA (*Wide Angle*). Em (A) a região delimitada de vermelho representa a área aumentada, mostrada em (B). N=1 experimento realizado em triplicata.

5.5 TESTE DE SONDAS PARA DETECÇÃO DE AUTOFAGIA

Para identificação de autofagia em uma plataforma HCS, foram testadas 2 sondas: laranja de acridina e *lysotracker green*, ambos marcadores de compartimentos ácidos nas células. O

lysotracker green, sonda fluorescente verde que cora compartimentos ácidos em células vivas (THERMO FISHER, 2018d), foi incubado nas células T98G por 30 minutos e usado em 2 concentrações: 50 nM e 75 nM. Como mostra a **figura 14**, foi observada marcação nas 2 concentrações, sendo possível visualizar nitidamente as vesículas ácidas. O programa de análise, usando o algoritmo *Find Spot*, conseguiu identificar as vesículas ácidas das células. Nota-se um grande número de *spots* nas células tratadas com o tampão *Krebs*, indutor de autofagia (**Figura 15**). Apesar do mecanismo de ação do *lysotracker* não ser totalmente elucidado, ele tem sido utilizado na microscopia para visualização de organelas ácidas e para investigar o nível de autofagia através da medição de sua fluorescência (CHIKTE; PANCHAL; WARNES, 2014).

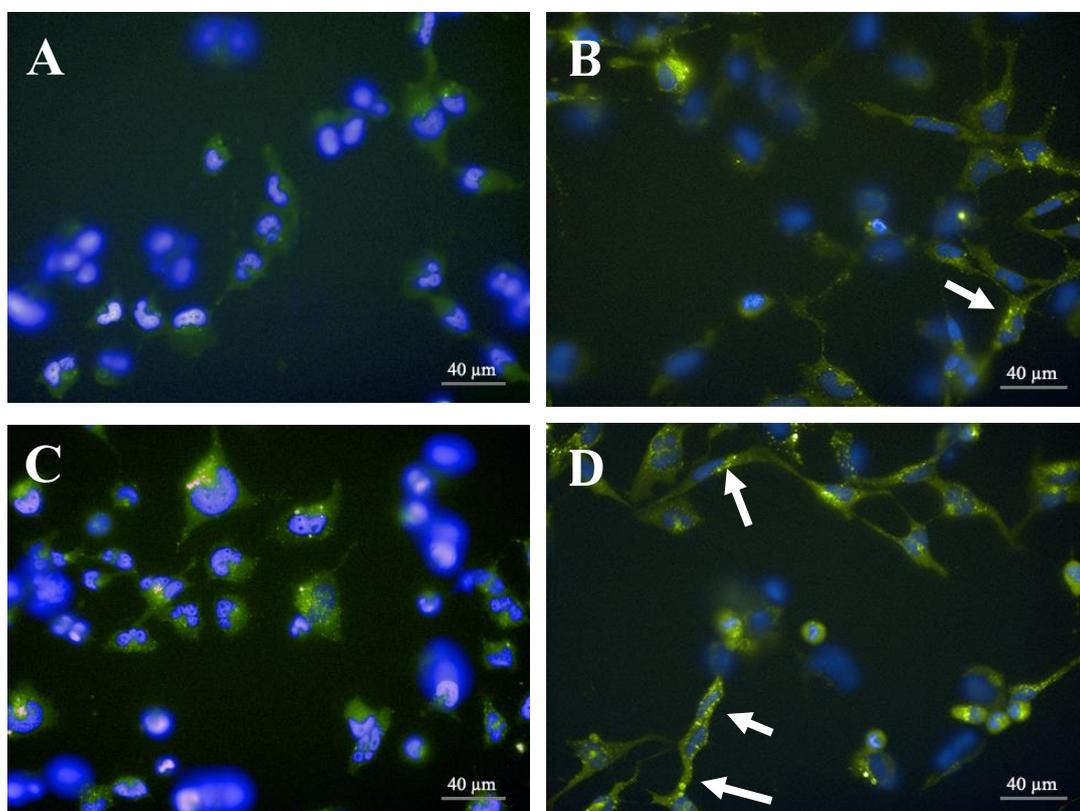


Figura 14: Teste de sondas para detecção de autofagia (*Lysotracker green*). Fotomicrografias de células T98G marcadas com 50 nM (A, B) e 75 nM (C, D) de *lysotracker green*. (A, C) Dupla marcação das células não tratadas (controle) com Hoescht 33342 (0,5 µM) identificando os núcleos em azul e *lysotracker green* (Excitação/Emissão: 504/511) corando o citoplasma em verde. (B, D) Dupla marcação das células tratadas com *Krebs* por 3 horas e coradas com Hoescht 33342 identificando os núcleos em azul e com *lysotracker green* corando o citoplasma em verde. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As vesículas ácidas (*spots*) são coradas mais intensamente pelo *lysotracker green*. As setas brancas indicam os *spots*. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x.

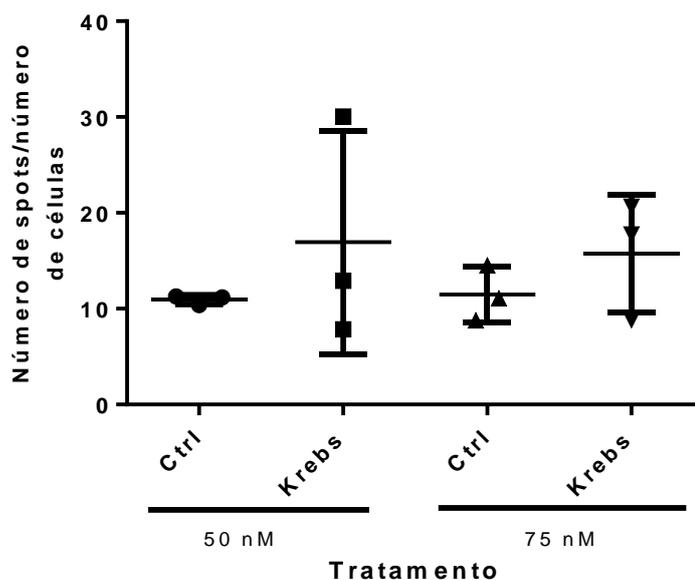


Figura 15: Gráfico do número de *spots* por número de células da linhagem T98G. As barras pretas representam a concentração de 50 nM de *lysotracker* e as barras cinzas a concentração de 75 nM. N=1 experimento realizado em triplicata.

Em seguida, como visto na **figura 16**, foi repetido esse mesmo experimento, porém, usando o laranja de acridina. Foram usadas 3 concentrações: 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,75 $\mu\text{g/mL}$. A concentração de 0,75 $\mu\text{g/mL}$ de laranja de acridina pareceu corar mais fortemente o citoplasma, não ficando tão perceptível os *spots* quando comparado as outras 2 concentrações. Houve diferença do número de *spots* entre as células não tratadas (controle) e as tratadas com Krebs, como mostra a **figura 17 (A)**. Porém, para fazer uma análise quantitativa da autofagia, seria mais confiável calcular a intensidade de fluorescência do citoplasma, uma vez que o algoritmo *Find Spot* não foi capaz de identificar todos os *spots* perceptíveis aos olhos humanos.

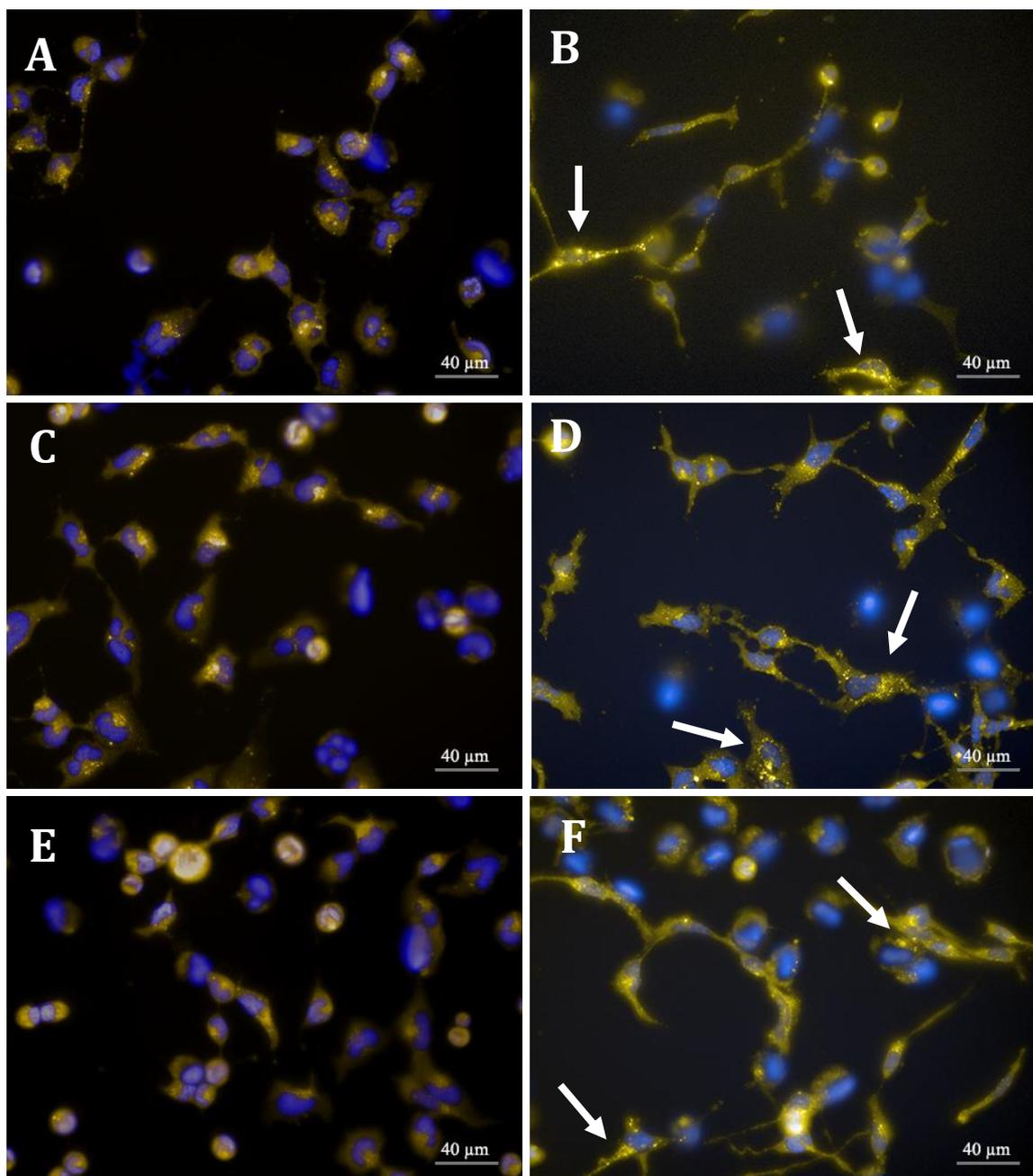


Figura 16: Teste de sondas para detecção de autofagia (Laranja de acridina). Fotomicrografias de células T98G marcadas com 0,25 µg/mL (A, B), 0,5 µg/mL (C, D) e 0,75 µg/mL (E, F) de laranja de acridina. (A, C e E) Dupla marcação das células não tratadas (controle) coradas com Hoescht 33342 (0,5 µM) identificando os núcleos e com laranja de acridina (Excitação/Emissão: 490-510/560-630 nm) marcando o citoplasma em amarelo. (B, D e F) Dupla marcação das células tratadas com Krebs por 3 horas e coradas com Hoescht 33342 identificando os núcleos e laranja de acridina marcando o citoplasma em amarelo. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As vesículas ácidas (*spots*) são coradas mais intensamente pelo laranja de acridina. As setas brancas indicam os *spots*. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x.

A intensidade de fluorescência foi calculada de duas maneiras diferentes: média da intensidade de fluorescência do vermelho sobre o número de células e razão da média da intensidade de fluorescência do vermelho sobre a média da intensidade de fluorescência do verde dividido pelo número de células, RGIF.

Um trabalho descrito na literatura mostrou que o aumento da concentração do laranja de acridina influencia no aumento de fluorescência vermelha. Quando se utiliza o RGIF, este muda linearmente com a concentração do laranja de acridina, desde que seja usado para detecção de fluorescência vermelha filtros que selecionem comprimentos de onda entre 620 e 700 nm (THOMÉ *et al.*, 2016).

A **figura 17** sugere um aumento da intensidade de fluorescência nas células tratadas com Krebs, em relação à intensidade das células não tratadas (controle) quando se utiliza o RGIF (C), comparado ao cálculo da intensidade de fluorescência do vermelho somente (B).

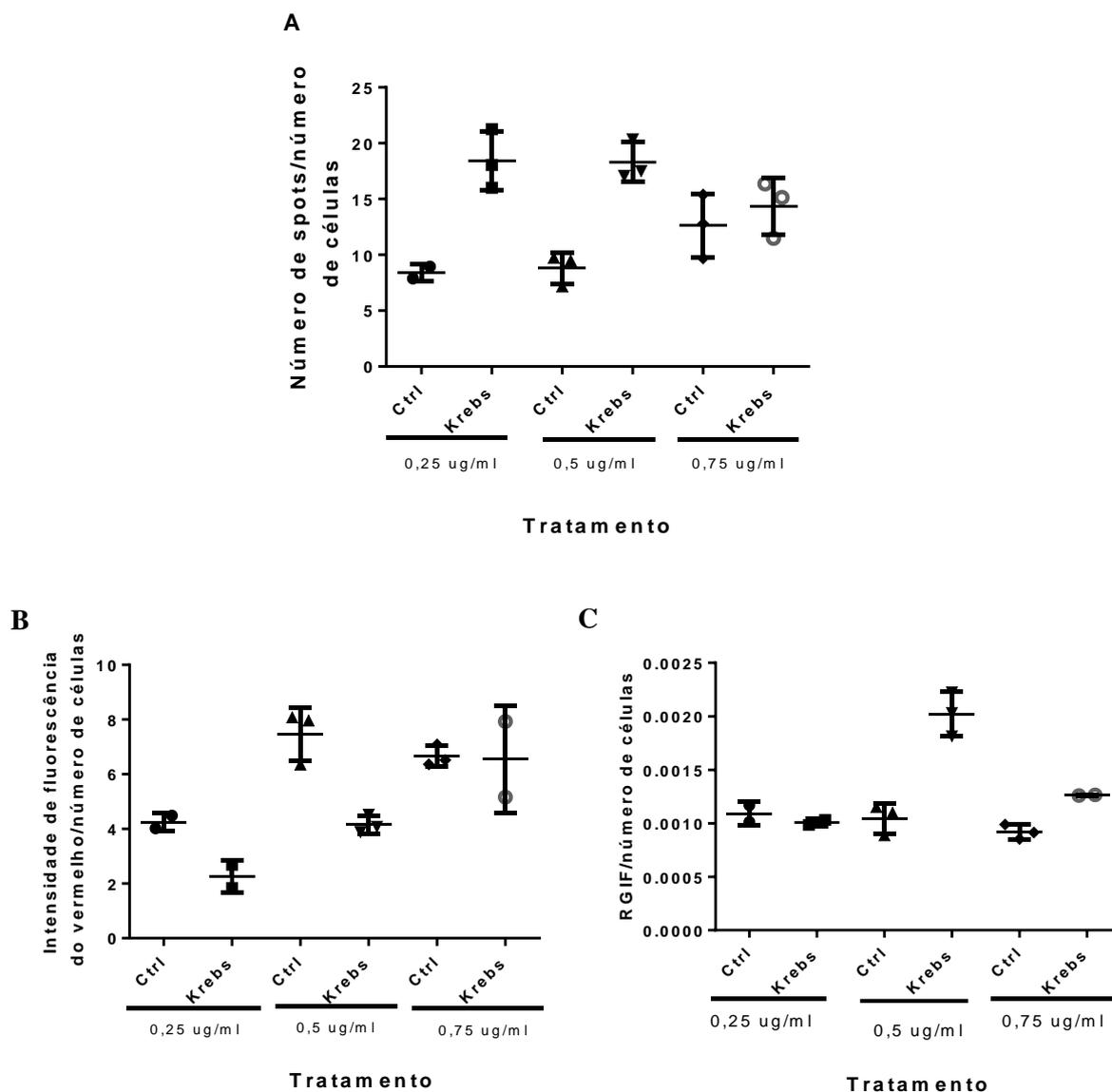


Figura 17: Gráficos do número de *spots* (A), da média da intensidade de fluorescência do vermelho (B) e da razão da média da intensidade de fluorescência do vermelho sobre a média da intensidade de fluorescência do verde, RGIF (C) por número de células da linhagem T98G. Foram usadas 3 concentrações de laranja de acridina: 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL e 0,75 µg/mL, incubadas por 30 minutos. As células foram tratadas com Krebs por 3 horas. N=1 realizado em triplicata.

Dentre os trabalhos descritos na literatura que utilizam corantes de vesículas ácidas para detectar autofagia, o *lysotracker* parece ser mais utilizado que o laranja de acridina. Corantes de compartimentos ácidos, como, laranja de acridina e *lysotracker*, estão entre os métodos mais antigos para monitorar autofagia. Porém, esses corantes são úteis para detectar vesículas ácidas, desde que o tempo de incubação e concentração não sejam excessivos, para não marcar fortemente a célula e não ser perceptível as diferenças no sinal de intensidade de fluorescência (KLIONSKY *et al.*, 2016).

A sonda fluorescente mais usada para identificação de autofagia é a GFP-LC3, que é a junção de um marcador de autofagossoma (LC3) e de uma proteína fluorescente verde (GFP) (CHEN *et al.*, 2013), que é transfectada nas células. Para este trabalho, o uso de corantes para compartimentos ácidos já possibilita a execução de testes iniciais da resposta tumoral frente a quimioterápicos em uma plataforma HCS, possibilitando saber assim, quais combinações e situações valeriam a pena serem investigadas com marcadores mais específicos de autofagia, mas que requerem métodos mais complexos como a transfecção de um gene repórter.

5.6 TESTE DAS SONDAS PARA DETECÇÃO DE MORTE CELULAR

Com intuito de estabelecer a melhor sonda a ser usada para identificar morte celular, foram feitos ajustes no tempo de incubação e no valor da concentração das sondas anteriormente usadas (BOBO-3 e caspase 3/7) e uma terceira sonda foi testada, o *LIVE/DEAD Cell*.

Na **figura 18**, a célula T98G encontra-se marcada com BOBO-3 na concentração de 0,75 μM e com tempo de incubação de 30 minutos. Os valores iniciais de concentração e incubação foram baseados em trabalhos do grupo de pesquisa do IDOR. BOBO-3 é uma sonda fluorescente com alta afinidade por ácidos nucléicos e supostamente impermeável às membranas celulares, usada para marcar células com perda de integridade de membrana (necrose). Segundo o fabricante *Molecular Probes*, essa sonda, fluorescente e impermeável a membrana plasmática de células vivas, possui alta afinidade por ácidos nucleicos havendo aumento de 100 a 1000 vezes na fluorescência após sua ligação ao DNA (THERMO FISHER, 2018a).

Porém, houve marcação do citoplasma na grande maioria das células não tratadas. Nota-se que apenas o núcleo dessas células não foi marcado, sendo possível visualizar o espaço dos núcleos sem marcação, sugestivo de que as células estariam vivas. Já algumas poucas células, tanto o citoplasma quanto o núcleo foram corados com BOBO-3 nessas condições. Estas células apresentam uma morfologia de núcleos condensados e arredondados condizente com uma célula morta como mostra as setas brancas. (Figura 18).

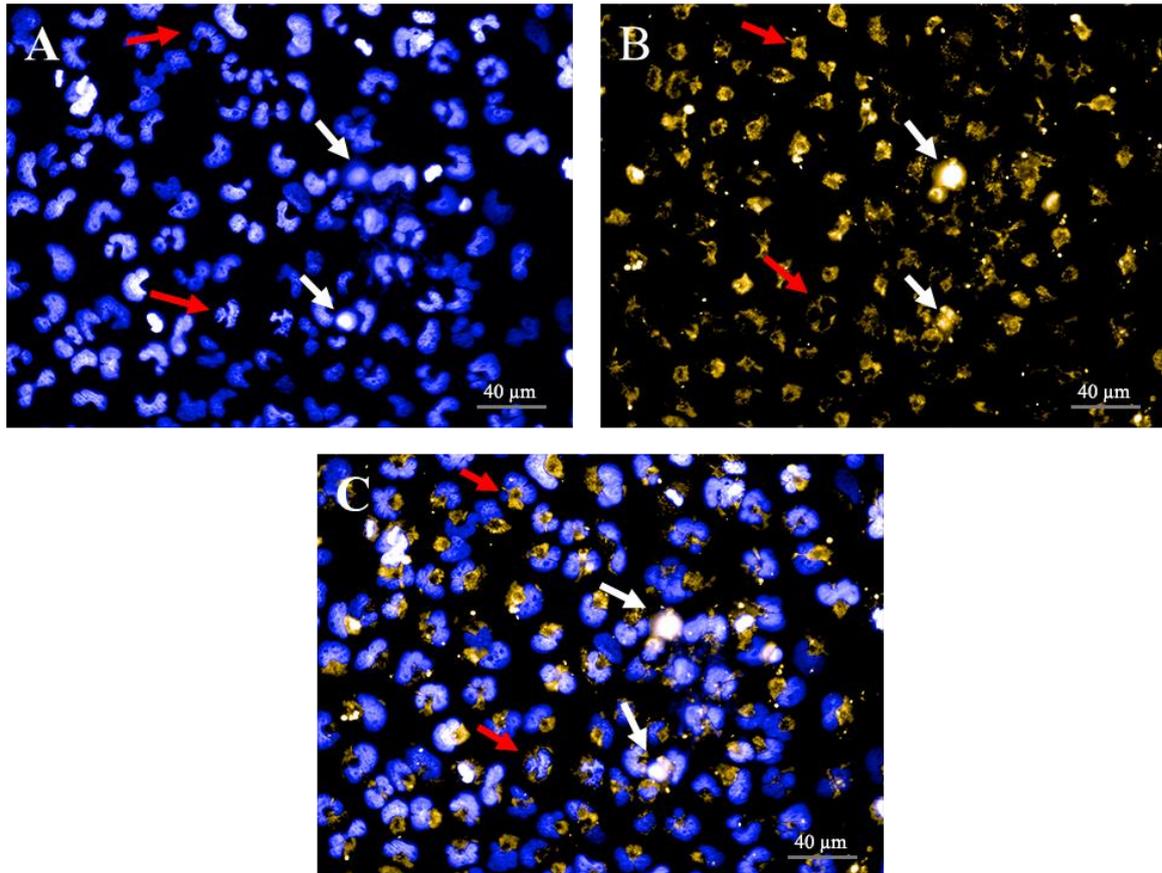


Figura 18: Teste de sondas para detecção de morte celular (BOBO-3 – 75 μM). Fotomicrografias das células T98G não tratadas (controle) marcadas com 0,75 μM BOBO-3 (Excitação/Emissão: 570/602 nm). (A) Núcleos identificados com Hoescht 33342 (0,5 μM). (B) Células marcadas apenas com BOBO-3. (C) Células com dupla marcação. As setas brancas indicam as células mortas, onde o BOBO-3 marcou totalmente a célula, inclusive o núcleo. As setas vermelhas mostram as células vivas, coradas apenas no citoplasma. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x. N=1 experimento realizado em triplicata.

