Rastreamento *in vitro* de célula única de glioblastoma por meio de abordagem holística atrelada à patologia digital

Matheus Correia Casotti[1]; Aléxia Stefani Siqueira Zetum[1]; Camilly Victória Campanharo[1]; João Augusto Diniz Moura[1]; Karen Ruth Michio Barbosa[1]; Lorena Souza Rittberg Mauricio[1]; Iúri Drumond Louro[1]; Débora Dummer Meira[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo

Palavras-chave: Patologia Digital. Rastreamento de Célula Única. Variação de Ploidia. Glioblastoma. Resistência Tumoral.

Genética

INTRODUÇÃO

A morfologia nuclear anormal, conhecida como atipia nuclear, é crucial na diferenciação entre tumores malignos e benignos. Dentre as morfologias incomuns, destacam-se as células cancerígenas poliploides gigantes (PGCCs), reconhecidas como senescentes e inviáveis [1]. Todavia, as PGCCs apresentam um ciclo de vida próprio, incluindo a fase de senescência, reorganização genômica e características particulares que direcionam a piora da progressão tumoral [1,2].

Quando se avalia o glioblastoma, um dos tumores mais devastadores e comuns, estudos com linhagens celulares submetidas à radioterapia destacaram o impacto das PGCCs/MGCCs (células cancerígenas multinucleadas gigantes, MGCCs) de ciclo lento na resposta à irradiação terapêutica, porém ainda pouco se sabe quanto à ação de quimioterápicos [3].

A complexidade das PGCCs evidenciou a necessidade de novas tecnologias de alta resolução e holísticas, salientando a utilização potencial de rastreamento de célula única sobre a avaliação sistemática das respostas celulares aos estresses e mudanças de destinos celulares, elucidando a descoberta de novas abordagens terapêuticas adaptativas à evolução tumoral [2,4,5,6].

Ademais, a inclusão de novas técnicas baseadas em patologia digital e análise de imagens fornecem análises mais precisa, reprodutibilidade e padronização de critérios de estudo das PGCCs baseados na patologia. Essas abordagens possibilitam a identificação, extração e quantificação detalhada de características das subpopulações, superando as limitações da avaliação manual [7,8].

Com base nisso, objetivou-se utilizar uma abordagem inovadora, integrada e de célula única, por meio de patologia digital e rastreamento *in vitro*, assim como, caracterizar e sugerir a potencial importância da variação de ploidia do glioblastoma sob os mecanismos de resistência tumoral, prevendo alvos capazes de domar o tumor por meio de terapias adaptativas frente às estratégias terapêuticas vigentes.

METODOLOGIA

Realizaram-se análises holísticas *in silico* das interações moleculares, utilizando os sites e softwares *UNIPROT*, *STRING* e *Cytoscape* para construção, análise e interpretação funcional das redes de interação proteica relacionada à poliploidização e formação do glioblastoma. Em paralelo, desenvolveu-se um acompanhamento/rastreamento *in vitro* da linhagem celular U87 de glioblastoma tratada com temozolamida (TMZ) e marcada por

fluorescência com 53BP1 e LC3 visando acompanhar mudanças morfológicas ao decorrer de 30 dias pós-tratamento com TMZ. Assim, foram avaliadas as mudanças morfológicas a nível nuclear e citoplasmático e foram observadas e descritas as células quanto a presença de multinucleações, micronucleações e núcleos gigantes, e seus significados quanto às respostas aos estresses sofridos pelas células tumorais. Ainda, analisaram-se as características morfológicas que representam células cancerígenas poliploides gigantes (PGCCs) pelo *ImageJ*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram construídas redes de interação proteica referente às proteínas atreladas ao processo de poliploidização (NANOG, SOX2, PROM1, MYC, CCNB1, AURKA, AURKB, ASAH1, PRKCI, MOS, TERT, CDKN1A, VIM e GJA3) e formação do glioblastoma (EGFR, TERT, PTEN, MDM2, RAS, PI3K, P53, RB, FGFR3, TACC, WNT, FAT1, CDK4, CDK6, PDGFRA, MET, NF1, CDKN2A). Quanto ao aspecto funcional, foram considerados os bancos de dados do *Reactome Pathways*, *KEGG Pathways*, GO *Biological Process*, GO *Cellular Component* e GO *Molecular Function*.