Um trabalho que avaliou morte celular de miócitos ventriculares de rato neonatal induzida por queleritrina (inibidor da proteína quinase C), usou BOBO-3 por 10 minutos para marcação de células mortas, mensurando exclusivamente a fluorescência do núcleo e TMRM (marcador de células vivas), mensurando a fluorescência perinuclear. Como descrito no artigo, na cultura controle, sem tratamento, foram identificadas muitas células positivas para TMRM, e o número de células permeáveis, positivas para BOBO-3, na cultura tratada com queleritrina, foi

aumentado (MIOULANE *et al.*, 2012). Não houve nenhum relato sobre a marcação de BOBO-3 no citoplasma de células vivas. Porém, o tempo de incubação desta sonda foi muito curto.

Foi realizado mais um teste com uma concentração menor do BOBO-3. A concentração usada foi de 0,5 μM e 0,1 μM , seguindo o mesmo tempo de incubação, 30 minutos. Como pode ser visto na **figura 19**, o citoplasma das células vivas continuou sendo marcado, porém mais fracamente, mesmo usando a concentração mais baixa de 0,1 μM .

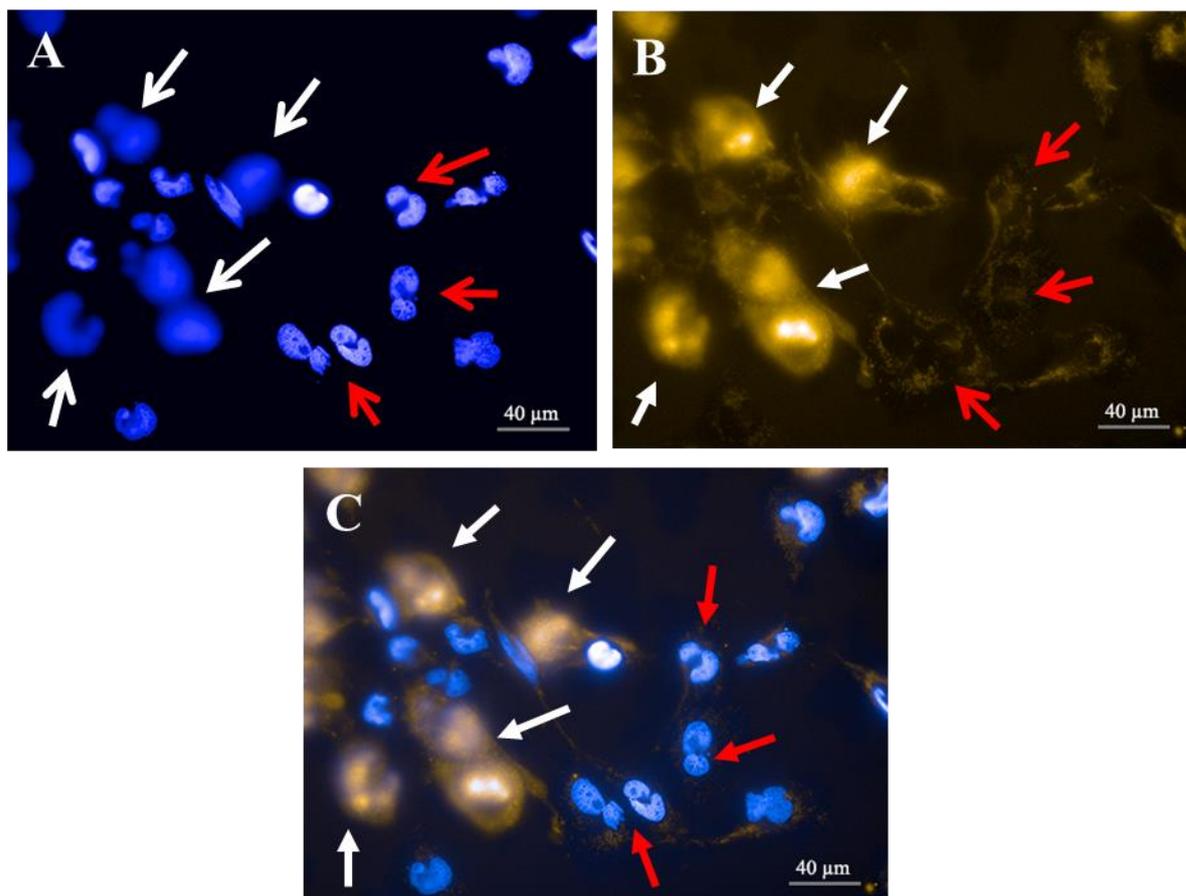


Figura 19: Teste de sondas para detecção de morte celular (BOBO-3 – 0,1 μM). Fotomicrografias de células T98G tratadas com 10 μM de etoposídeo por 24 horas marcadas com 0,1 μM de BOBO-3 (Excitação/Emissão: 570/602 nm). (A) Núcleos identificados com Hoescht 33342 (0,5 μM). (B) Marcação com BOBO-3. (C) Dupla marcação. As setas brancas indicam as células mortas, totalmente marcadas. As setas vermelhas mostram células vivas, marcadas com BOBO-3 apenas no citoplasma. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x.

O gráfico da **figura 20** mostra que mesmo ocorrendo uma fraca marcação do citoplasma nas células vivas, o programa de análise conseguiu distinguir a população de células vivas e mortas calculando a intensidade de fluorescência do BOBO-3 no núcleo, pois a intensidade nas células mortas era muito mais alta. A concentração de 0,5 μM foi melhor para diferenciar as células em sofrimento.

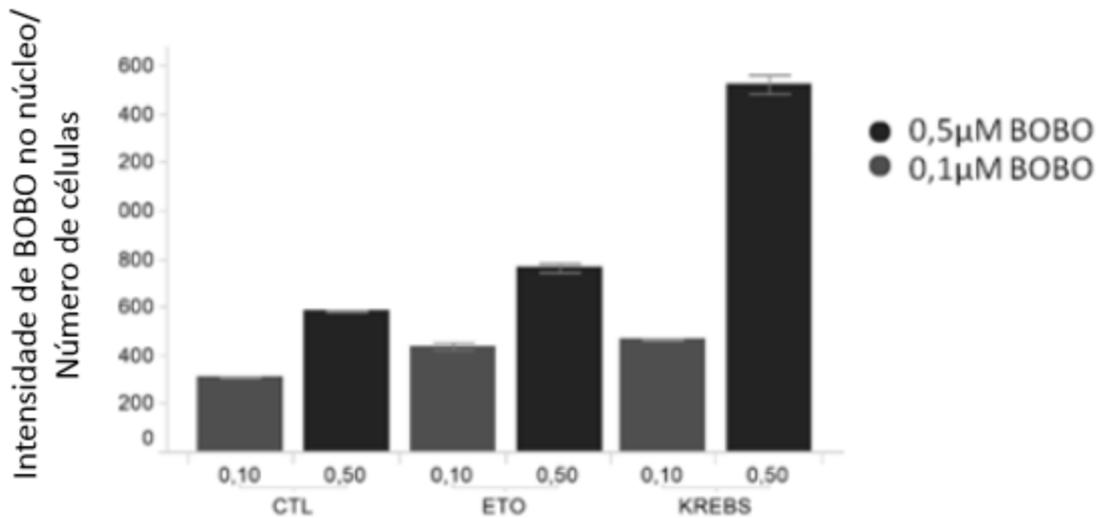


Figura 20: Gráfico da intensidade de BOBO-3 no núcleo por número de células da linhagem T98G. Foram usadas as concentrações de 0,1μM e 0,5μM de BOBO-3 por 30 minutos. Essas células foram tratadas com etoposídeo 10 μM por 24 horas e com tampão de Krebs por 3 horas. N=1 experimento realizado em triplicata.

Outro estudo descrito na literatura testou sondas fluorescentes usadas para avaliar citotoxicidade celular, em microscópio e leitores de placas, usando as células J774 (monócitos de camundongo). Dentre as sondas testadas, BOBO-3 se mostrou permeável ao citoplasma, mesmo sendo utilizado em uma concentração baixa, de 0,1 μM (CHIARAVIGLIO; KIRBY, 2014).

Os experimentos seguintes foram feitos utilizando outra sonda para identificar morte celular, o *CellEvent* (caspase 3/7), que é composto por um peptídeo (DEVD) conjugado com um corante de ligação ao ácido nucléico e não é intrinsecamente fluorescente. Porém, esse peptídeo é alvo de atividade de proteases tipo caspase 3/7, fazendo com que o corante ligado ao peptídeo se ligue ao DNA emitindo fluorescência (THERMO FISHER, 2018b). A presença de caspase 3/7 ativada caracteriza a via de sinalização efetora da apoptose dependente de caspase.

Para tentar corrigir a marcação fraca de células caspase positivas que ocorreu no rastreamento da linhagem HCT116, foi aumentado o tempo de incubação do *CellEvent* de 20 para 40 minutos e manteve-se a mesma concentração, de 2 μM. Esses valores de concentração e incubação da sonda foram baseadas no manual do fabricante (2-10 μM, por pelo menos 30 minutos). Mas como pode ser observado na **figura 21**, as células não tratadas com quimioterápico (controle), estavam aparentemente marcadas.

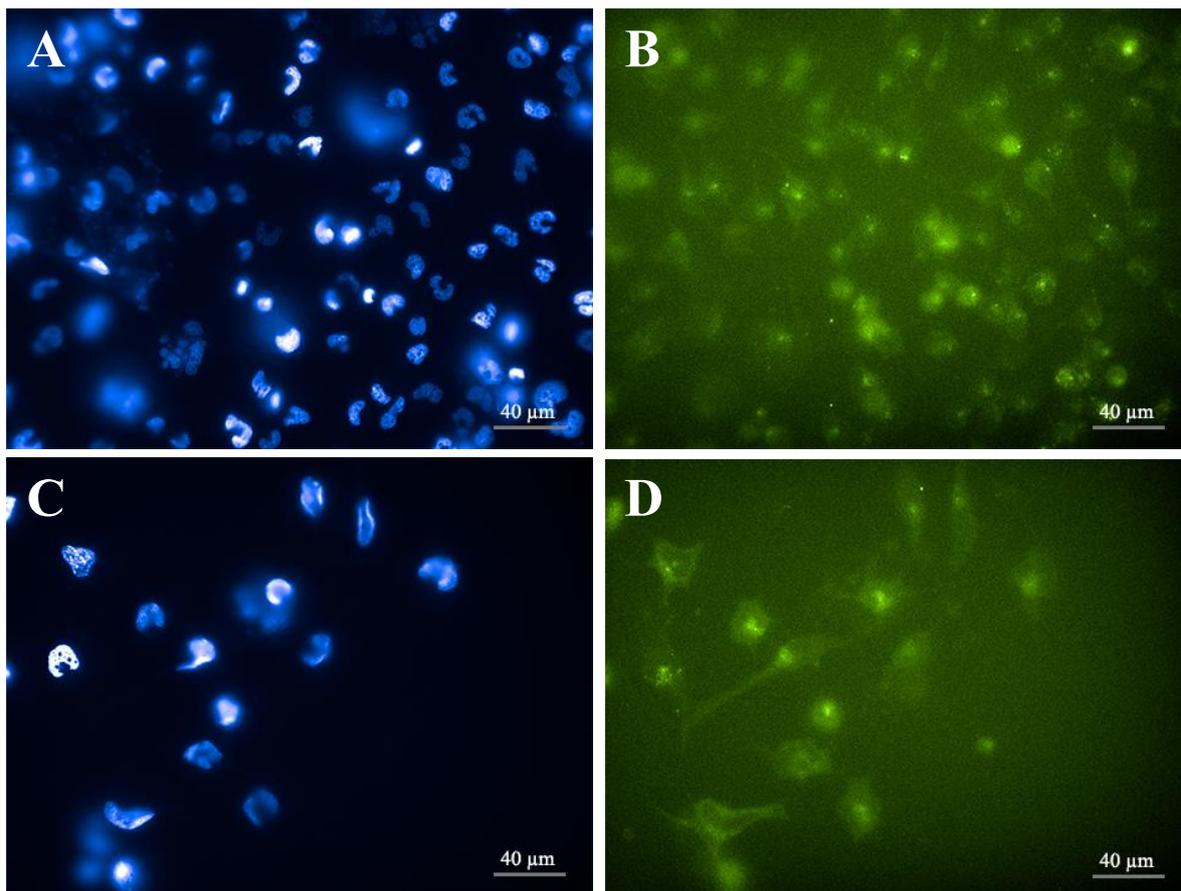


Figura 21: Teste de sondas para detecção de morte celular (CellEvent-caspase 3/7 2 μ M por 40 minutos). Fotomicrografias de células T98G, não tratadas (controle) e tratadas, marcadas com 2 μ M para atividade de caspase 3/7 (Excitação/Emissão: 503/530 nm) por 40 minutos. (A) Núcleos das células T98G não tratadas (controle) corados com Hoescht 33342 (0,5 μ M). (B) Marcação do mesmo grupo de células T98G (controle) para atividade de caspase 3/7. (C) Núcleos das células T98G tratadas com 10 μ M de etoposídeo por 24 horas corados com Hoescht 33342. (D) Marcação para atividade de caspase 3/7 do mesmo grupo de células T98G tratadas. As sondas foram incubadas por 40 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x. N=1 experimento realizado em triplicata.

Diante desse resultado outro teste foi realizado. O tempo de incubação da caspase 3/7 diminuiu, passando para 30 minutos e usada novamente a concentração de 2 μ M com acréscimo de mais uma concentração de 1 μ M (que não diminuiu a intensidade da marcação), como mostra a **figura 23**. Com o tempo de incubação menor e usando a concentração de 2 μ M, a caspase 3/7 não corou as células vivas, como pode ser visto na **figura 22 (A, B)**. Porém, foi observado que quando ocorria marcação das células tratadas com a caspase 3/7, esta acontecia em partes do citoplasma da célula T98G, e não no núcleo (**C, D**). Esse resultado com a T98G foi diferente do produzido pelo nosso grupo de pesquisa usando as linhagens de câncer de esôfago OE19 e OE21, frente a quimioterápicos, em um rastreamento em larga escala, onde a marcação para atividade de caspase em células apoptóticas se dava no núcleo (SOLETTI *et al.*, 2017).

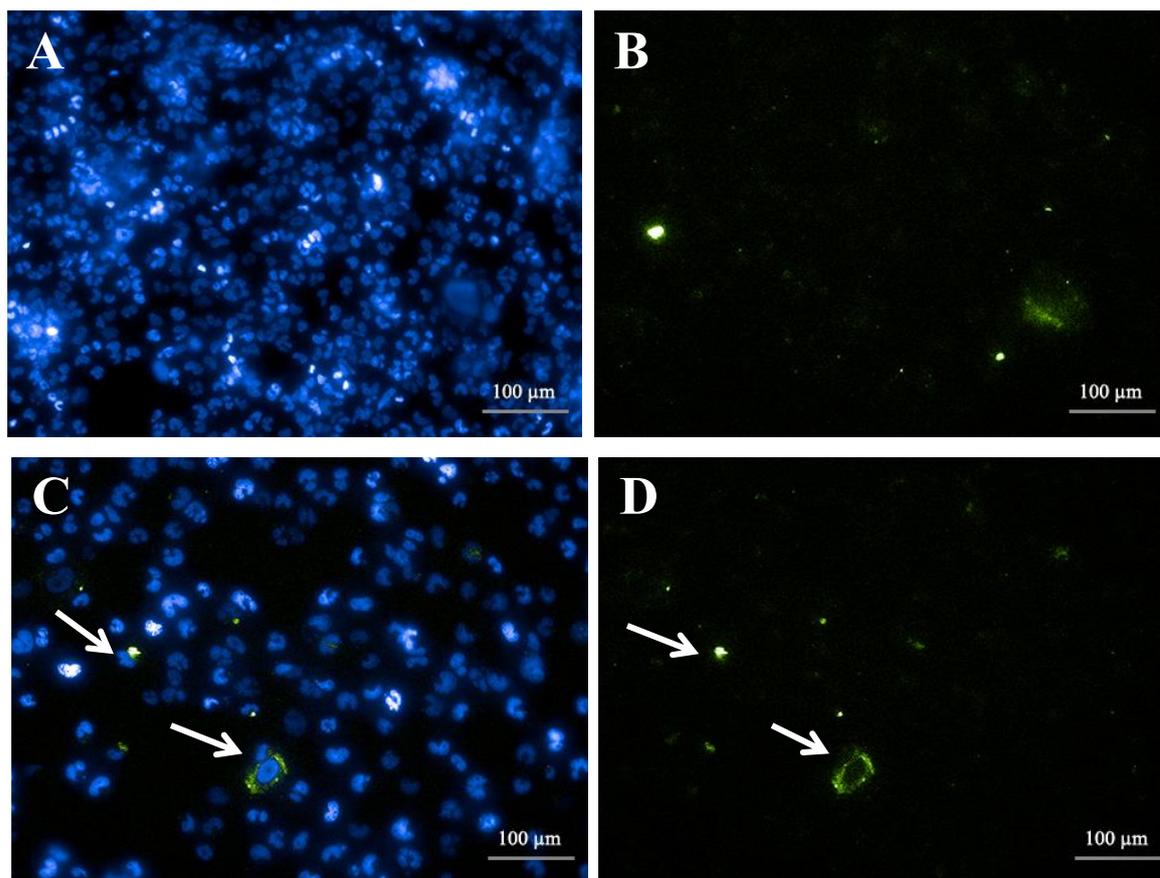


Figura 22: Teste de sondas para detecção de morte celular (CellEvent-caspase 3/7 2µM por 30 minutos). Fotomicrografias de células T98G, não tratadas (controle) e tratadas, marcadas com 2 µM para atividade de caspase 3/7 (Excitação/Emissão: 503/530 nm) por 30 minutos. (A) Núcleos das células não tratadas (controle) corados com Hoescht 33342 (0,5 µM). (B) Marcação para atividade de caspase 3/7 nas células não tratadas (controle). (C) Dupla marcação das células tratadas com 10 µM de etoposídeo por 24 horas coradas com Hoescht 33342 e para atividade de caspase 3/7. (D) Marcação para atividade de caspase 3/7 nas células tratadas. As setas brancas mostram a marcação para atividade de caspase 3/7 no citoplasma das células. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 20x LD. N=1 experimento realizado em triplicata.

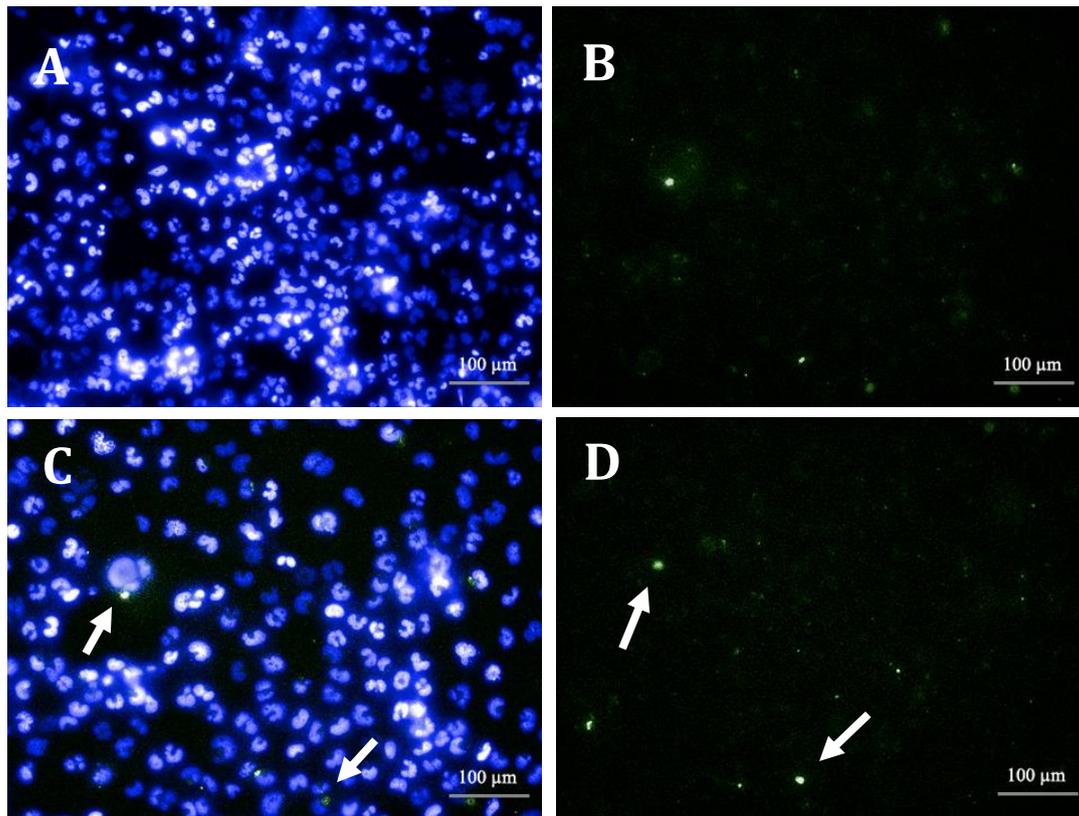


Figura 23: Teste de sondas para detecção de morte celular (CellEvent-caspase 3/7 1 μ M por 30 minutos). Fotomicrografias de células T98G, não tratadas (controle) e tratadas, marcadas com 1 μ M para atividade de caspase 3/7 (Excitação/Emissão: 503/530 nm). (A) Núcleos das células não tratadas (controle) corados com Hoescht 33342 (0,5 μ M). (B) Marcação para atividade de caspase 3/7 nas células não tratadas (controle). (C) Dupla marcação das células tratadas com 10 μ M de etoposídeo por 24 horas coradas com Hoescht 33342 e para atividade de caspase 3/7. (D) Marcação para atividade de caspase 3/7 nas células tratadas. As setas brancas mostram a marcação para atividade de caspase 3/7 no citoplasma das células. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 20x LD. N=1 experimento realizado em triplicata.

Tem sido descrito na literatura, que a sequência peptídica DEVD, presente no *CellEvent*, está sendo bastante usada por pesquisadores para produzir essas sondas ativáveis e assim gerar imagens óticas de células apoptóticas, que tem se mostrado bastante útil para rastreamento em larga escala (SMITH; SMITH, 2013). Porém, para a linhagem T98G houve pouca marcação para atividade de caspase 3/7 frente ao etoposídeo (pareceu não induzir morte celular por caspase dependente), e esta marcação ocorreu em maior parte no citoplasma, e não no núcleo como esperado.

Seguindo os experimentos, mais um tipo de sonda foi testada para identificar morte celular: o *LIVE/DEAD Cell*. Esse kit é composto pelo Homodímero de Etídeo (marcador de células mortas) e Calceína (cora células vivas). Em células vivas, onde se tem a atividade das esterases intracelulares, a calceína AM, não fluorescente, ao entrar na célula é convertida em uma fluorescência verde por essas esterases. Já o homodímero de etídeo, entra nas células em

que há perda da integridade da membrana plasmática, ou seja, em células mortas, produzindo uma fluorescência vermelha (THERMO FISHER, 2018d). Foi usado 2 μM de Homodímero de Etídeo e 0,5 μM de Calceína. As sondas foram incubadas por 30 minutos. A **figura 24** mostra perfeitamente a distinção de populações de células T98G vivas (verdes) e mortas (amarelas). O gráfico da **figura 25** representa a quantificação do número de células vivas (**A**) e o número de células mortas (**B**) no grupo controle e no grupo tratado com 10 μM de etoposídeo.

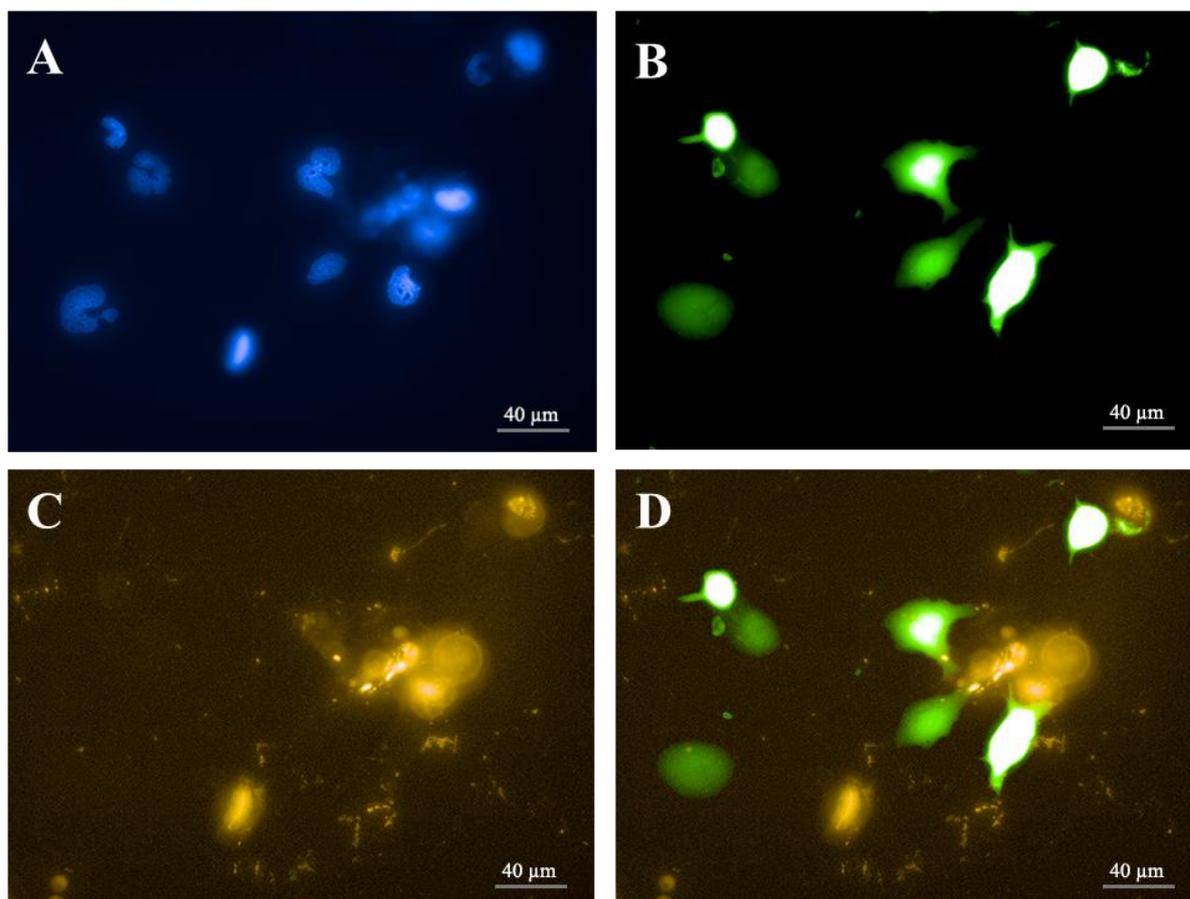


Figura 24: Teste de sondas para detecção de morte celular (Kit *LIVE/DEAD Cell*). Fotomicrografias das células T98G tratadas com 10 μM de etoposídeo por 24 horas marcadas com o kit *LIVE/DEAD Cell*. (A) Identificação dos núcleos corados com Hoescht 33342 (0,5 μM). (B) Marcação com 0,5 μM calceína-AM (Excitação/Emissão: 494/517 nm), corando as células vivas em verde. (C) Marcação com 2 μM homodímero de etídeo (Excitação/Emissão: 528/517 nm), corando as células mortas em amarelo. (D) Dupla marcação: calceína-AM e homodímero de etídeo. As sondas foram incubadas por 30 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x.

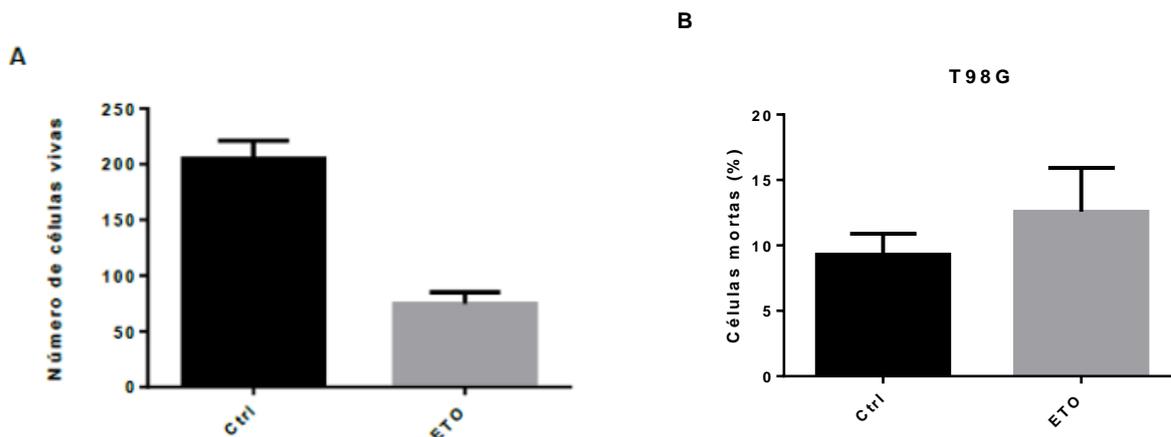


Figura 25: Gráfico do número de células vivas (A) e de porcentagem de células mortas (B) da linhagem T98G tratada com 10 μ M de etoposídeo por 24 horas. A sonda usada para detecção de células vivas e mortas foi o *LIVE/DEAD Cell*. As células vivas foram definidas como as coradas em verde a partir de baixa intensidade de fluorescência e as células mortas as coradas de amarelo com alta intensidade de fluorescência. Não há sobreposição de marcação entre células verdes (vivas) e amarelas (mortas). N=1 experimento realizado em triplicata.

O *LIVE/DEAD Cell* é bastante usado para monitorar o efeito de drogas em rastreamento em larga escala, inclusive para estudos com esferóides (MITTLER et al., 2017). Em um trabalho publicado recentemente, esse mesmo kit se mostrou eficaz para identificação de células vivas em organóides (modelos 3D de microtecidos de xenoinxerto derivados de pacientes com carcinoma de não pequenas células de pulmão) sensibilizados com quimioterápicos, utilizando a plataforma HCS (AHONEN et al., 2017).

Dentre as sondas testadas, o *LIVE/DEAD Cell*, foi a melhor, já que diferentemente do *CellEvent*, conseguiu identificar as células mortas da linhagem T98G no grupo tratado com etoposídeo. A análise das imagens tornou-se mais fácil e prática devido ao fato das populações de células vivas e mortas serem bem definidas. Porém, as células sensibilizadas na presença dos quimioterápicos, ou seja, as células mortas, tendem a se desprenderem da placa. Assim, ter um marcador de células vivas, foi essencial, para avaliar os efeitos dos quimioterápicos.

5.7 TESTE DE LEITURA DA PLACA EM CÉLULAS VIVAS OU FIXADAS

Até o momento, todas as leituras na plataforma de análise tinham sido feitas com as células vivas. Dessa forma, foi realizado um teste de leitura com as células fixadas. As células T98G, após o tempo de tratamento com o quimioterápico, foram incubadas com 0,75 μ M de BOBO-3, e em seguida, foram lavadas com *Tyrode*, fixadas com formaldeído a 4% em PBS por 15 minutos e colocadas em glicerol para leitura. Na **figura 26**, nota-se, que as células controle (não tratadas) foram marcadas com BOBO-3 tanto no núcleo quanto no citoplasma,

não sendo possível distinguir células saudáveis de células em sofrimento, diferentemente da leitura feita com as células vivas.

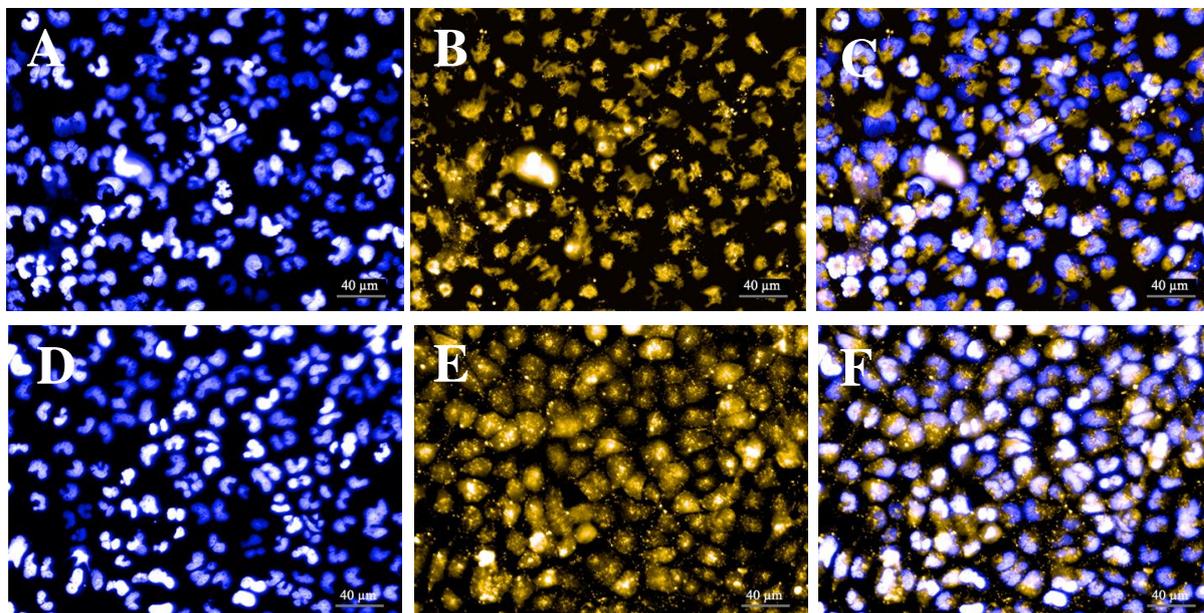


Figura 26: Teste de leitura da placa em células vivas ou fixadas. Fotomicrografias das células T98G não tratadas (controle), vivas e fixadas, marcadas com $0,75 \mu\text{M}$ de BOBO-3. (A; D) Identificação dos núcleos com Hoescht 33342 ($1 \mu\text{M}$), em (A) as células estão vivas e em (D) fixadas. (B; E) Marcação com BOBO-3, em (B) o citoplasma das células vivas está corado, em (E) o núcleo e o citoplasma da célula fixada está marcado. (C; F) Dupla marcação com Hoescht 33342 e BOBO-3 em células vivas (C) e em células fixadas (F). As sondas foram incubadas por 30 minutos. As fotos foram tiradas no *Operetta* com objetiva de 40x. N=1 experimento realizado em triplicata.

Porém, em um estudo com cardiomiócitos, estes foram incubados com BOBO-3 por 10 minutos e depois fixados com formaldeído a 4%, e somente as células mortas foram coradas (MIOULANE *et al.*, 2012b). Talvez, no caso da linhagem T98G, um tempo de incubação menor com BOBO-3 antes da fixação poderia ser testado. Assim, apesar de perder parte das células mortas que se soltam nas lavagens, a princípio as células vivas continuam aderidas e a incubação com o kit *LIVE/DEAD Cell* nos fornecer uma leitura confiável do número de células vivas em cada condição, optou-se por realizar a leitura da placa em células vivas.

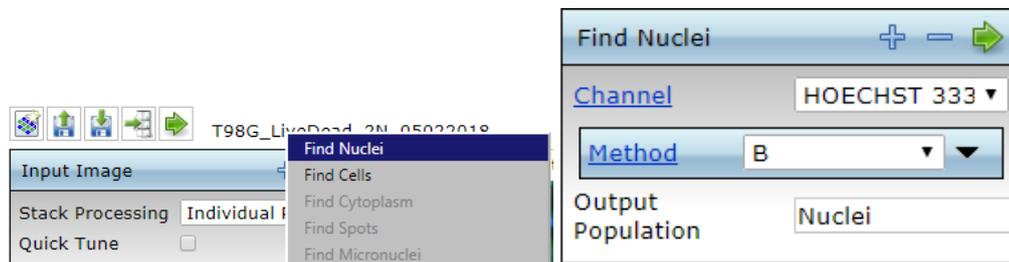
5.8 PIPELINE DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE MORTE CELULAR

Foi realizado o seguinte *pipeline* de análise para avaliação de morte celular da célula T98G no programa de análise *Columbus*:

Passo 1: Encontrar os núcleos

A **figura 27 (B)** mostra a análise dos núcleos das células T98G identificados com Hoescht 33342 delimitados por linhas coloridas pelo algoritmo de análise *Find Nuclei*.

A



B

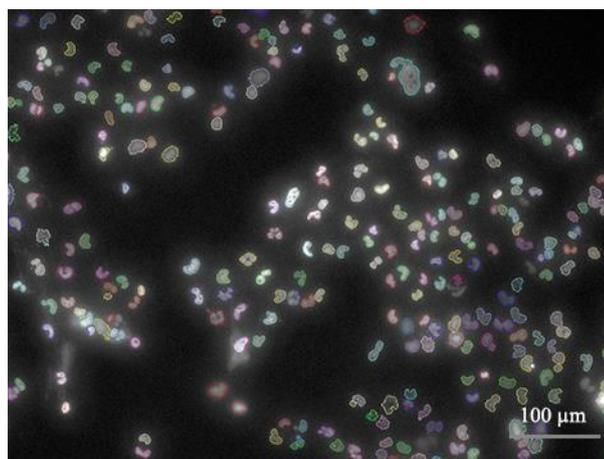


Figura 27: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus. (A) Passo 1 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Nuclei* no canal do Hoescht 33342. O método escolhido que melhor delimitou os núcleos foi o B. (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com Hoescht 33342 e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Nuclei*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Dentre os métodos disponíveis, o B foi o que melhor delimitou os núcleos, separando-os corretamente. Porém, este método pode ser variável a cada experimento. Assim, é necessário testar cada método disponível no momento da análise para saber qual é o melhor para identificação dos núcleos.

Passo 2: Remover a população de núcleos da borda

1. Na **figura 28 (B)**, nota-se que o comando *Select Population*, exclui os núcleos das bordas (em vermelho). Cada vez que é usada a opção *Select Population*, é necessário nomear a nova população criada. Neste caso o nome dado foi “Núcleo sem borda”.

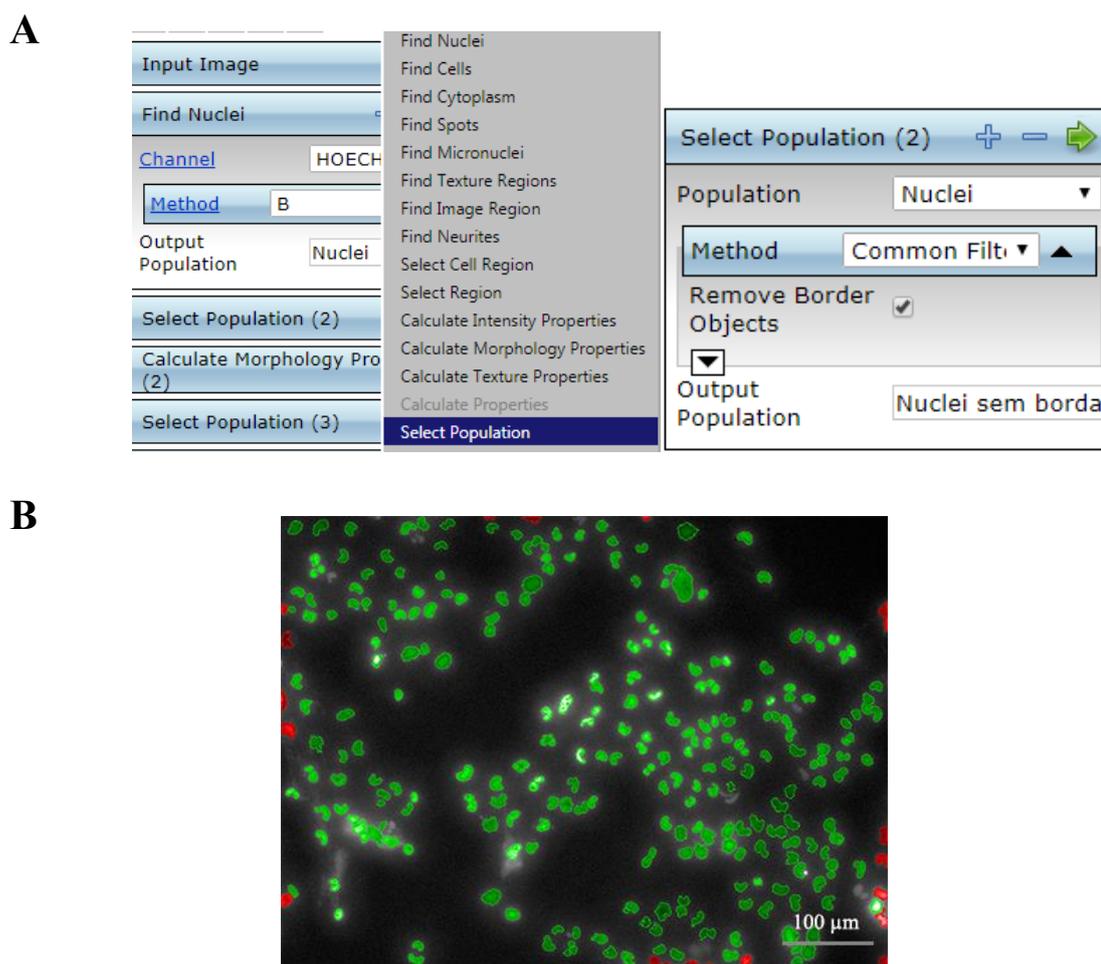


Figura 28: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus para exclusão dos núcleos da borda. (A) Passo 2 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos com remoção dos objetos da borda gerando uma nova população (núcleo sem borda). (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com Hoescht 33342 e selecionados pelo algoritmo *Select Population*. Os núcleos em verde foram selecionados e os núcleos em vermelho (das bordas) excluídos. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Passo 3: Calcular Propriedades Morfológicas do núcleo

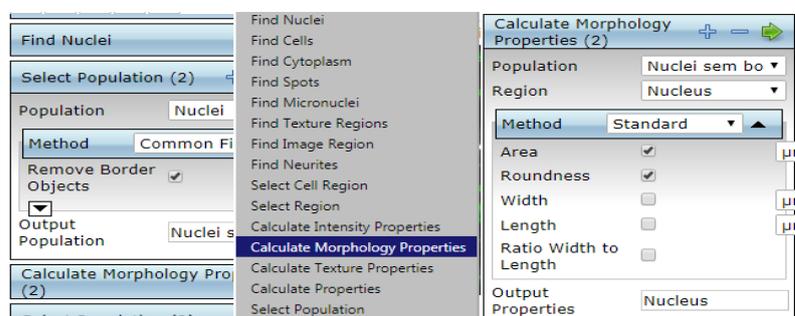


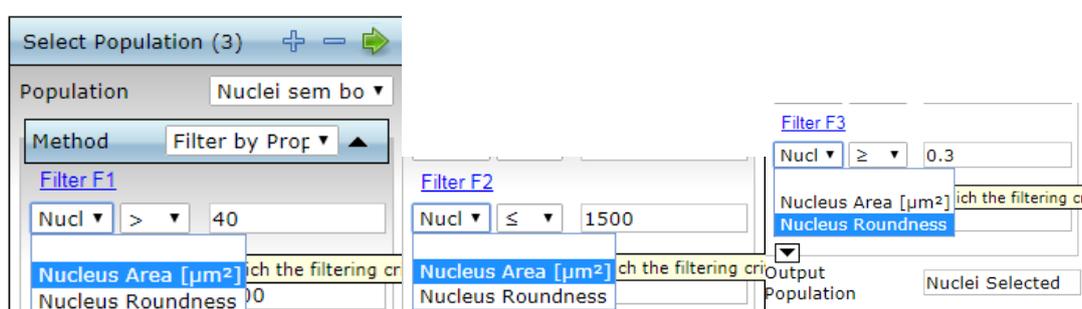
Figura 29: Passo 3 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população núcleo sem borda na região do núcleo. Os métodos escolhidos para seleção do núcleo foram área e circularidade.

Geralmente escolhe-se a área e a circularidade como parâmetros para a seleção de núcleos.

Passo 4: Selecionar a população de núcleos por área e circularidade definidos anteriormente

Esses parâmetros foram fixados para linhagem T98G e tem a finalidade de excluir debris e bolhas ocasionalmente formadas, e assim selecionar somente os núcleos. A **figura 30 (B)** mostra a população de núcleos da linhagem T98G selecionada (em verde) pelo algoritmo *Select Population* de acordo com os parâmetros de área e circularidade definidos para esta linhagem. Neste campo, foi excluído um único núcleo (em vermelho).

A



B

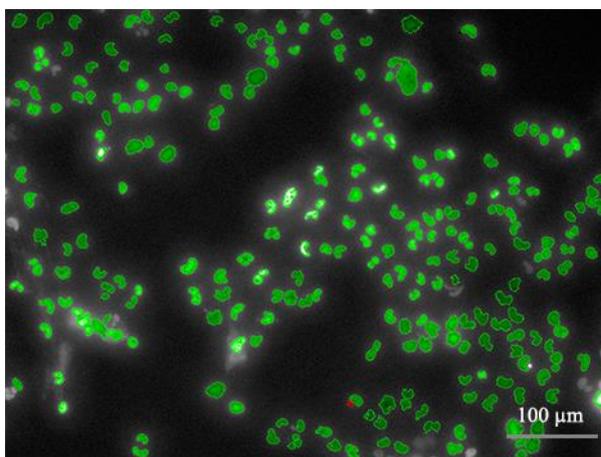


Figura 30: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus para exclusão dos núcleos conforme área e circularidade. (A) Passo 4 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* através dos tamanhos de área e circularidade do núcleo. Os filtros escolhidos para seleção do núcleo foram área $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 1.500 \mu\text{m}^2$ e circularidade $\geq 0.3 \mu\text{m}^2$. A aplicação deste comando gera uma nova população: núcleos selecionados. (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com Hoescht 33342 e selecionados pelo algoritmo *Select Population*. Os núcleos em verde foram selecionados e o único núcleo em vermelho foi excluído. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Passo 5: Calcular Propriedades de Intensidade do Homodímero de Etídeo no núcleo

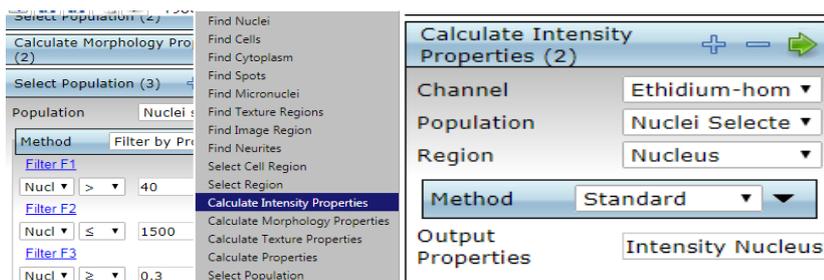


Figura 31: Passo 5 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* para o homodímero de etídeo. Este comando é aplicado no canal do homodímero de etídeo, população de núcleos selecionados na região do núcleo.

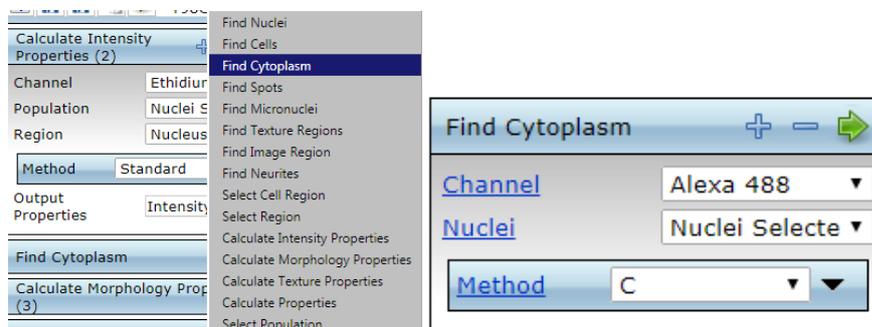
O parâmetro de intensidade do homodímero de etídeo é variável ainda que seja na mesma linhagem. Normalmente variam entre 60 e 180 nm.

Passo 6: Encontrar o Citoplasma

Na **figura 32 (B)**, nota-se que o algoritmo *Find Cytoplasm* foi usado para identificar o citoplasma das células T98G através da marcação da calceína AM (filtro Alexa 488).

Dentre os métodos disponíveis, o C foi o que melhor delimitou o citoplasma. Porém, é necessário testar cada um dos métodos para saber qual o melhor a ser utilizado.

A



B

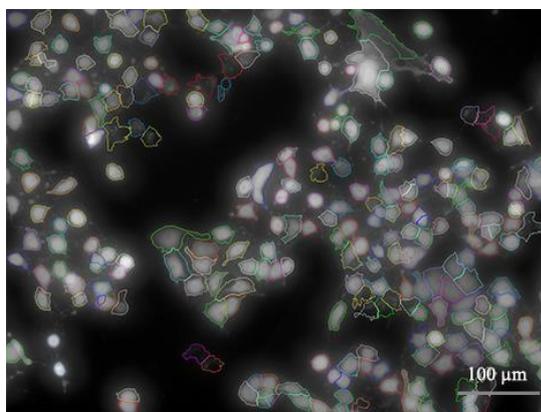


Figura 32: Análise do citoplasma das células T98G pelo software *Columbus*. (A) Passo 6 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Cytoplasm* no canal do Alexa 488 (calceína) na população de núcleos selecionados. O método escolhido que melhor delimitou o citoplasma foi o C. (B) Fotomicrografia da análise do citoplasma identificado com calceína AM e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Cytoplasm*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Passo 7: Calcular Propriedades Morfológicas da célula

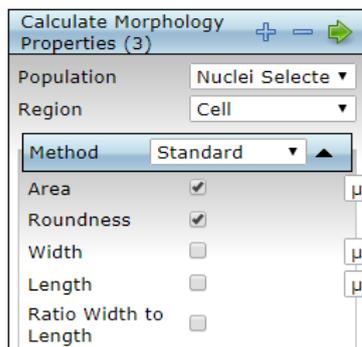


Figura 33: Passo 7 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população de núcleos selecionados na região da célula. Os métodos escolhidos para seleção da célula foram área e circularidade.

Geralmente os parâmetros selecionados para morfologia da célula também são área e circularidade. Estas propriedades são úteis para novamente poder delimitar o que de fato são células e o que são artefatos de imageamento, que serão excluídos se estiverem muito fora dos padrões de área e circularidade obtidos.

Passo 8: Calcular Propriedades de Intensidade da Calceína (Alexa 488) na célula

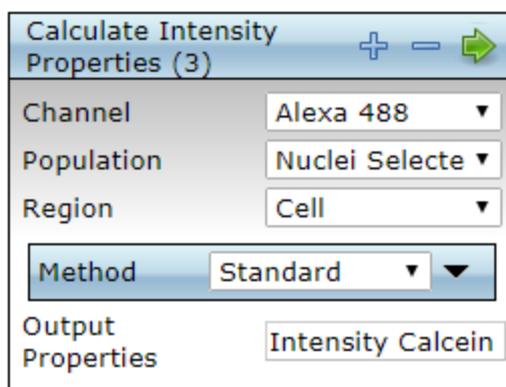
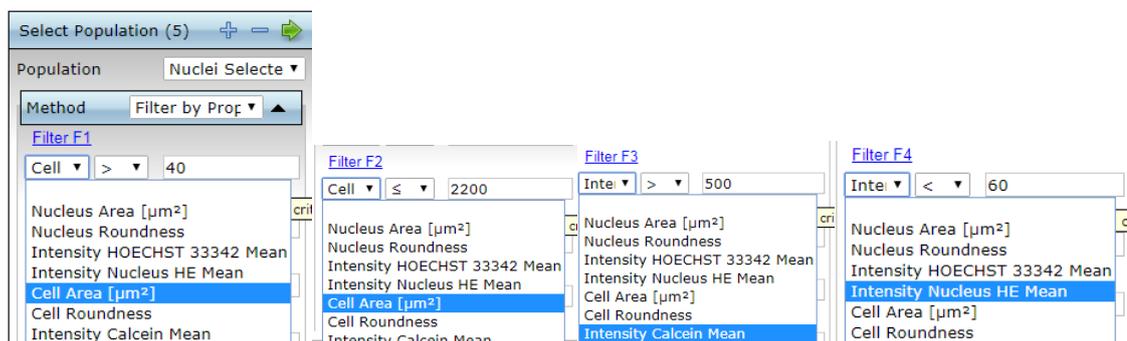


Figura 34: Passo 8 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* para a calceína. Este comando é aplicado no canal do Alexa 488 na população de núcleos selecionados na região da célula.

Passo 9: Selecionar a população de células vivas

Células T98G foram definidas como tendo área celular $> 40\mu\text{m}^2$ e $\leq 2200\mu\text{m}^2$. Já a intensidade da calceína é variável, variando de 500 a 800 nm. A **figura 35 (B)** mostra a população de células vivas selecionadas (em verde) e as excluídas em vermelho (mortas), pelo algoritmo *Select Population*, de acordo com os parâmetros de área da célula, intensidade da calceína e intensidade do homodímero de etídeo definidos para encontrar a população de células vivas.

A



B

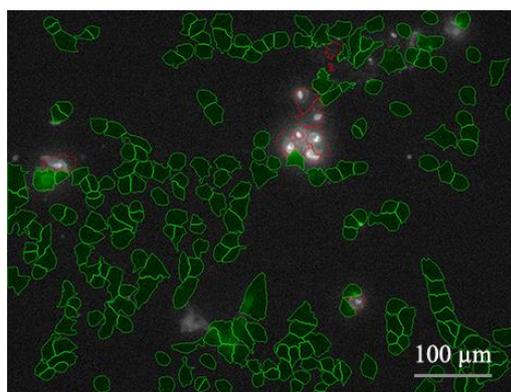
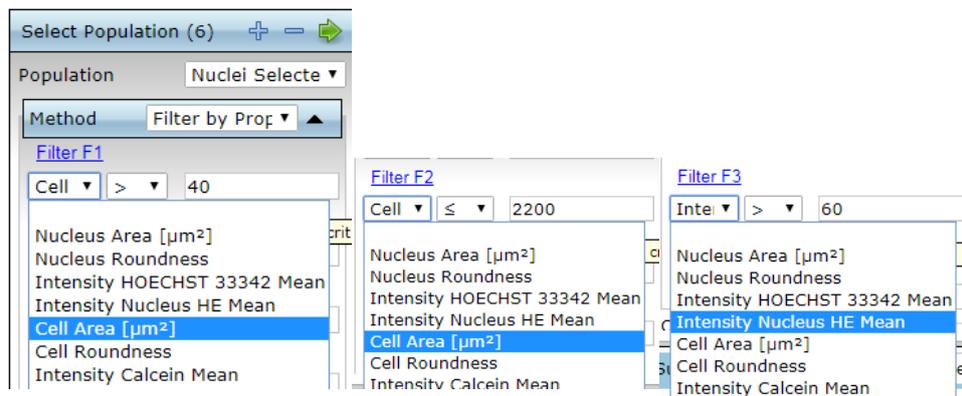


Figura 35: Análise da população de células T98G vivas pelo software Columbus. (A) Passo 9 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos selecionados. Os filtros escolhidos para a seleção de células vivas foram área da célula $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 2.200 \mu\text{m}^2$, intensidade média da calceína $> 500 \text{ nm}$ e intensidade média do homodímero de etídeo $< 60 \text{ nm}$. (B) Fotomicrografia da análise de células vivas. As células selecionadas em verde foram identificadas pela calceína, representando as células vivas, e as células com máscaras em vermelho são células mortas identificadas pelo homodímero de etídeo e foram excluídas. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Passo 10: Selecionar a população de células mortas

Na **figura 36 (B)**, nota-se que a população selecionada agora foi a de células mortas (em verde), e que a população de células vivas foi excluída (em vermelho) pelo algoritmo *Select Population*.

A



B

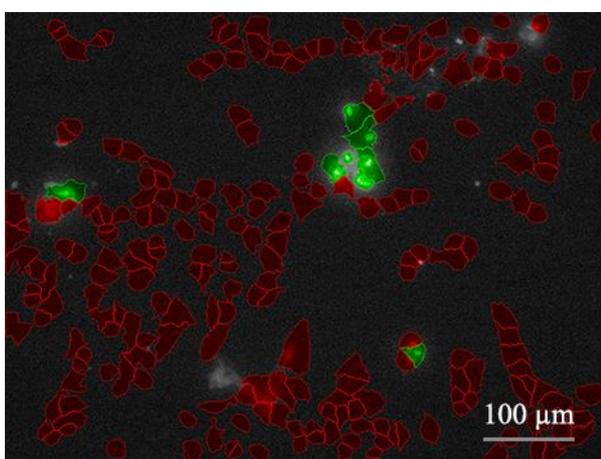


Figura 36: Análise da população de células T98G mortas pelo software Columbus. (A) Passo 10 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos selecionados. Os filtros escolhidos para a seleção de células vivas foram área da célula $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 2.200 \mu\text{m}^2$, e intensidade média do homodímero de etídeo $> 60 \text{ nm}$. (B) Fotomicrografia da análise de células mortas. As células em vermelho foram identificadas pela calceína, representando as células vivas, e foram excluídas. As células selecionadas em verde são células mortas identificadas pelo homodímero de etídeo. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

5.9 PIPELINE DE ANÁLISE PARA DETECÇÃO DE AUTOFAGIA

Foi realizado o seguinte pipeline de análise para avaliação de autofagia na célula T98G no programa de análise Columbus:

Passo 1: Encontrar os núcleos

A **figura 37 (B)** mostra a análise dos núcleos das células T98G identificados com Hoescht 33342 delimitados por linhas coloridas pelo algoritmo de análise *Find Nuclei*.

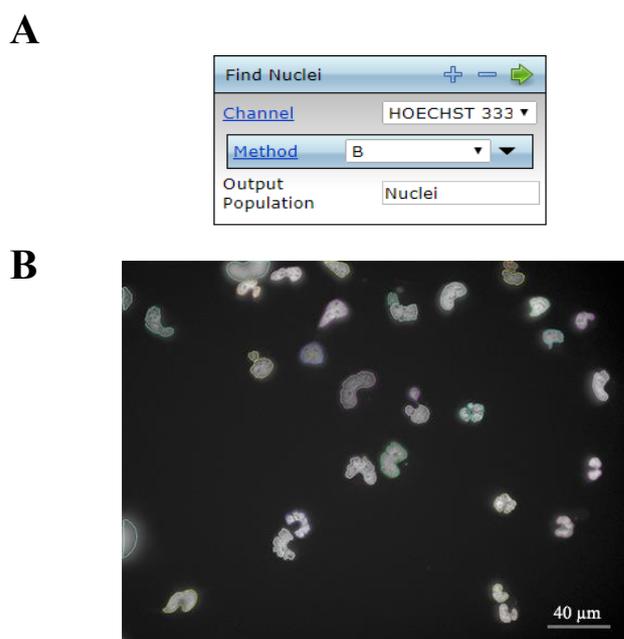


Figura 37: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus. (A) Passo 1 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Nuclei* no canal do Hoescht 33342. O método escolhido que melhor delimitou os núcleos foi o B. (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com HOESCHT 33342 e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Nuclei*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Passo 2: Remover a população de núcleos da borda

Na **figura 38 (B)**, nota-se que o algoritmo *Select Population*, exclui os núcleos das bordas (em vermelho).

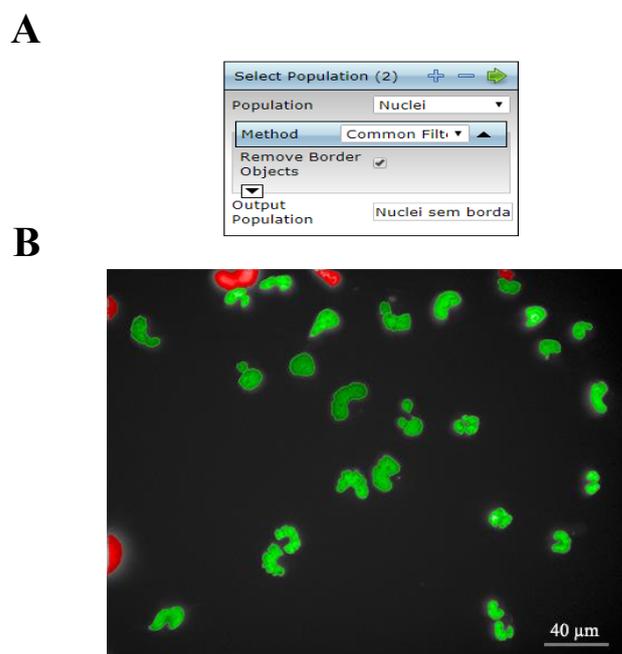


Figura 38: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus para exclusão dos núcleos da borda. (A) Passo 2 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos com remoção dos objetos da borda gerando uma nova população (núcleo sem borda). (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com Hoescht 33342 e selecionados pelo algoritmo *Select Population*. Os núcleos em verde foram selecionados e os núcleos em vermelho (das bordas) excluídos. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Passo 3: Calcular Propriedades Morfológicas do núcleo

Os parâmetros selecionados foram área e circularidade.

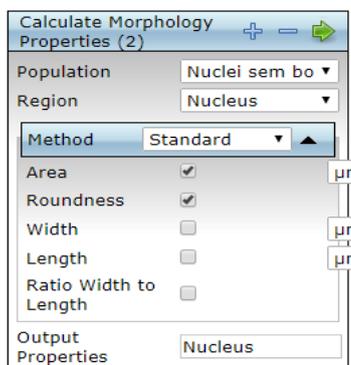
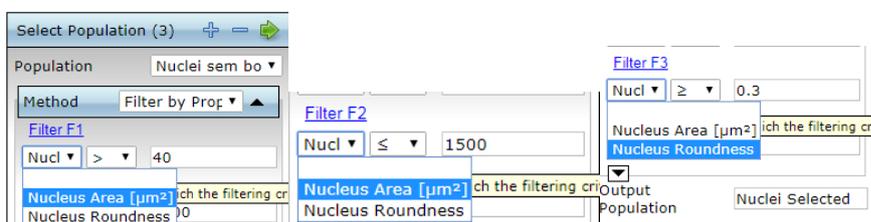


Figura 39: Passo 3 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população núcleo sem borda na região do núcleo. Os métodos escolhidos para seleção do núcleo foram área e circularidade.

Passo 4: Selecionar a população de núcleos por área e circularidade definidos anteriormente

A **figura 40 (B)** mostra a população de núcleos da linhagem T98G selecionada (em verde) pelo algoritmo *Select Population* de acordo com os parâmetros de área e circularidade definidos para esta linhagem. Neste campo, os núcleos em vermelho foram excluídos por não atenderem a tais requisitos.

A



B

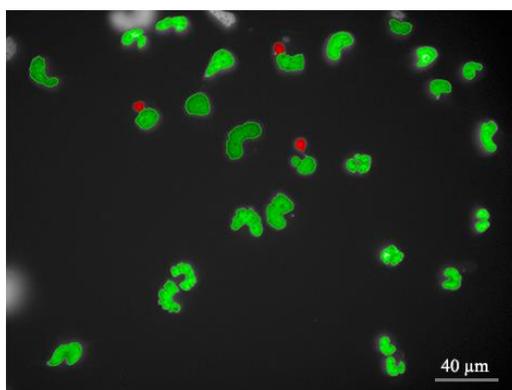


Figura 40: Análise dos núcleos das células T98G pelo software *Columbus* para exclusão dos núcleos conforme área e circularidade. (A) Passo 4 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* através dos tamanhos de área e circularidade do núcleo. Os filtros escolhidos para seleção do núcleo foram área $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 1.500 \mu\text{m}^2$ e circularidade $\geq 0.3 \mu\text{m}^2$. A aplicação deste comando gera uma nova população: núcleos selecionados. (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com Hoescht 33342 e selecionados pelo algoritmo *Select Population*. Os núcleos em verde foram selecionados e os núcleos em vermelho foram excluído. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Passo 5: Encontrar o Citoplasma

Na **figura 41**, o algoritmo *Find Cytoplasm* foi usado para identificar o citoplasma das células T98G marcadas com laranja de acridina através da fluorescência verde (uma vez que esta marca o núcleo e o citoplasma das células) usando o filtro Alexa 488 (representado pelo canal do *lysotracker green*).

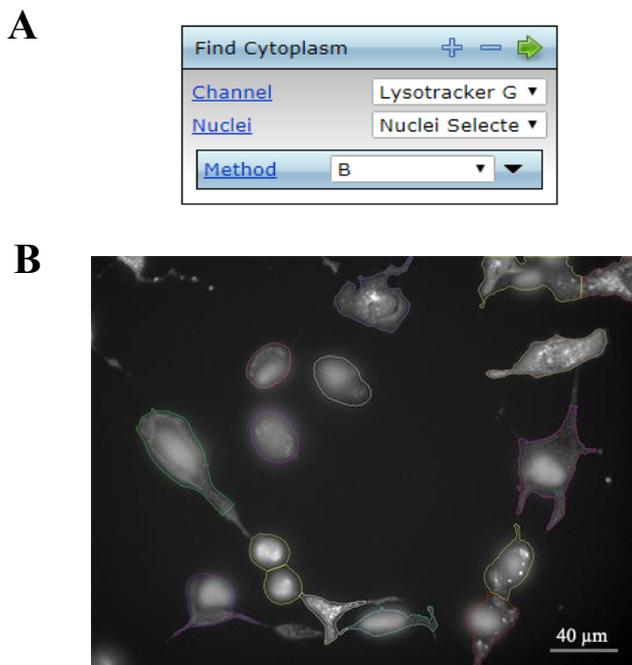


Figura 41: Análise do citoplasma das células T98G pelo software Columbus. (A) Passo 5 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Cytoplasm* no canal do Alexa 488 (*lysotracker green*) na população de núcleos selecionados. O método escolhido que melhor delimitou o citoplasma foi o B. (B) Fotomicrografia da análise do citoplasma identificado com laranja de acridina através da fluorescência verde e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Cytoplasm*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Dentre os métodos disponíveis, o B foi o que melhor delimitou o citoplasma. Lembrando que a escolha do método é variável.

Passo 6: Calcular Propriedades Morfológicas do citoplasma

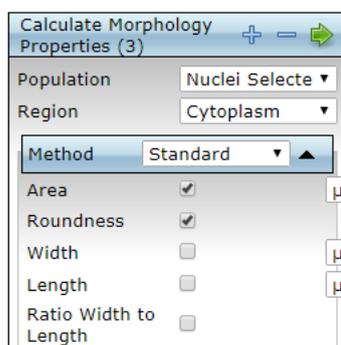


Figura 42: Passo 6 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população de núcleos selecionados na região do citoplasma. Os métodos escolhidos para seleção do núcleo foram área e circularidade.

Passo 7: Calcular Propriedades de Intensidade do Alexa 488 (*lysotracker green*) no citoplasma.

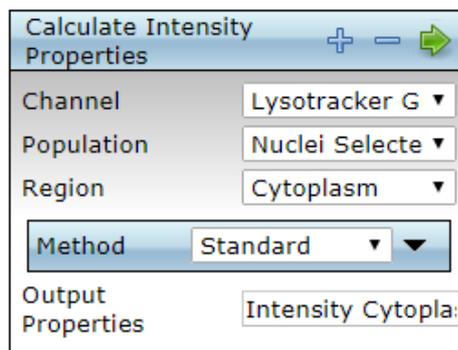


Figura 43: Passo 7 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* no canal de fluorescência verde do laranja de acridina. Este comando é aplicado no canal do Alexa 488 na população de núcleos selecionados na região do citoplasma.

Passo 8: Calcular Propriedades de Intensidade do Laranja de Acridina no citoplasma.

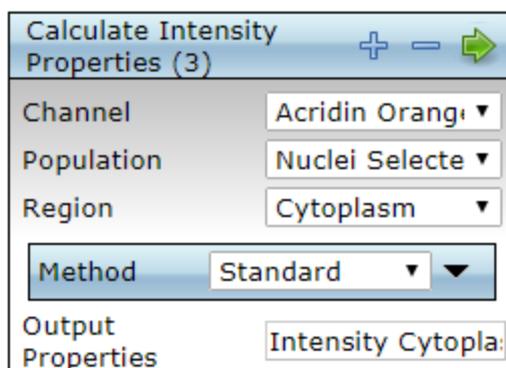


Figura 44: Passo 8 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* no canal de fluorescência vermelha do laranja de acridina. Este comando é aplicado no canal do laranja de acridina na população de núcleos selecionados na região do citoplasma.

Este passo é pulado quando se usa o *Lysotracker Green* como marcador de vesículas ácidas, uma vez que só existe fluorescência em verde.

Passo 9: Encontrar *Spots*

A **figura 45 (B)** mostra os *spots* (vesículas ácidas) identificados pela fluorescência vermelha (canal do laranja de acridina) e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Spots*.

No caso do *Lysotracker Green*, o canal utilizado para encontrar os *spots* é o Alexa 488, já que só existe a fluorescência verde.

Dentre os métodos disponíveis o B foi o que melhor delimitou os *spots* (circulados em vermelho dentro do citoplasma). A escolha deste método também é variável.

Esse experimento de autofagia foi realizado utilizando uma objetiva de 40x pois neste aumento fica mais nítida a visualização dos *spots* e sua quantificação pelo programa de análise.

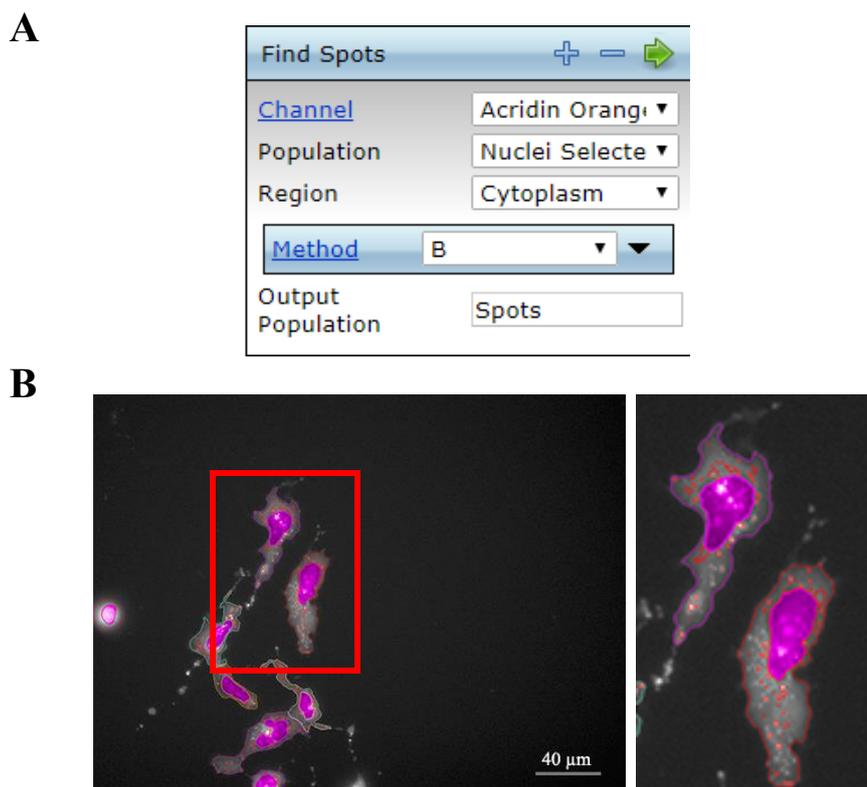


Figura 45: Análise dos spots das células T98G pelo software Columbus. (A) Passo 9 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Spots* no canal do laranja de acridina na população de núcleos selecionados na região do citoplasma. O método escolhido que melhor delimitou os spots foi o B. (B) Fotomicrografia da análise dos spots identificados com laranja de acridina através da fluorescência vermelha e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Spots*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Com a definição dos parâmetros a serem utilizados para aquisição e análise de imagens foi estabelecido um protocolo base a fim de avaliar morte celular e autofagia em células de glioblastomas tratadas com quimioterápicos e inibidores de CDKs usando uma plataforma de análise multiparamétrica em larga escala. Este protocolo encontra-se no **Anexo I** e foi validado através da sua aplicação em um rastreamento na linhagem T98G para detecção de morte celular, como pode ser observado nos experimentos a seguir. Além disso, como observado no **Anexo II**, foi gerada uma planilha estimada dos gastos produzidos para esse rastreamento.

5.10 TESTE DE VIABILIDADE NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA COM SEUS RESPECTIVOS TRATAMENTOS DE QUIMIOTERÁPICOS DE PRIMEIRA LINHA E COM INIBIDORES DE CDKs

Em paralelo, foi realizada curvas dose respostas com os quimioterápicos de primeira linha nas células tumorais T98G E U87MG, através do teste de avaliação de viabilidade e proliferação celular (MTT). O objetivo desses testes iniciais foi identificar uma dose de baixa toxicidade dos quimioterápicos para combinar com os diferentes inibidores de CDKs na

plataforma multiparamétrica e assim colocar em prática os testes de padronização para avaliação de morte celular realizados nesse trabalho.

Foram plaqueadas 20.000 células por poço da T98G (150 μ L) e 10.000 células por poço da U87MG (150 μ L). 24 horas após o plaqueamento, essas células foram incubadas por 48 horas com irinotecano ou 72 horas com temozolomida nas seguintes concentrações:

- Temozolomida (TMZ): 1200 μ M, 800 μ M, 400 μ M e 100 μ M.
- Irinotecano: 0,05 μ M, 2 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 200 μ M, 800 μ M.

O gráfico da **figura 46** mostra a viabilidade celular das linhagens T98G e U87MG tratadas com irinotecano por 48 horas. A T98G mostrou mais resistência ao quimioterápico, necessitando de um EC₂₀ cerca de 4 vezes maior quando comparado a U87MG.

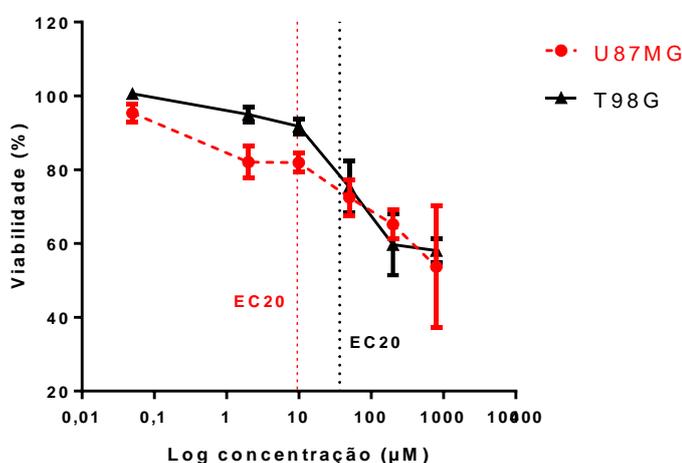


Figura 46: Teste de viabilidade celular - Curva dose-resposta de viabilidade na linhagem T98G e U87MG realizada segundo o método de MIT tratadas com irinotecano. Foram 48 horas de tratamento com o quimioterápico e doses indicadas. EC₂₀: 36,6 μ M (T98G) e 9,5 μ M (U87MG) – concentração do quimioterápico em que se tem 80% de viabilidade calculado por uma curva de regressão não-linear tipo dose-resposta de inibição normalizada/curva variável no *software Graph PadPrism 6.0*. N=3 experimentos independentes, cada experimento realizado em triplicata.

Na **figura 47**, o gráfico mostra a viabilidade celular das linhagens de glioblastoma tratadas com temozolomida por 72 horas. A U87MG ofereceu mais resistência ao quimioterápico precisando de um EC₂₀ além das doses utilizadas.

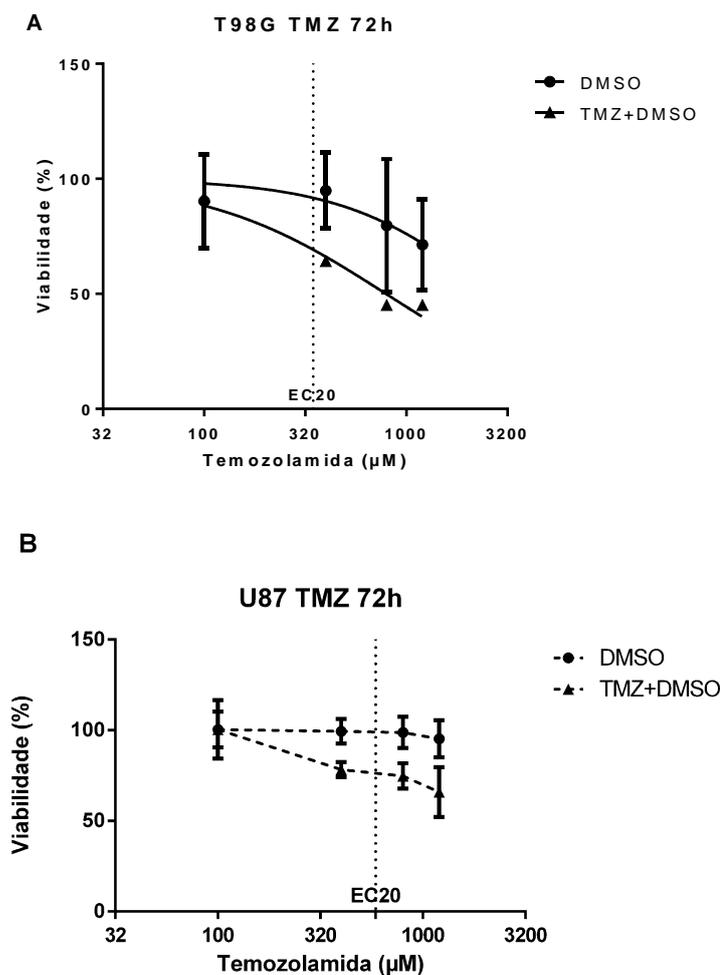


Figura 47: Teste de viabilidade celular - Curva dose-resposta de viabilidade na linhagem T98G (A) e U87MG (B) realizada segundo o método de MIT tratadas com temozolamida. Foram 72 horas de tratamento com o quimioterápico e doses indicadas. EC₂₀: 346,7 µM (T98G) e 527 µM (U87MG) – concentração do quimioterápico em que se tem 80% de viabilidade calculado por uma curva de regressão não-linear tipo dose-resposta de inibição normalizada/curva variável no *software Graph PadPrism 6.0*. A toxicidade do DMSO também foi avaliada, uma vez que a temozolamida é dissolvida nele. As doses de DMSO usadas foram: 1,2, 0,8, 0,4 e 0,1%. N=3 experimentos independentes, cada experimento realizado em triplicata.

Tratamento com Palbociclib e Abemaciclib, inibidores de CDKs (CDK 4/6), foi realizado nas linhagens de glioblastoma U87MG e T98G, como mostra o gráfico da **figura 48**. Foram usadas as seguintes concentrações: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM e 10.000 nM. O tratamento foi de 5 dias. A U87MG necessitou de doses bem menores desses inibidores para inibir sua proliferação quando comparada a T98G.

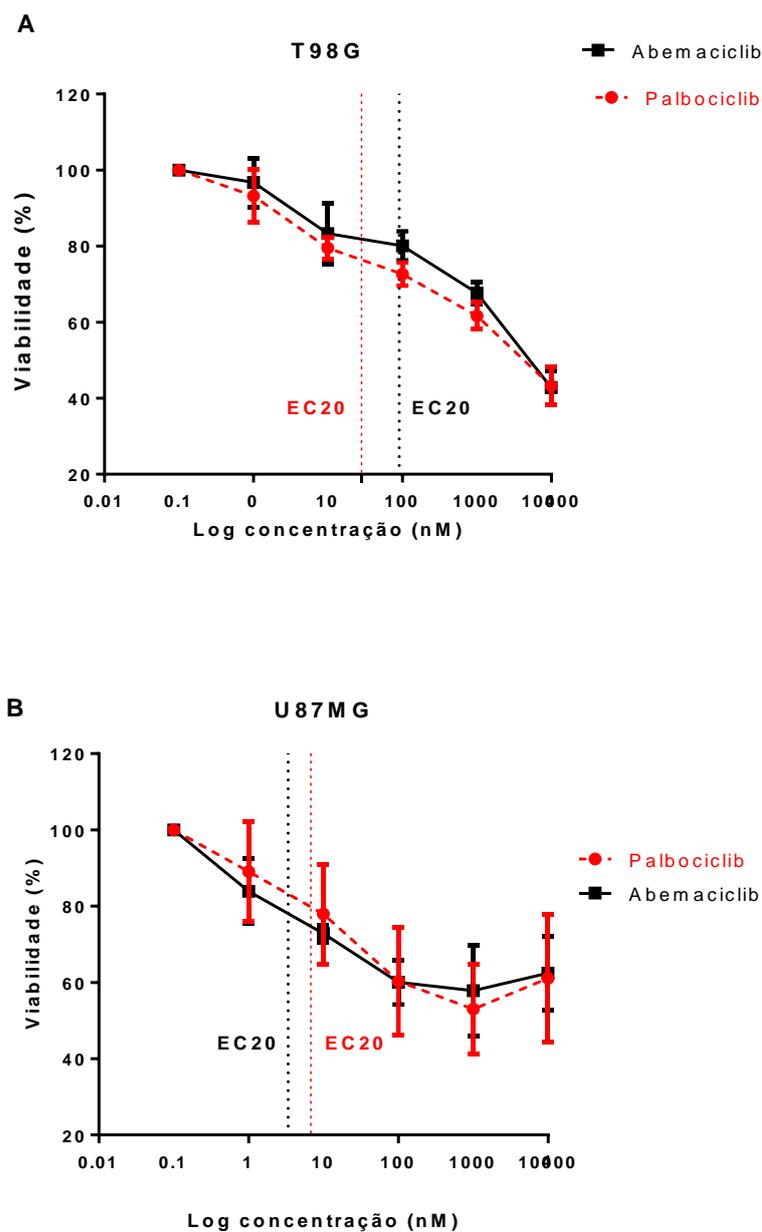


Figura 48: Teste de viabilidade celular - Curvas dose-resposta de viabilidade realizada na linhagem T98G (A) e U87MG (B) segundo o método de MIT tratadas com palbociclibe e abemaciclibe nas doses indicadas por 5 dias. EC₂₀ Abemaciclibe: 90,6 nM (T98G) e 3,4 nM (U87MG); EC₂₀ Plabociclibe: 28,4 nM (T98G) e 6,8 nM (U87MG) – concentração do quimioterápico em que se tem 80% de viabilidade calculado por uma curva de regressão não-linear tipo dose-resposta de inibição normalizada/curva variável no *software Graph PadPrism 6.0*. N=3 experimentos independentes, cada experimento realizado em triplicata.

A tabela 3 representa o resumo do ensaio de viabilidade celular (MTT), em que foi calculado o EC₂₀ dos quimioterápicos e dos inibidores de CDKs correspondentes ao tratamento das linhagens de glioblastoma.

Tabela 3: Estimativa do EC₂₀ das linhagens de glioblastoma com seus respectivos quimioterápicos e inibidores de CDKs.

DROGAS	LINHAGENS DE CÉLULAS – Estimativa EC ₂₀ (quimioterápicos e inibidores de CDKs)	
	T98G	U87MG
Irinotecano	48h: 36,6 µM	48h: 9,5 µM
Temozolamida	72h: 346,7 µM	72h: 527 µM
Abemaciclibe	5 dias: 96,6 nM	5 dias: 3,4 nM
Palbociclibe	5 dias: 28,4 nM	5 dias: 6,8 nM

EC₂₀ calculado através de uma curva de regressão não-linear tipo dose-resposta de inibição normalizada/curva variável no *software GraphPadPrism 6.0*.

5.11 EXPRESSÃO DE RB NAS LINHAGENS DE GLIOBLASTOMA

Em paralelo também aos testes de padronização, para certificar quais doses dos inibidores de CDKs, Palbociclibe e Abemaciclibe, seriam eficazes para inibir a fosforilação da proteína RB, foi feito western blotting nas linhagens T98G e U87MG. A **figura 49** mostra que a fosforilação de RB (pRB) foi inibida completamente usando a dose mais alta de 1000 nM de Palbociclibe na linhagem U87MG por 72 horas, porém, na T98G ainda foi vista expressão de RB nessa dose (**A**). No tratamento de 5 dias com os inibidores usando as doses de 500 e 1000 nM não houve expressão de RB fosforilado nas duas linhagens (**B**).

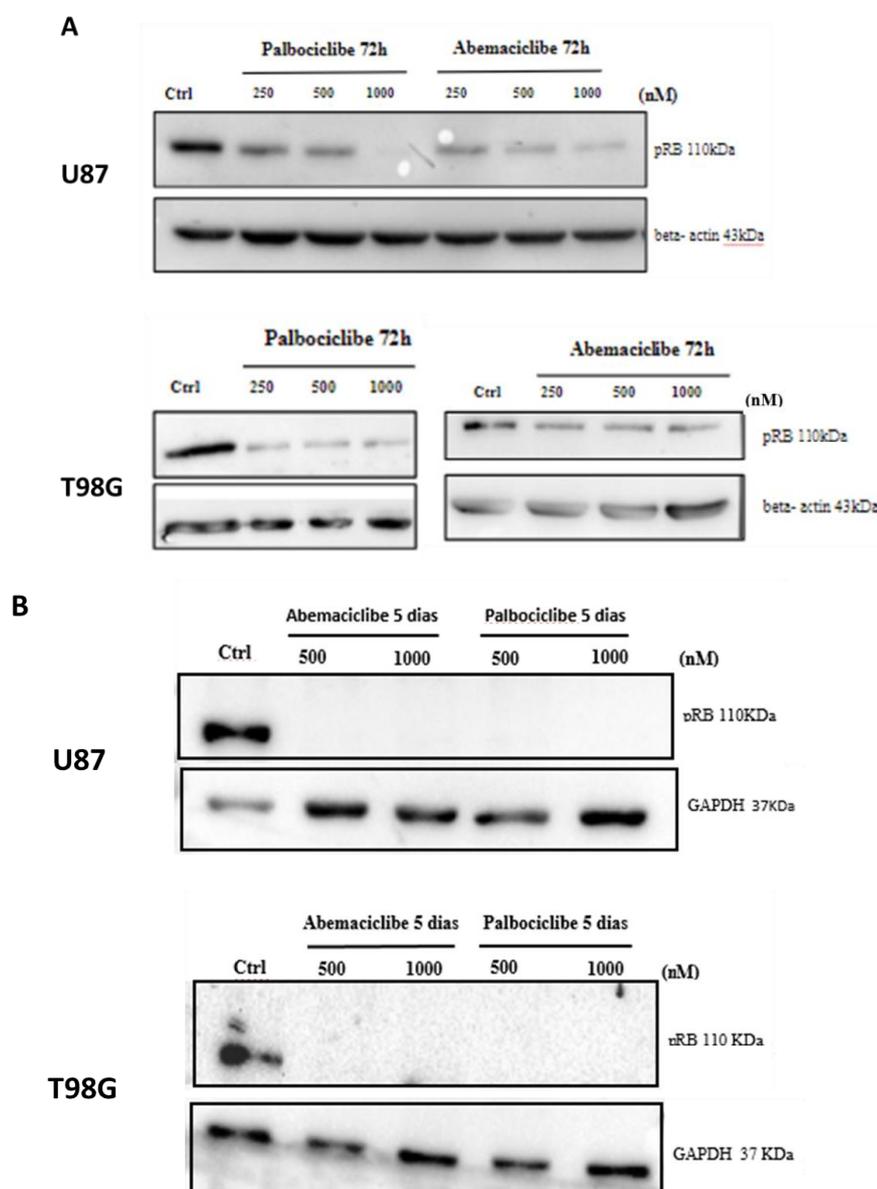


Figura 49: Expressão da proteína pRB após tratamento com inibidores de CDKs nas linhagens U87MG e T98G. As células foram tratadas com Abemaciclibe e Palbociclibe nas concentrações de 250, 500 e 1000 nM por 72 horas e 500 e 1000 nM por 5 dias. GAPDH e beta-actina foram usados como controle de carregamento. N=1 experimento.

5.12 RASTREAMENTO DA LINHAGEM T98G PARA DETECÇÃO DE MORTE CELULAR

A padronização feita para avaliação de morte celular através do Operetta (plataforma de análise multiparamétrica em larga escala) foi aplicada através de um rastreamento na linhagem de glioblastoma T98G frente a quimioterápicos e inibidores de CDKs. A linhagem tumoral T98G foi tratada com Temozolamida 400 μ M (quimioterápico de primeira linha em glioblastomas) e Palbociclibe 1000 nM (inibidor de CDK 4/6) por 72 horas. Como a TMZ é dissolvida em DMSO, essas células foram tratadas com DMSO a 0,4%, correspondente à concentração de 400 μ M de TMZ, por 72 horas, para avaliar a citotoxicidade do veículo. Conforme observado, este composto não se mostrou citotóxico nestas condições. A TMZ diminuiu $63,81 \pm 6,59\%$ o número de células vivas comparado ao controle ($p < 0,0001$). O Palbociclibe fez uma redução de $60,09 \pm 5,0\%$ comparado ao controle ($p < 0,0001$). Porém, não foi significativa a diminuição do número de células vivas quando foi combinado TMZ com Palbociclibe, comparado ao uso da primeira individualmente, já que a TMZ sozinha foi muito tóxica. Esses resultados podem ser observados no gráfico (A) da **figura 50**. A avaliação do efeito de TMZ e Palbociclibe através de um gráfico de número de células mortas não foi possível, como mostra o gráfico (B) da **figura 50**.

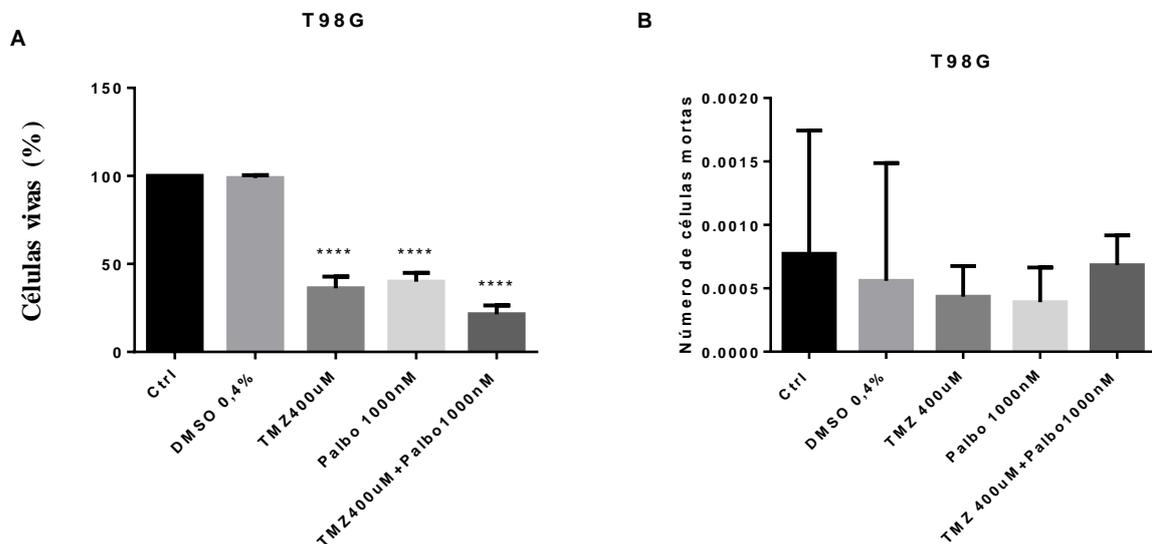


Figura 50: Gráfico de porcentagem de células vivas (A) e do número de células mortas (B) da linhagem T98G. Essas células foram tratadas com DMSO 0,4%, TMZ 400 μ M, Palbociclibe 1000 nM e combinação de TMZ mais Palbociclibe, por 72 horas. (A) O percentual de células vivas, marcadas com calceína, calculado em relação ao controle. (B) Células mortas, marcadas com homodímero de etídeo, detectadas a partir de alta intensidade de fluorescência. Os resultados mostram a média \pm erro padrão (SEM) de N=3 experimentos independentes, cada experimento realizado em triplicatas. **** $p < 0,0001$ em relação ao controle (*OneWay Anova* seguido de *Tukey*).

Há uma grande sensibilidade das células a essas drogas, o que faz com que elas, em sofrimento, se soltem da placa. Dessa forma, torna-se difícil a detecção da célula morta que foi marcada com homodímero de etídeo nos poços onde o tratamento foi mais intenso. Logo, a maneira mais confiável para se avaliar morte celular é através do número de células vivas marcadas com calceína.

A dose 400 μM de TMZ foi escolhida pois no ensaio de MTT representava o EC_{20} , porém, após esse experimento, foi observado que a toxicidade medida por MTT não se compara com a vista utilizando o kit *LIVE/DEAD Cell*. Assim, visto que, a TMZ 400 μM , foi muito tóxica, e o objetivo era ter uma diminuição em aproximadamente 20% no número de células vivas usando quimioterápicos, e a combinação com inibidores de CDKs aumentar ainda mais a toxicidade, foi realizado outro experimento.

As doses de 100 μM de TMZ e 500 nM de Palbociclíbe foram avaliadas além de mais um inibidor de CDK 4/6, o Abemaciclíbe, nas concentrações de 500 e 1000 nM. As células T98G foram tratadas por 72 horas. O gráfico da **figura 51** mostra que a TMZ 100 μM não gerou nenhum efeito significativo na diminuição do número de células vivas quando comparado ao controle. Porém, quando combinada com Palbociclíbe 500 nM ou 1000 nM houve uma diminuição significativa de $45,80 \pm 2,9\%$ e $61,90 \pm 3,5\%$ de células vivas comparada a TMZ 100 μM sozinha ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). A concentração de 500 ou 1000 nM de Palbociclíbe combinada com TMZ 100 μM não mostra diferença significativa quando se compara um ao outro. O uso de Palbociclíbe sozinho tanto na concentração de 500 nM quanto na de 1000 nM teve uma diminuição significativa $49,17 \pm 2,9\%$ e $52,3 \pm 5,8\%$ de células vivas respectivamente, comparada a TMZ 100 μM ($p < 0,01$).

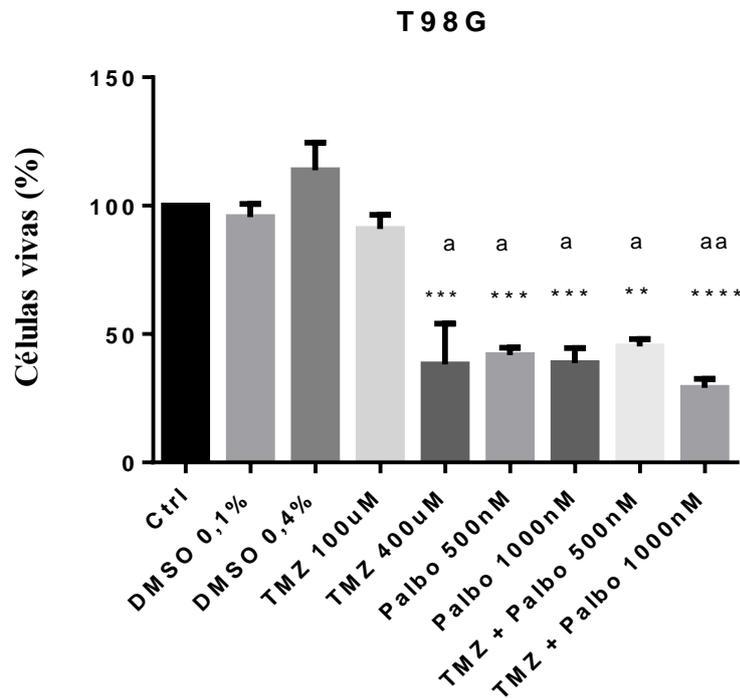


Figura 51: Gráfico de porcentagem de células vivas da linhagem T98G. As células foram tratadas com DMSO (0,1e 0,4%), TMZ (100 e 400 µM), Palbociclib (500 e 1000 nM) e combinação de TMZ 100 µM mais Palbociclib 500 ou 1000 nM, por 72 horas. Os resultados mostram a média ± erro padrão (SEM) de N=3 experimentos independentes, cada experimento realizado em triplicatas. ****p<0,0001, ***p<0,001 e **p<0,01 em relação ao controle e ^ap<0,01, ^{aa}p<0,001 em relação as células tratadas com TMZ 100 µM (*OneWay Anova seguido de Tukey*). O percentual de células vivas foi calculado em relação ao controle. Células vivas marcadas com calceína, foram detectadas a partir de baixa intensidade de fluorescência no verde.

Na **figura 52**, o gráfico mostra que a TMZ 100 µM combinada com Abemaciclibe 500 nM diminuiu significativamente em $47,76 \pm 8,14\%$ o percentual de células vivas comparada com o controle ($p<0,1$). TMZ combinada com Abemaciclibe 1000 nM ocorreu também uma diminuição significativa do número de células vivas comparada com o controle, $66,54 \pm 5,2\%$ ($p<0,01$). O Abemaciclibe 1000 nM sozinho reduziu de forma significativa o percentual de células vivas, $51,62 \pm 6,7\%$ comparado com o controle ($p<0,1$). A TMZ 100 µM combinada com Abemaciclibe 1000 nM reduziu significativamente o percentual de células vivas, $57,51 \pm 5,2\%$ comparado com o uso de TMZ 100 µM sozinha ($p<0,01$).

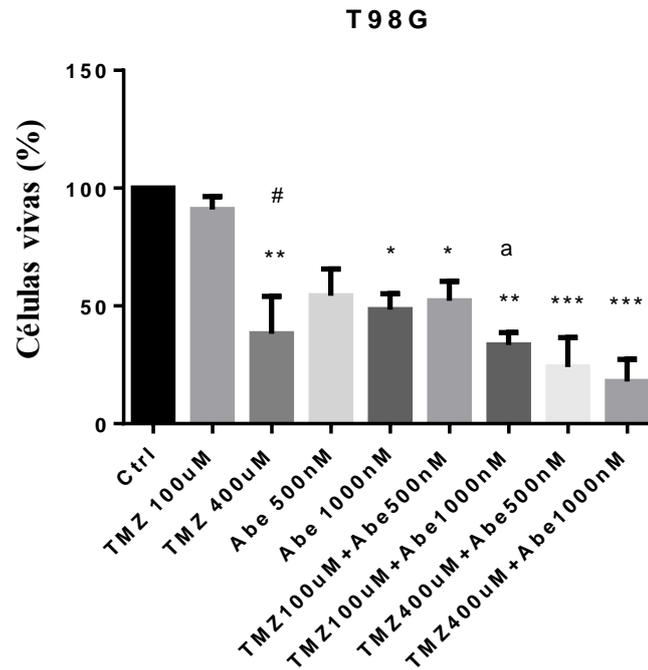


Figura 52: Gráfico de porcentagem de células vivas da linhagem T98G. As células foram tratadas com TMZ (100 e 400 µM), Abemaciclibe (500 e 1000 nM), combinação de TMZ (100 e 400 µM) mais Palbociclibe 500 ou 1000 nM, por 72 horas. Os resultados mostram a média ± erro padrão (SEM) de N=3 experimentos independentes, cada experimento realizado em triplicatas. ** p<0,01, *p<0,1, **p<0,01, e ***p<0,001 em relação ao controle e #p<0,1, ^ap<0,01 em relação as células tratadas com TMZ 100 µM (*OneWay Anova* seguido de *Tukey*). O percentual de células vivas foi calculado em relação ao controle.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que uma densidade alta de plaqueamento atrapalha a identificação dos núcleos pelo programa de análise. Portanto, para linhagens de glioblastoma, como U87MG e T98G, a densidade ótima de plaqueamento para uma placa de 96 poços em uma incubação de 5 dias, é de 2.500 e 1.500 células, respectivamente. Foi visto também, que o Hoescht 33342, corante de núcleos, quando incubado em uma concentração de 0,5µM por 30 minutos e a aquisição da imagem feita em um tempo de exposição de 200ms, permite visualizar os núcleos de células vivas que são menos brilhantes que os das mortas, permitindo que o algoritmo *Find Nuclei* do programa de análise consiga identificá-los.

Para avaliação de morte celular na linhagem de glioblastoma T98G, o kit *LIVE/DEAD Cell* foi o melhor dentre as outras sondas testadas, já que o BOBO-3 se mostrou permeável ao citoplasma das populações de células vivas e o *CellEvent* (Caspase 3/7), não foi capaz de marcar o núcleo de células apoptóticas. Por ser composto por um corante para identificar células mortas e outro para detecção de células vivas, o *LIVE/DEAD Cell* facilitou visualmente a análise,

distinguindo facilmente as duas populações. Além disso, ter um marcador de células vivas foi essencial para quantificação de morte celular, uma vez que as células mortas, sensibilizada pelos quimioterápicos, tendem a se soltarem da placa.

A leitura com as células vivas não ocasionou nenhuma alteração na morfologia das células, uma vez que estas permaneceram em um tampão composto por glicose, cálcio e magnésio para leitura, além da plataforma HCS manter a temperatura e CO₂ nas condições adequadas para a célula. Já a leitura com as células fixadas, além de demandar mais uma etapa, a de fixação, após a incubação com as sondas, o BOBO-3 corou todas as células, não sendo possível distinguir as populações de células vivas e mortas. Dessa forma, as leituras foram realizadas nas células vivas.

A lente objetiva 20x LD se mostrou melhor para aquisição das imagens comparada a lente WA.

Em relação à detecção de autofagia, as duas sondas, laranja de acridina e *lysotracker*, têm a mesma finalidade, de corar vesículas ácidas, e são igualmente detectáveis pela plataforma HCS. Portanto, para o uso do laranja de acridina, é realmente importante calcular a intensidade de fluorescência usando o RGIF. A concentração final de 0,5µg/mL foi a que melhor distinguiu a intensidade de fluorescência do citoplasma entre o grupo controle e tratado. Já com *lysotracker*, não foi perceptível diferenças na identificação dos *spots* usando a concentração de 75 nM ou 50 nM.

A distribuição dos campos do poço para aquisição das imagens e posterior análise é extremamente importante. Assim, a melhor forma encontrada, foi distribuir amplamente os campos no poço, descartando sempre um campo entre dois campos e evitando os campos da extremidade do poço onde a pipeta é usada. Dezesete campos foram suficientes para a realização das análises.

O *pipeline* para identificação de morte celular e autofagia na linhagem T98G foi descrito passo a passo nesse trabalho o que facilitará o uso do programa de análise por novos usuários da plataforma HCS, tornando-os mais independentes em suas pesquisas.

Todos esses parâmetros definidos para análise de morte celular em uma plataforma HCS, foram aplicados na linhagem de glioblastoma T98G, frente ao quimioterápico de primeira linha temozolamida e inibidores de CDKs e se mostraram bastante eficientes na detecção da sensibilidade das células a essas drogas, garantindo assim a eficácia do trabalho produzido atendo a proposta do Mestrado Profissional.

7 REFERÊNCIAS

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. **Brain tumor FAQs**, 2018. Disponível em: <<https://www.abta.org/about-brain-tumors/brain-tumor-faqs/>>. Acesso em: 15 março. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Chemotherapy for adult brain and spinal Cord tumors**, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/treating/chemotherapy.html>>. Acesso em: 16 março. 2018.

AHONEN, I. et al. A high-content image analysis approach for quantitative measurements of chemosensitivity in patient-derived tumor microtissues. **Scientific Reports**, v.7, n. 6600, p. 1-18, july. 2017.

ALVES, T. R. et al. Glioblastoma cells: A heterogeneous and fatal tumor interacting with the parenchyma. **Life Sciences**, v. 89, p. 532-539, apr. 2011.

AMAVARADI, R. K. et al. Principles and Current Strategies for Targeting Autophagy for Cancer Treatment. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 4, p. 654-666, feb. 2011.

BAI, J.; LI, Y.; ZHANG, G. Cell cycle regulation and anticancer drug Discovery. **Cancer Biology & Medicine**, v. 14, n. 4, p. 349 – 362, nov. 2017.

BIASOLI, D. et al. Retinoblastoma protein regulates the crosstalk between autophagy and apoptosis, and favors glioblastoma resistance to etoposide. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 8, p. e767, ago. 2013.

BRAGANZA, M. Z. et al. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1316–1324, 2012.

CHEN, J.J. et al. A sensitive and quantitative autolysosome probe for detecting autophagic activity in live and prestained fixed cells. **Autophagy**, v. 9, n. 6, p. 894–904; June 2013.

CHIKTE, S.; PANCHAL, N.; WARNES, G. Use of LysoTracker Dyes: A Flow Cytometric Study of Autophagy. **International Society for Advancement of Cytometry**, v.85, p. 169-178, 2014.

CHIRAVIGLIO, L.; KIRBY, J. E. Evaluation of Impermeant, DNA-Binding Dye Fluorescence as a Real-Time Readout of Eukaryotic Cell Toxicity in a High Throughput Screening Format. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 219-228, may. 2014.

CHOU DHURY, J. D. et al. A review on apoptosis & its different pathway. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 7, p. 848-861, 2012.

DELOU, J. M.; BIASOLI, D., LOBO, H. B. The Complex Link between Apoptosis and Autophagy: a Promising New Role for RB. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 88, n. 4, p. 2257-2275, 2016.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival.

Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271–7, 22 maio 1986.

DE ROBLES, P. et al. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. **Neuro-Oncology**, v. 17, n. 6, p. 776-783, 2015.

ELKON, K. B. Apoptosis, Necrosis, and Autophagy. In: WALLACE, Daniel; HAHN, Brea. **Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes**. Elsevier Health Sciences, 2013, cap. 11, p. 115-126.

ETTL, J.; HARBECK, N. The safety and efficacy of palbociclib in the treatment of metastatic breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Temodal, INN-Temozolamide: Resumo das características do medicamento**, 2017.

FUJII, S. et al. Blackwell Publishing Asia Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. **Cancer Sci**, v. 99, n. 9, p. 1813-1819, sept. 2008.

FLORIAN, I. S.; UNGUREANU, G.; BERCE, C. Risk factors for gliomas. An extensive review. **Romanian Neurosurgery**. v. 20, n. 1, p. 5-21, 2013.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, p. 58–73, 2015.

GILBERT, D. F.; BOUTROS, M. A Protocol for a High-Throughput Multiplex Cell Viability Assay. In: AZORSA, David O.; ARORA, Shilpi. **High-Throughput RNAi Screening: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Springer Science+Business Media, 2016. cap. 6, p. 75-84.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **Journal Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, may. 2010.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, jan. 2007.

G1 THERAPEUTICS. **CDK4/6 biology**, 2017. Disponível em: <http://investor.g1therapeutics.com/phoenix.zhtml?c=254335&p=irol-SECText_pf&TEXT=aHR0cDoVLT2FwaS50ZW5rd2l6YXJkLmNvbS9maWxpbcueG1sP2lwYWdlPTExNTg5NTYwJkRTRVE9MSZTRVE9OTUUmU1FERVNDPVNFQ1RJT05fUEFHRSZleHA9JnN1YnNpZD01Nw==>. Acesso em: 18 março. 2018.

HASSAN, F. et al. Cytotoxicity anticancer activities of anastrozole against breast, liver hepatocellular, and prostate cancer cells. **Saudi Medical Journal**, v. 38, n. 4, p. 359–365, abr. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **O que é câncer?** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 15 março. 2018a.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2017b.

JANKU, F. et al. Autophagy as a target for anticancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, p. 528–539, may. 2011.

KIM, S. E.; SCOTT, L. J. Palbociclib: A Review in HR-Positive, HER2-Negative, Advanced or Metastatic Breast Cancer. **Targeted Oncology**, v. 12, p. 373–383, 2017.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

LIMA, F. R. S. et al. Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1826, n. 2, p. 338–349, dez. 2012.

LIU, X. et al. Knockdown of retinoblastoma protein may sensitize glioma cells to cisplatin through inhibition of autophagy. **Neuroscience Letters**, v. 620, p. 137–142, apr. 2016.

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, aug. 2007.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, jun. 2016.

MAHER, E. A. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes & development**, v. 15, n. 11, p. 1311–1333, jun. 2001.

MANUAL DE ONCOLOGIA CLÍNICA DO BRASIL (MOC). Disponível em: <<https://mocbrasil.com/>>. Acesso em: 16 março. 2018.

MARIAULE, G.; BELMONT, P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marketed Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey. **Molecules**, v. 19, p. 14366–14382, sept. 2014.

MATHIS, S. A. et al. Chemo-Predictive Assay for Targeting Cancer Stem-Like Cells in Patients Affected by Brain Tumors. **Plos one**, v. 9, n. 8, p. 1–13, aug. 2014.

MIOULANE, M. et al. Development of High Content Imaging Methods for Cell Death Detection in Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 5, p. 593–604, 2012.

MIRANDA-FILHO, A. et al. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 2, p. 270–280, 2017.

MITTLER, F. et al. High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. 293, p. 1–19, dec. 2017.

NAJMAN, H.; GADELHA, M. I. P. Temozolamida. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 439-445, 2002.

NDOYE, A.; WEERARATNA, A. T. Autophagy – An emerging target for melanoma therapy. **F1000 Research**, v. 5, p. 1-9, 2016.

OMURO, A.; DEANGELIS, L. M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. **Clinical Review & Education**, v. 310, n. 17, p. 1842-1850, nov. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Câncer**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 15 março. 2018.

PANDA, P. K. et al. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, p. 1-13, 2015.

PATNAIK, A. et al. Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. **Cancer discovery**, p. 740-753, july. 2016.

PERKINELMER. **Operetta High-Content Imaging System**. Disponível em: <<http://www.perkinelmer.com/product/operetta-configuration-hh12000000>>. Acesso em: 18 março. 2018.

PRICE, R. L.; CHIOCCA, E. A. Evolution of Malignant Glioma Treatment: From Chemotherapy to Vaccines to Viruses. **Neurosurgery**, v. 61, n. 01, p. 74-83, aug. 2014.

RAUB, T. J. et al. Brain Exposure of Two Selective Dual CDK4 and CDK6 Inhibitors and the Antitumor Activity of CDK4 and CDK6 Inhibition in Combination with Temozolomide in an Intracranial Glioblastoma Xenograft. **Drug metabolism and disposition**, v. 43, p. 1360–1371, sept. 2015.

RECONDO JR, G. et al. Advances and new perspectives in the treatment of metastatic colon cancer. **World Journal Gastrointestinal Oncology**, v. 15; n.7, p. 211-224, july. 2014.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C. et al. Cyclin Dependent Kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, p. 1-28, may. 2015.

SHERGALIS, A. et al. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastomas. **Pharmacological reviews**, v. 70, n. 3, p. 412-445, july. 2018.

SMITH, B. A.; SMITH, B. D. Biomarkers and Molecular Probes for Cell Death Imaging and Targeted Therapeutics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1989–2006, oct. 2012.

SOLETTI, R. C. et al. Inhibition of pRB Pathway Differentially Modulates Apoptosis in Esophageal Cancer Cells. **Translational Oncology**, v. 10, n. 5, p. 726-733, oct. 2017.

SURYADINATA, R.; SADOWSKI, M.; SARCEVIC, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. **Biosciences Reports**, v. 30, n. 4, p. 243-255, 2010.

THERMOFISHER. **BOBO-3 Iodide (570/602), 1 mM solution in DMSO**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B3586>>. Acesso em: 16 abril. 2018a.

THERMOFISHER. **CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10423>>. Acesso em: 16 abril. 2018b.

THERMOFISHER. **LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3224>>. Acesso em: 16 de abril. 2018c.

THERMOFISHER. **LysoTracker Green DND-26 Special Packaging**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7526>>. Acesso em: 15 de abril. 2018d.

THERMOFISHER. **Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate - 10 mg/mL Solution in Water**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H3570>>. Acesso em: 15 de abril. 2018e.

THOMÉ, M.P. **Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador laranja de acridina**. 2013. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso em Biomedicina – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, p. jcs.195057, 14 nov. 2016.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS (UNICAMP). **Astrocitoma fibrilar**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/lamneuro13.htm>>. Acesso em: 25 abril. 2018a.

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS (UNICAMP). **Glioblastoma multiforme**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/lamneuro14.htm>>. Acesso em: 25 abril. 2018b.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Highlights of prescribing information for Verzenio (abemaciclib)**, 2018.

YANG, X. et al. Autophagy Protects MC3T3-E1 Cells upon Aluminum-Induced Apoptosis. **Biological Trace Element Research**, feb. 2018.

YU, K. K.H. et al. High content screening of patient-derived cell lines highlights the potential of non-standard chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma. **Plos one**, p. 1-17, mar. 2018.

YUE, Z. et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. **PNAS**, v. 100, n. 25, p. 15077-15082, dec. 2003.

ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: Mechanisms of Action, Repair and Resistance. **Current Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 102-114, 2012.

ZONG, H.; VERHAAK, R. G. W.; CANOLL, P. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 4, p. 383–394, may. 2012.

ANEXO I

MANUAL PARA ANÁLISE DE MORTE CELULAR E AUTOFAGIA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA T98G ATRAVÉS DE ENSAIO EM PLATAFORMA MULTIPARAMÉTRICA

Alana S. Oliveira Souza, Karina L. Hajdu, João M. Delou, Stevens Rehen, Helena L. Borges.

RACIONAL E OBJETIVO

Esse manual fornece procedimentos para um ensaio em plataforma multiparamétrica para avaliação *in vitro* de morte celular e autofagia, induzidas por drogas e inibidores de CDKs, em linhagens comerciais de glioblastoma. O manual é baseado no rastreamento de alto conteúdo (HCS), tecnologia que permite aquisição e análise automatizada de imagens monitorando vários eventos celulares e fornecendo informações sobre características e morfologia das células marcadas com corantes fluorescentes. Medindo os parâmetros de morte celular e autofagia é possível determinar a sensibilidade ou resistência a drogas e assim decidir por melhores combinações a serem utilizadas na clínica. Exemplificamos o passo-a-passo para execução deste protocolo utilizando células de glioblastoma T98G cultivadas em placa de 96 poços para testar quimioterápicos de primeira linha e inibidores de CDKs, sozinhos ou em combinações.

Assim, o objetivo deste manual é fornecer um protocolo detalhado de avaliação de morte celular e autofagia em linhagens celulares sob ação de diferentes drogas e compostos utilizando a plataforma de rastreamento de alto conteúdo (HCS). Ele pode ser subdividido em duas etapas principais: (1) tratamento de células com compostos *in vitro* e (2) ensaio de alto conteúdo (HCS).

1. TRATAMENTO DE CÉLULAS COMPOSTOS *in vitro*

Orientações gerais:

Para a execução do protocolo todas as soluções e materiais usados para cultura e tratamento das células deverão ser estéreis assim como todos os procedimentos executados em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar previamente submetida à luz ultra violeta por 15 minutos). Para avaliar a toxicidade das drogas sozinhas ou em combinação, as células devem ser tratadas com as drogas e compostos de interesse, onde a concentração e o tempo de incubação precisarão ser padronizados pelo pesquisador. A solução veículo onde as drogas

serão solubilizadas devem ser utilizadas como controles experimentais, ou seja as células precisarão ser tratadas somente com o veículo para investigação se este, por si só, também possui efeito sobre a autofagia e morte celular. Controles negativos (sem tratamento) também precisam ser incluídos no desenho experimental.

Este protocolo foi estabelecido utilizando linhagem celular de glioblastoma humano T98G (código ATCC: CRL-1690) e tratadas com as drogas Temozolamida e inibidores de CDKs (Abemaciclibe e Palbociclibe) por 72 horas, a fim de analisar morte celular e inibição de proliferação, respectivamente. As drogas utilizadas foram solubilizadas em DMSO (veículo), que por ser tóxico, também foi utilizado nas concentrações correspondentes às de TMZ, uma vez que esta foi utilizada em doses mais altas. Para detectar autofagia, as células foram expostas por 3 horas a um composto indutor de autofagia (*Krebs*). Controles negativos (sem tratamento) foram utilizados para comparação.

Materials

Tampão salina fosfato, pH 7,4 (PBS) (Thermo Fisher # 70013032)

Tripsina 1x (Thermo Fisher # 25200114)

Meio de cultura DMEM F12 (Thermo Fisher # 12400024) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab # 2777500). O uso de 1% do antibiótico penicilina/estreptomicina (ThermoFisher #10378016) na solução final do meio é opcional.

Cultura de células de glioblastoma (T98G) em placa de 96 poços

Compostos (Temozolamida, Abemaciclibe, Palbociclibe e Krebs)

DMSO (Thermo Fisher # D12345)

Banho-maria a 37°C

Estufa incubadora de células (37 °C e 5% CO₂)

Plaqueamento das células em cultura

1. Plaquear 1.500 células em 100 µL de meio por poço com a pipeta multicanal em placa de 96 poços greiner µclear (Greiner bio-one). Caso o pesquisador opte por trabalhar com uma linhagem celular diferente, recomenda-se realizar a otimização da densidade celular antes de iniciar o protocolo.

Recomenda-se primeiramente plaquear 50 uL de meio em todos os poços e depois os 50 uL restantes com as células, para que, assim, haja uma aderência mais homogênea ao fundo do poço, o que facilita a obtenção de imagens na plataforma.

Antes de cada aplicação de células na placa é necessário ressuspender várias vezes, com a própria multicanal, o meio com a células. Isso faz com que as células não se depositem no fundo do recipiente e assim diminui os riscos do plaqueamento ficar heterogêneo.

Recomenda-se que a utilização da pipeta multicanal na aplicação das células na placa seja feita em posição vertical (colunas). Se por ventura ocorrer algum erro de pipetagem ou menos quantidade de célula for sugada pela pipeta, a triplicata da condição não será toda afetada.

Após cada aplicação de células na placa executar um movimento horizontal em forma de 8, por pelo menos 10 vezes, para que a ocorra a homogênea distribuição das células no poço, evitando que estas se aglomerem no centro do mesmo.

2. As células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas.

Preparação dos compostos

3. A preparação dos compostos TMZ (100 e 400 µM), Abemaciclib e Palbociclibe (500 e 1000 nM), deve ser realizada em uma concentração 2 vezes maior que a concentração de uso, em um volume final de 100 µL de meio a ser aplicada em cada poço. Esta deve ser acrescentada nos poços já contendo 100 µL de meio (para droga usada individualmente) ou de outra droga (uso de drogas combinadas). Fator de diluição 1:2. O DMSO deverá ser preparado nas concentrações 0,1 e 0,4%, correspondentes às concentrações de 100 e 400 µM de TMZ, respectivamente.

4. Para indução da autofagia utilizar o tampão *Krebs-Ringer* (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 10 mM glicose e 10 mM HEPES, pH 7.4)

Exposição da cultura de células aos compostos

5. Remover o meio de cultura da placa de cultivo. Adicionar 200 µL de meio novo nos poços controle (sem tratamento). Nos poços correspondentes ao veículo adicionar concentrações adequadas como descrito anteriormente. Neste exemplo em que o veículo é o DMSO adicionar 200 µL na concentração de 0,1% e também na de 0,4%.

6. Adicionar 100 µL de cada composto (TMZ: 200 e 800 µM; Abemaciclib e Palbociclibe: 1000 e 2000 nM) nos poços que receberão tratamento. Nesses poços acrescentar

100 μL de meio (nas condições em que o tratamento avaliará a ação de uma única droga) ou 100 μL de outra droga (nas condições em que o tratamento será combinado por duas drogas). Dessa forma, tem-se uma diluição 1:2, chegando a concentração final de uso dos compostos, mencionada no tópico 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ctrl	Ctrl	Ctrl	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	DMSO 0,1%	DMSO 0,4%	DMSO 0,4%	DMSO 0,4%	TMZ 100 μM	TMZ 100 μM	TMZ 100 μM
B	TMZ 400 μM	TMZ 400 μM	TMZ 400 μM	Palbo 500 nM	Palbo 500 nM	Palbo 500 nM	Palbo 1000 nM	Palbo 1000 nM	Palbo 1000 nM	TMZ 100 μM + Palbo 500 nM	TMZ 100 μM + Palbo 500 nM	TMZ 100 μM + Palbo 500 nM
C	TMZ 100 μM + Palbo 1000 nM	TMZ 100 μM + Palbo 1000 nM	TMZ 100 μM + Palbo 1000 nM	Abe 500 nM	Abe 500 nM	Abe 500 nM	Abe 1000 nM	Abe 1000 nM	Abe 1000 nM	TMZ 100 μM + Abe 500 nM	TMZ 100 μM + Abe 500 nM	TMZ 100 μM + Abe 500 nM
D	TMZ 100 μM + Abe 1000 nM	TMZ 100 μM + Abe 1000 nM	TMZ 100 μM + Abe 1000 nM	TMZ 400 μM + Abe 500 nM	TMZ 400 μM + Abe 500 nM	TMZ 400 μM + Abe 500 nM	TMZ 400 μM + Abe 1000 nM	TMZ 400 μM + Abe 1000 nM	TMZ 400 μM + Abe 1000 nM			
E												
F												
G												
H												

Figura 1: Configuração de tratamento de células T98G em uma placa de 96 poços.

Foram feitos três poços independentes (triplicatas) para cada condição de tratamento. As ponteiras foram trocadas a cada condição.

A figura 1 exemplifica a configuração de montagem de uma placa para tratamento das células para o uso da lente objetiva 20x Long Working Distance (LWD). Nesta, os poços das extremidades não precisam ser descartados, havendo total aproveitamento da placa.

7. O tempo de incubação em estufa deverá ser padronizado para cada droga a ser utilizada. Para as drogas TMZ; Abemaciclibe e Palbociclibe: as células deverão ser incubadas em estufa por 72 horas a 37 °C e 5% de CO₂.

8. Para indução de autofagia as células devem ser incubadas com 100 μL de *Krebs* por 3 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

2. ENSAIO DE RASTREAMENTO DE ALTO CONTEÚDO

Incubar as células previamente expostas à tratamento com drogas com sondas fluorescentes para detecção de morte celular e autofagia. Em seguida, adquirir as imagens na plataforma *Operetta High Content Imaging System* pelo software *Harmony* e analisar usando o programa de análise *Columbus*.

Materials

Sondas fluorescentes para morte celular:

Hoechst 33342 16 mM (Molecular Probes # H3570) - Excitação/Emissão (nm): 350/461;

Kit *LIVE/DEAD Cell* (Molecular Probes # L3224);

Calceína 4 mM, Excitação/Emissão (nm): 494/517;

Homodímero de etídio 2 mM, Excitação/Emissão (nm): 528/617.

Sondas fluorescentes para autofagia (marcação do núcleo celular e vesículas ácidas):

Hoechst 33342 (Molecular Probes) - Excitação/Emissão (nm): 350/461;

Lysotracker green DND-26 1mM (Molecular Probes # L7526) - Excitação/Emissão (nm): 504/511 ou Laranja de acridina 1mg/mL (Merck Millipore nº 113000) - Excitação/Emissão (nm): 490-510/560-630.

Tampão *Tyrode* pH 7,4 (139 mM NaCl 3 mM KCl 17 mM NaHCO₃ 12 mM Glicose 3 mM CaCl₂ 1 mM MgCl₂)

Meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino

Banho-maria a 37° C

Estufa incubadora de células (37° C e 5% CO₂)

Plataforma de rastreamento de alto conteúdo (*Operetta PerkinElmer*) e software de análise (*Columbus*)

Preparação da mistura das sondas fluorescentes

1. Para o preparo da mistura das sondas fluorescentes para detecção de morte celular utilizar Hoechst 33342 e o kit *LIVE/DEAD Cell* diluídos em *Tyrode* para um volume final de 100 µL por poço.

A concentração final de cada sonda deve ser de: 0,5 µM de Hoechst 33342, 0,5 µM de calceína e 2µM de Homodímero de Etídeo.

Preparar a mistura das sondas fluorescentes em Tyrode no momento do uso. Utilizar o tampão tyrode pois o meio DMEM F12 influencia na fluorescência das sondas e o PBS não mantém as células aderidas na placa.

Armazenar as alíquotas da solução estoque do Hoechst 33342 em temperatura de 4 °C. Estocar as alíquotas do kit LIVE/DEAD Cell em -20 °C, ambas protegidas da luz.

1. Para o preparo da mistura das sondas fluorescentes para detecção de autofagia utilizar Hoechst 33342, *Lysotracker green* ou Laranja de acridina diluídos em meio DMEM F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino para um volume final de 100 µL por poço.

A concentração final de cada sonda será de: 0,5 µM de Hoechst 33342, 75 nM de Lysotracker green ou 0,5 µg/mL de Laranja de acridina.

Preparar a mistura das sondas fluorescentes em meio no momento do uso.

Diluir as sondas no próprio tampão para os poços que serão tratados com Krebs (tampão indutor de

Estocar as alíquotas de Lysotracker green e Laranja de acridina a -20 °C, ambas protegidas da luz.

Marcação das células com sondas fluorescentes

2. Remover o meio das células na placa de 96 poços.

Para o uso do kit LIVE/DEAD Cell é necessário lavar os poços 1 vez com Tyrode para diminuir a atividade da esterase presente no meio suplementado com soro.

3. Adicionar 100 µL da mistura das sondas (para morte celular ou autofagia) em cada poço e incubar a placa de células em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 30 minutos.

4. Remover o líquido da placa e lavar 3 vezes com *Tyrode*, permanecendo neste tampão (100 µL) para leitura no *Operetta*.

No ato de puxar e dispensar o tampão nos poços para a lavagem é importante que o tip esteja encostado na parede do poço para evitar ao máximo o contato com fundo para que as células não sejam raspadas.

A dispensa do líquido deve ser feita com suavidade, evitando o jateamento e assim o desprendimento das células no poço.

Aquisição das imagens

5. Adquirir as imagens após a marcação das células (incubação de 30 minutos com as sondas fluorescentes) posicionando a placa de cultura no equipamento *Operetta*. Utilizar o *software Harmony*.

6. Para a aquisição das imagens, utilizar filtros apropriados para cada sonda, tempo de exposição fixo em 200 ms, excitação de 50% e transmissão de 0%. Utilizar a objetiva a 20x LWD (*Long Working Distance*).

Os corantes são excitados e sua fluorescência é acompanhada através dos comprimentos de onda de excitação e emissão, mencionados no tópico Materiais.

7. Gerar dezessete campos espalhados pelo poço para aquisição e posterior análise da imagem conforme exemplificado na Figura 2.

A disposição ideal dos campos é distribuí-los separadamente pelo poço, pulando um campo entre dois escolhidos. Dessa forma, evita-se o risco de haver campo sem células, caso ocorra algum problema de plaqueamento ou desprendimento das células.

A figura 2 exemplifica o que representa uma boa distribuição dos campos.

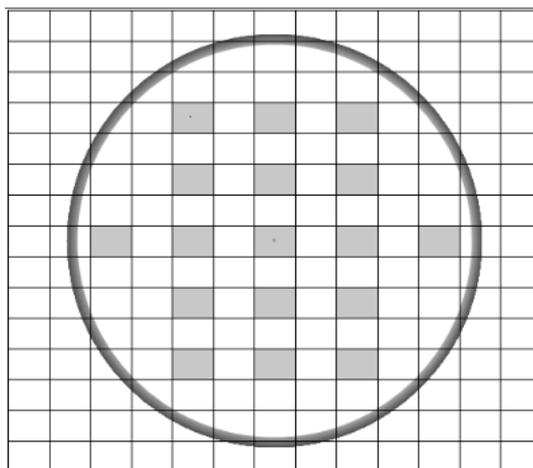


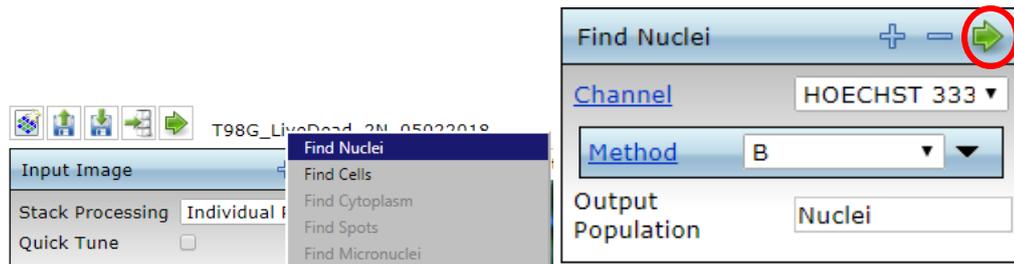
Figura 2: Distribuição ideal dos campos em um poço visualizado com objetiva de 20x.

Análise das imagens

Avaliação de morte celular

8. Utilizar o *software Columbus* para analisar as imagens coletadas. *Este* permite a quantificação simultânea de células e estruturas intracelulares coradas por diferentes sondas fluorescentes, medindo também a intensidade de fluorescência.
9. Para iniciar as análises no *software Columbus* clicar no ícone *Image Analysis*, em seguida em *New Analysis* e logo depois em *Input Image (+)*.
10. Clicar na opção *Find Nuclei* para definir os núcleos separadamente, que são identificados pelo canal do Hoescht 33342. Dentro de *Find Nuclei*, clicar em *Methods*, e selecionar o método que reconheça o maior número de núcleos, conforme exemplificado na figura 3. Nessa parte, é necessário olhar outros campos e poços e observar se o reconhecimento está abrangente o suficiente.

A



B

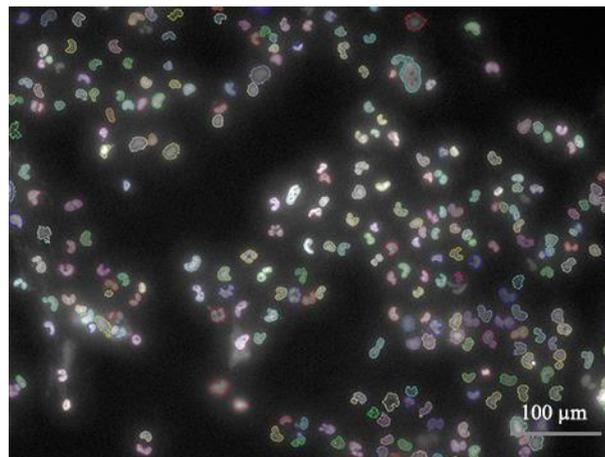


Figura 3: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus. (A) Passo 1 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Nuclei* no canal do Hoescht 33342. O método escolhido que melhor delimitou os núcleos foi o B. (B) Fotomicrografia da análise dos núcleos identificados com Hoescht 33342 e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Nuclei*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 20x LD.

Para a linhagem T98G, o método que melhor delimita e separa os núcleos entre os 4 disponíveis é o B. A T98G é uma linhagem de núcleo multilobulado (Figura 4), o que pode gerar algumas dificuldades na hora de definir o melhor algoritmo de definição dos núcleos, pois muitas vezes o software reconhece 2 lóbulos como 2 núcleos separados. Dessa forma, a escolha do método é variável, e todos devem ser testados para que seja definido o melhor para o tipo celular de interesse do pesquisador.

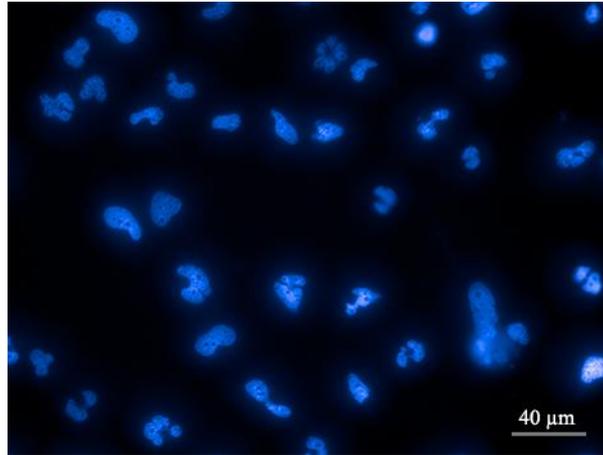


Figura 4: Linhagem comercial de glioblastoma T98G marcada com Hoechst 33342. Foto tirada no Operetta com objetiva de 40x.

Clicar na seta verde (circulada em vermelho na figura 3) após a definição de cada algoritmo ao longo da análise para que seja aplicada sua escolha.

11. Clicar na opção *Select Population* para remover os núcleos das bordas. Cada vez que for usada a opção *Select Population* será necessário nomear a nova população criada (Figura 5).

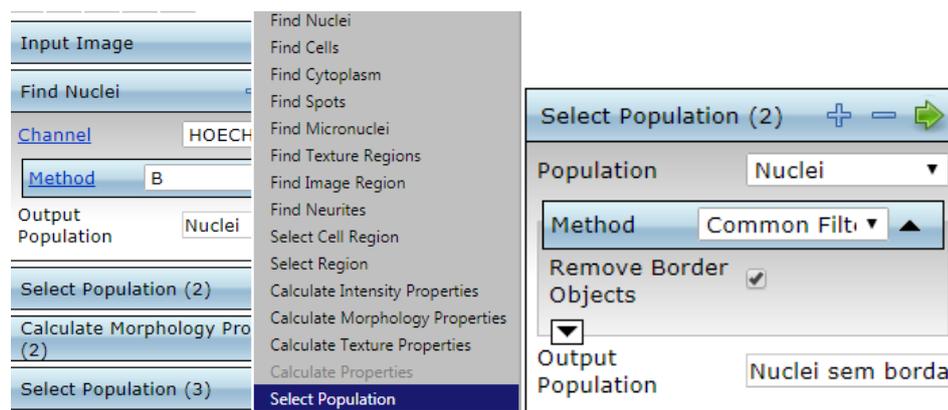


Figura 5: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus para exclusão dos núcleos da borda. Passo 2 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos com remoção dos objetos da borda gerando uma nova população (núcleo sem borda).

Selecionar a opção: *Remover objetos da borda*.

Neste exemplo foi dado o nome "Nuclei sem borda" à nova população de núcleos criada.

12. Clicar em *Calculate Morphology Properties*. dentro de *Population*, definir a população da qual se quer obter as propriedades e dentro de *Region*, definir a região de interesse dentro da população (Figura 6).

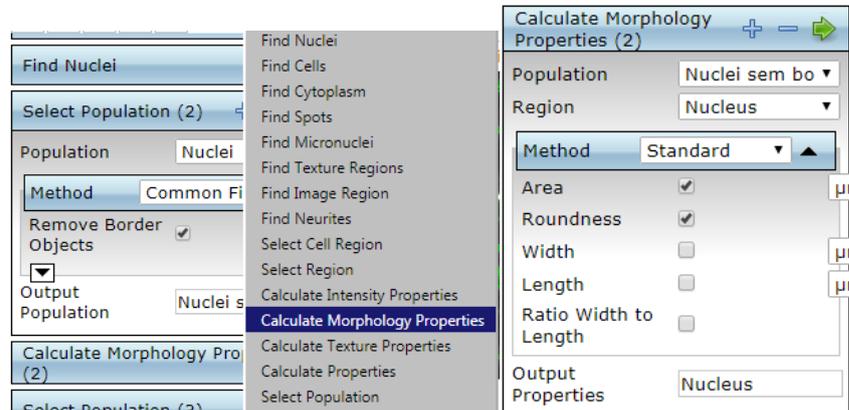


Figura 6: Passo 3 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população núcleo sem borda na região do núcleo. Os métodos escolhidos para seleção do núcleo foram área e circularidade.

Esse algoritmo foi aplicado no núcleo da população “nuclei sem borda”.

Selecionar os parâmetros de área (Area) e circularidade (Roundness) para definir o tamanho do núcleo da linhagem T98G. O parâmetro Ratio Width to Length também pode ser calculado quando se quer definir células em processo de mitose, no qual a célula se torna mais alongada e comprida (Figura 7).

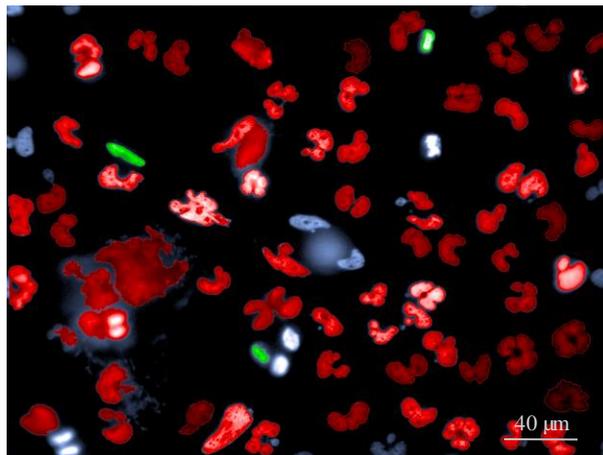


Figura 7: Imagem representativa da análise morfológica das células T98G. Células em verde apresentam morfologia diferenciada, típica do processo de mitose. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

13. Clicar em *Select Population* novamente para definir a população de núcleos de interesse por área e circularidade, de modo a eliminar *debris* e bolhas que possam ter sido interpretadas

como núcleos pelo algoritmo. Como os *debris* são muito pequenos, seleciona-se um tamanho mínimo para ser considerado um núcleo. As bolhas, por outro lado, são muito redondas, definir um limite máximo de *Roundness* (Figura 8).

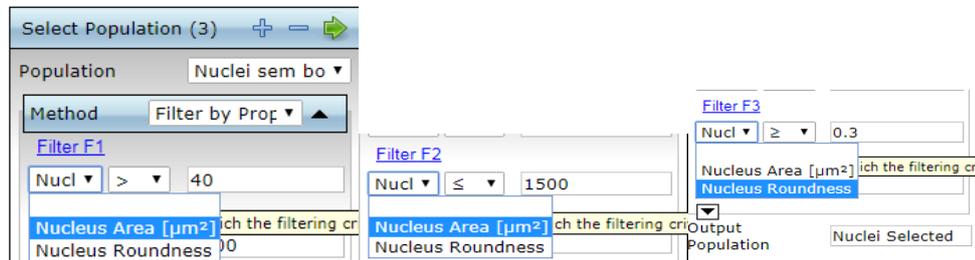


Figura 8: Análise dos núcleos das células T98G pelo software Columbus para exclusão dos núcleos conforme área e circularidade. (A) Passo 4 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* através dos tamanhos de área e circularidade do núcleo. Os filtros escolhidos para seleção do núcleo foram área $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 1.500 \mu\text{m}^2$ e circularidade $\geq 0.3 \mu\text{m}^2$. A aplicação deste comando gera uma nova população: núcleos selecionados.

Neste exemplo, a área do núcleo definida para linhagem T98G é $>40 \mu\text{m}$ e $\leq 1500 \mu\text{m}$; e a circularidade $\geq 0,3$.

O nome dado à população final de núcleos selecionada por área e circularidade foi "Nuclei Selected".

Estes passos são os mesmos independente do experimento, seja para autofagia ou morte celular.

14. Após os passos já explicados acima, selecionar *Calculate Intensity Properties* (Figura 9).

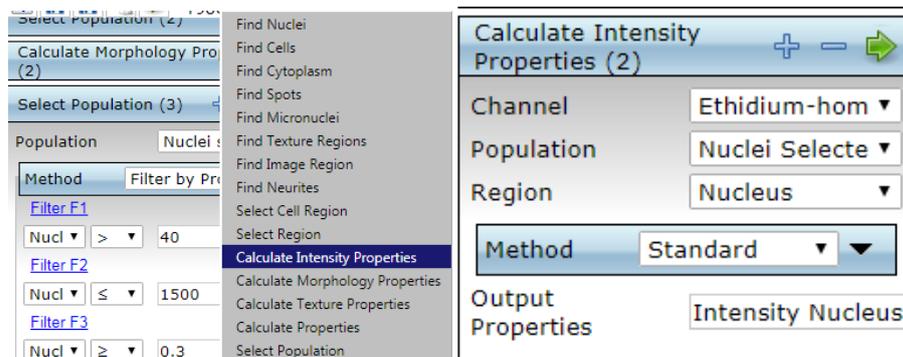


Figura 9: Passo 5 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* para o homodímero de etídeo. Este comando é aplicado no canal do homodímero de etídeo, população de núcleos selecionados na região do núcleo.

Calcular intensidade no canal do homodímero de etídeo, na população Nuclei Selected na região do núcleo.

15. Selecionar o algoritmo *Find Cytoplasm* (Figura 10).

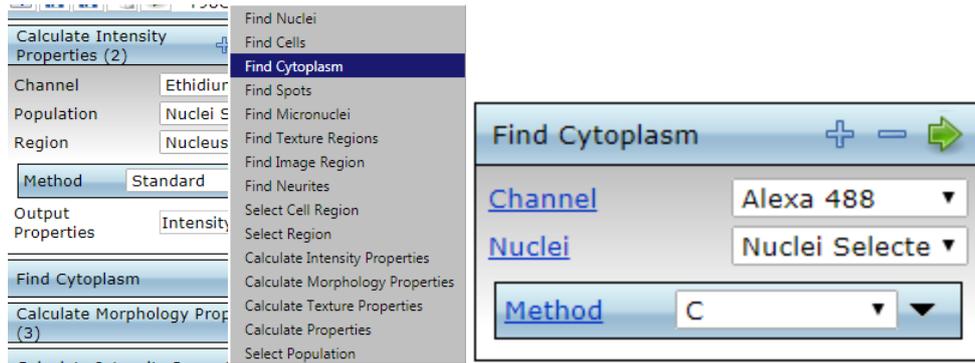


Figura 10: Análise do citoplasma das células T98G pelo software Columbus. Passo 6 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Cytoplasm* no canal do Alexa 488 (calceína) na população de núcleos selecionados. O método escolhido que melhor delimitou o citoplasma foi o C.

Neste exemplo, o citoplasma foi identificado através do canal Alexa 488 usado para detecção de fluorescência da marcação com calceína.

Estabelecer o método de delimitação de citoplasma a cada protocolo, ainda que se utilize a mesma linhagem. No exemplo da Figura 10, o método de escolha foi o C. É necessário analisar vários poços para concluir qual método está definindo melhor o citoplasma das células.

16. Clicar em *Calculate Morphology Properties* (Figura 11).

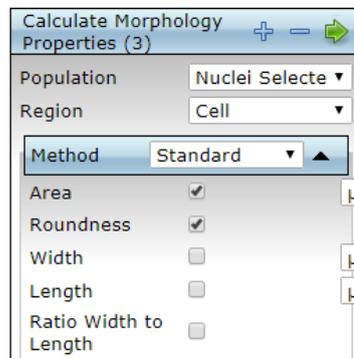


Figura 11: Passo 7 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população de núcleos selecionados na região da célula. Os métodos escolhidos para seleção da célula foram área e circularidade.

Aplicar novamente esse algoritmo novamente, porém agora na região da célula (a qual só é obtida após a definição do citoplasma) da população Nuclei Selected.

Selecionar os parâmetros de área e circularidade. Estas propriedades são úteis para novamente poder delimitar o que de fato são células e o que são artefatos de imageamento, que serão excluídos se estiverem muito fora dos padrões de área e circularidade obtidos.

17. Selecionar *Calculate Intensity Properties* (Figura 12).

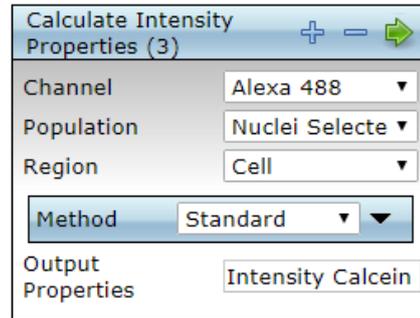


Figura 12: Passo 8 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* para a calceína. Este comando é aplicado no canal do Alexa 488 na população de núcleos selecionados na região da célula.

Algoritmo aplicado para calcular a intensidade de fluorescência no canal Alexa 488 (calceína) na região da célula na população Nuclei Selected.

18. Selecionar *Select Population* para identificar a população de células vivas (Figura 13).

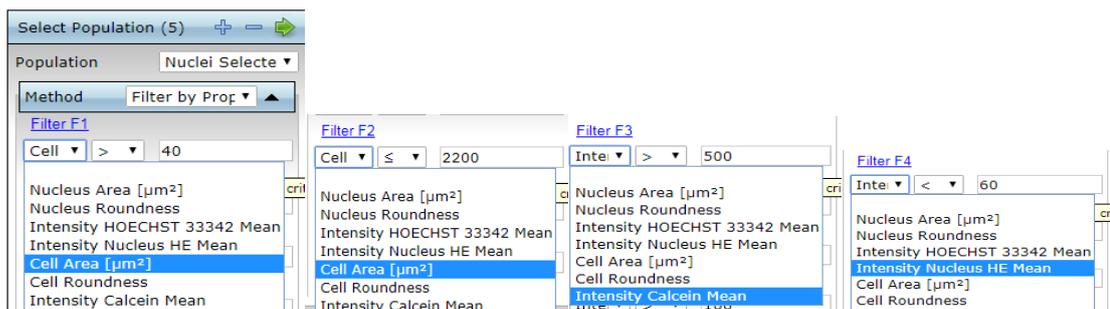


Figura 13: Análise da população de células T98G vivas pelo software *Columbus*. (A) Passo 9 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos selecionados. Os filtros escolhidos para a seleção de células vivas foram área da célula $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 2.200 \mu\text{m}^2$, intensidade média da calceína $> 500 \text{ nm}$ e intensidade média do homodímero de etídeo $< 60 \text{ nm}$.

Células T98G vivas foram definidas como tendo área celular $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 2200 \mu\text{m}^2$, intensidade de calceína $> 500 \text{ nm}$ e intensidade de homodímero no núcleo $< 60 \text{ nm}$. Estes números são baseados nos valores obtidos pelo algoritmo "Calculate morphology properties", que determina a área e intensidade de todas as células, de modo que o avaliador pode delimitar os valores mínimos e máximos para uma célula ser considerada viva. Por exemplo, é esperado que a calceína penetre as membranas das células em atividade, e portanto sua fluorescência mínima nessa população já é detectada.. Por outro lado, o Homodímero de etídeo fluoresce em células mortas, logo seu sinal deve ser baixo.

Os valores de intensidade são variáveis a cada experimento. Células vivas são as verdes, detectadas com valor mínimo da intensidade de fluorescência da calceína e com baixíssima intensidade de fluorescência do homodímero no núcleo.

Os valores escolhidos para delimitar a área celular são fixos para linhagem T98G.

19. Selecionar *Select Population* para identificar a população de células mortas (Figura 14).

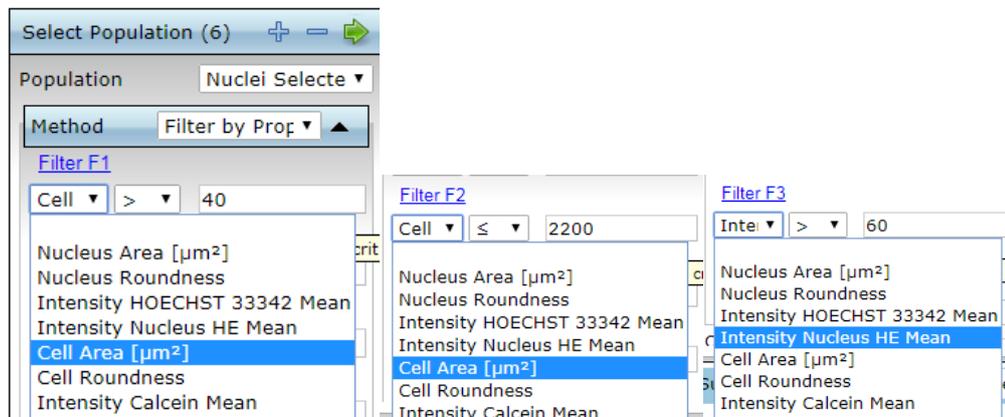


Figura 14: Análise da população de células T98G mortas pelo software *Columbus*. (A) Passo 10 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Select Population* na população de núcleos selecionados. Os filtros escolhidos para a seleção de células vivas foram área da célula $> 40 \mu\text{m}^2$ e $\leq 2.200 \mu\text{m}^2$, e intensidade média do homodímero de etídeo $> 60 \text{ nm}$.

Células T98G mortas foram definidas como tendo área celular > 40 e ≤ 2200 e intensidade de homodímero no núcleo > 60 , ou seja, não há sobreposição com a população de células vivas.

Avaliação de autofagia

20. Após repetir os passos das figuras 3, 5, 6 e 8 clicar no *Find Cytoplasm* (Figura 15 A).

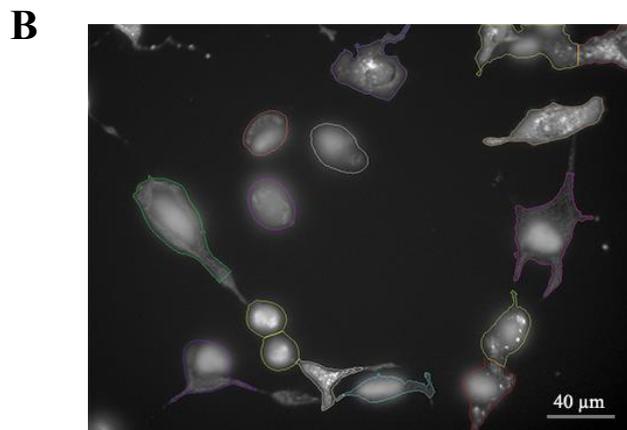
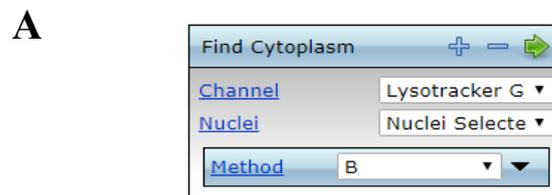


Figura 15: Análise do citoplasma das células T98G pelo software *Columbus*. (A) Passo 5 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Cytoplasm* no canal do Alexa 488 (*lysotracker green*) na população de núcleos selecionados. O método escolhido que melhor delimitou o citoplasma foi o B. (B) Fotomicrografia da análise do citoplasma identificado com laranja de acridina através da fluorescência verde e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Cytoplasm*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Ao usar a sonda laranja de acridina, sua fluorescência verde marca o núcleo e o citoplasma das células e a fluorescência vermelha marca as vesículas ácidas. Dessa forma, para encontrar o citoplasma na população *Nuclei Selected*, utilizar o canal da fluorescência verde (*Lysotracker green*).

Ao usar a sonda *lysotracker green*, o citoplasma da população *Nuclei Selected* é identificado através do canal *lysotracker green* novamente.

O método B foi o que melhor identificou o citoplasma nesse experimento de autofagia, porém isso pode variar entre experimentos.

21. Selecionar a opção *Calculate Morphology Properties* (Figura 16).

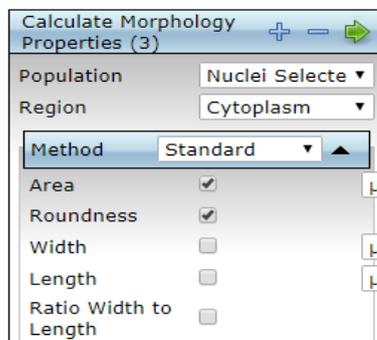


Figura 16: Passo 6 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Morphology Properties*. Este comando é aplicado na população de núcleos selecionados na região do citoplasma. Os métodos escolhidos para seleção do núcleo foram área e circularidade.

Os parâmetros área e circularidade foram selecionados para delimitar a região do citoplasma da população *Nuclei Selected*. Estas propriedades são úteis para novamente poder delimitar o que de fato são células e o que são artefatos de imageamento, que serão excluídos se estiverem muito fora dos padrões de área e circularidade obtidos.

22. Selecionar *Calculate Intensity Properties* para calcular a intensidade de fluorescência do canal *Lysotracker Green* (Figura 17).

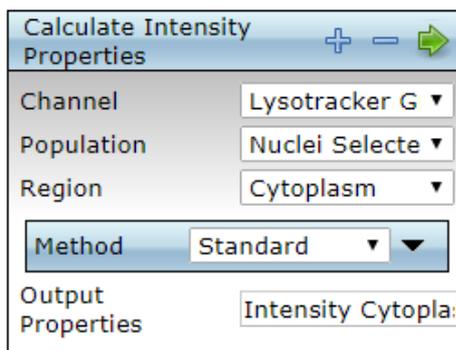


Figura 17: Passo 7 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* no canal de fluorescência verde do laranja de acridina. Este comando é aplicado no canal do Alexa 488 na população de núcleos selecionados na região do citoplasma.

A intensidade de fluorescência foi calculada no canal do lysotracker green, na região do citoplasma da população Nuclei Selected.

23. Selecionar *Calculate Intensity Properties* para calcular a intensidade de fluorescência do canal *Acridin Orange*, relativo à fluorescência no vermelho (Figura 18).

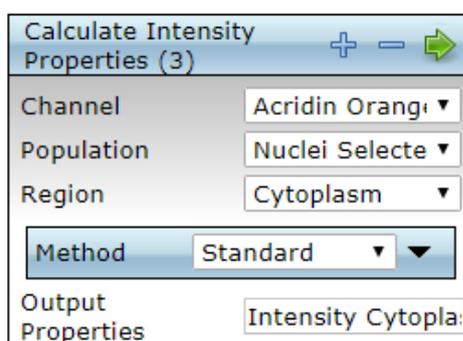


Figura 18: Passo 8 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Calculate Intensity Properties* no canal de fluorescência vermelha do laranja de acridina. Este comando é aplicado no canal do laranja de acridina na população de núcleos selecionados na região do citoplasma.

Este passo só deverá ser feito quando se usa o laranja de acridina. A intensidade da fluorescência do vermelho dev ser calculada no canal do laranja de acridina, na região do citoplasma da população Nuclei Selected.

24. Selecionar *Find Spots* (Figura 19).

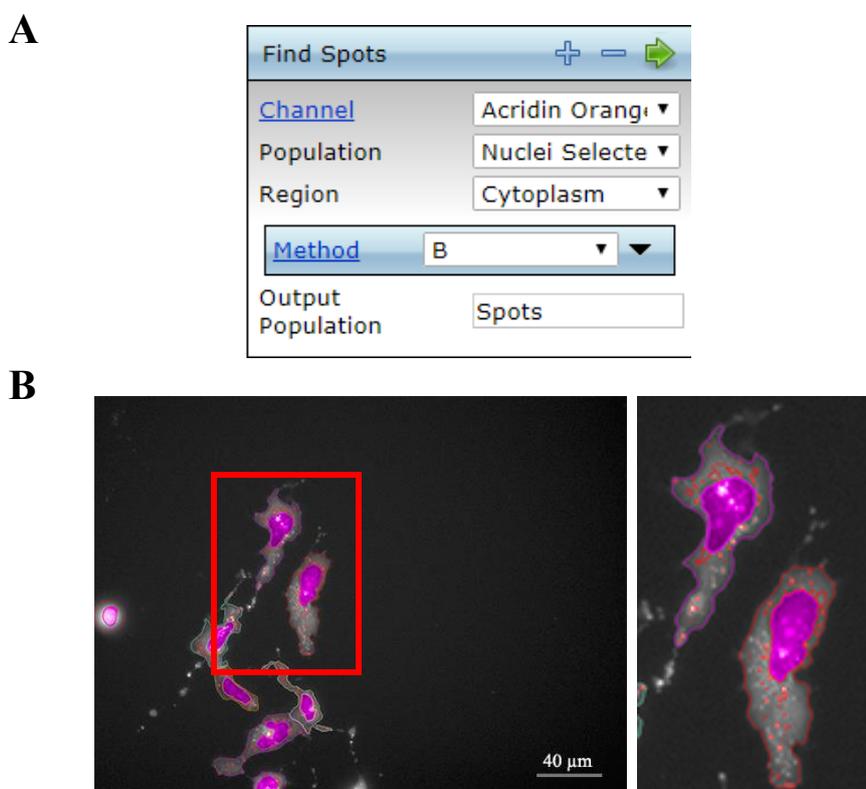


Figura 19: Análise dos spots das células T98G pelo software Columbus. (A) Passo 9 do programa de análise a ser executado: seleção do algoritmo *Find Spots* no canal do laranja de acridina na população de núcleos selecionados na região do citoplasma. O método escolhido que melhor delimitou os *spots* foi o B. (B) Fotomicrografia da análise dos *spots* identificados com laranja de acridina através da fluorescência vermelha e encontrados pelo algoritmo de análise *Find Spots*. Foto tirada no *Operetta* com objetiva de 40x.

Dentre os métodos disponíveis, o B foi o que melhor identificou os spots nesse experimento. Porém, essa escolha é variável e cada método deve ser testado.

Ao usar o corante laranja de acridina, os spots são identificados pelo canal de fluorescência vermelha (laranja de acridina), como mostra a figura 19, na região do citoplasma da população Nuclei Selected.

Ao usar o lysotracker green, os spots são identificados pelo canal de fluorescência verde (lysotracker green), na região do citoplasma da população Nuclei Selected.

Processamento da análise e obtenção dos resultados

Ao final da seleção do *pipeline* de análise é necessário realizar a análise para o experimento de interesse.

25. Clicar em *Define results* e selecionar os resultados que se deseja obter: número de células, número de células vivas e mortas, média da intensidade de fluorescência nos canais *etc.*

26. Clicar em *Run Analysis* para conferir o *pipeline*

Caso o software aponte algum problema no pipeline de análise nesta hora, é necessário voltar à etapa que não está correta e refazê-la.

27. Se o *pipeline* estiver correto, clicar em *Save analysis to database*.
28. Para rodar a análise, clicar em *Batch analysis*. Selecionar a pasta que contém o experimento de interesse e o *pipeline* a ser utilizado, que foi anteriormente salvo.
29. Clicar em *Start Analysis*.
30. Após o final da análise, clicar em *Secondary analysis* e selecionar a pasta em que o experimento foi salvo.
31. Selecionar o experimento que foi analisado.
32. Selecionar o *Assay Layout*, clicar em *View Results* e selecionar a análise que foi rodada.
33. Clicar em *Download*, em *well results* e selecionar *Download all* para obter as tabelas de resultados em formato *txt*.
34. Ir em *Export* e selecionar *Connect file* para exportar os resultados.
35. Clicar na pasta com a data do dia em que foi rodada a análise e selecionar a pasta em que se deseja salvar.

ANEXO II

Tabela 1: Estimativa dos gastos gerados para realização de um rastreamento em larga escala para avaliação de morte celular.

Produtos e Reagentes	Catálogo	Valor unitário do estoque	Quantidade do estoque	Valor por placa	Quantidade de material gasto por placa	Fabricante
Placa 96 poços μ GreinerClear	655090	R\$ 2.258,00	32 unidades	R\$ 70,57	1 unidade	Greiner bio-one (Sigma-Aldrich)
Kit <i>LIVE/DEAD Cell</i>	L3224	R\$ 1.956,50	80 μ L (Calceína) 400 μ L (Homodímero de etídeo)	R\$ 45,23	1,5 μ L (Calceína) 9,6 μ L (Homodímero de etídeo)	Thermo Fisher
Hoescht 33342	H3570	R\$ 417,00	10 mL	R\$ 0,042	1 μ L	Thermo Fisher
Meio DMEM F12	10565018	R\$ 195,03	500 mL	R\$ 49,22	19,2 mL	Thermo Fisher
<i>Tyrode</i>	T2397	R\$ 434,00	500 mL	R\$ 33,33	38,4 mL	Sigma-Aldrich

A terceira coluna da tabela mostra o valor unitário do estoque dos produtos e reagentes utilizados e na sexta coluna encontra-se os valores gastos por placa de 96 poços para avaliação de morte celular da linhagem T98G através de um rastreamento em uma plataforma HCS.