O enriquecimento funcional apresentou um FDR<10^{-18} (estatisticamente significante), correlações com ciclo celular e sua regulação e a importância das ciclinas e as quinases quando se avaliaram as proteínas críticas à poliploidização. Para o glioblastoma, identificou-se vias no câncer e doenças e processos regulatórios de atividades enzimáticas e complexos proteicos. Por comparação, observam-se as respostas ao estresse capazes de mudar morfologias e proteínas se alinhando com atipias nucleares, sendo um resgate de diversas múltiplas redes biológicas, visando à sobrevivência celular [9].

Suprindo validações pelo estudo *in vitro* de *live cell* acoplado aos *softwares* de análise de imagens, foram caracterizados 8 campos microscópicos (4 na periferia e 4 no interior da placa de cultura), durante os dias 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30. E os registros com marcação de fluorescência para região nuclear pelo 53BP1, destacou o reparo de dupla-fita do DNA [DSB] por meio de NHEJ (união de extremidade não-homóloga) associado ao *checkpoint* conservado contendo superfícies de interação para numerosas proteínas responsivas ao DSB. Ademais, o marcador LC3 para a região citoplasmática, possibilitou monitorar o processo de autofagia.

Com base nisso, sugere-se que a resposta a danos no DNA (DDR) é ativada como estratégia de sobrevivência, sendo perpassada por catástrofe mitótica ou poliploidização, as quais acabam sendo selecionadas diante da extensão do dano marcado pelo 53BP1 [10]. Em consonância, as atipias nucleares, também demonstram a capacidade de moldar o destino celular segundo rearranjos genômicos e heterogeneidade tumoral [11].

Outrossim, a multinucleação parece estar atrelada a um bloqueio da proliferação, apresentando mais corpos nucleares corados com 53BP1 [11]. Para além, essa ploidia variada remonta a uma possibilidade de plasticidade regulatória e fenotípica relacionada a traços de *stemness*, desdiferenciação, unicelularidade, metabolismo energético flexível e proteção eficaz contra a instabilidade do genoma, isto pelo tamponamento de danos no DNA, efeitos de mutação e reparo complexo do DNA integrando via de reparo unicelular primitiva propensa a erro e via avançada de reparo multicelular [2,12]. Isto pela indução de genes bivalentes, caos genômico, epigenômico e quântico, e novos estados adaptativos de programas celulares através da religação da rede reguladora de genes [2,6,13,14].

A presença do marcador LC3, indica um acúmulo de autofagossomos, o que está atrelado ao impacto da autofagia sobre a resposta ao estresse e tumorigênese, o que na literatura destaca que a deficiência em autofagia exibe correlações robustas com frequências mais altas de proliferação de células semelhantes a poliploides, sugerindo que a perda de

autofagia pode promover instabilidade genômica [15]. Outrossim, LC3 também media os processos de macro ou micronucleofagia os quais eliminam estruturas nucleares desnecessárias e previnem a senescência celular, por consequência, há um benefício claro sobre a heterogenicidade do conteúdo genômico tanto pela poliploidização quanto pela reversão da poliploidia [16].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, a poliploidia parece mitigar as consequências da instabilidade do DNA através de DDR, isto porque genomas adicionais protegem os danos ao DNA, mas sujeito a erros, sendo uma característica dos organismos unicelulares. Além disso, a marcação por LC3 salienta a conexão com o papel da autofagia. Ademais, tais considerações concordam com o enriquecimento funcional apresentado previamente pelas análises de redes de interação proteína-proteína, integrando/correlacionando os dados *in silico* e *in vitro*. Assim, sugere-se que análises holísticas com *softwares* e baseadas em patologia digital e rastreamento de célula única fornecem novos caminhos da pesquisa oncológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 LIU, J.; ERENPREISA, J.; SIKORA, E. Polyploid giant cancer cells: An emerging new field of cancer biology. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2022. p. 1-4.

2 ERENPREISA, J.; *et al*. Paradoxes of cancer: Survival at the brink. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2022. p. 119-131.

3 ALHADDAD, L.; *et al*. Polyploid/Multinucleated giant and slow-cycling cancer cell enrichment in response to X-ray irradiation of human glioblastoma multiforme cells differing in radioresistance and TP53/PTEN status. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1228, 2023.

4 HILSENBECK, O.; *et al*. Software tools for single-cell tracking and quantification of cellular and molecular properties. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 703-706, 2016.

5 GROSS, S.M.; *et al*. Single cell tracing reveals heterogeneous drug-, dose-, and time-dependent effects on cancer cell fates. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 2020.

6 MIRZAYANS, R.; MURRAY, D. Intratumor Heterogeneity and Treatment Resistance of Solid Tumors with a Focus on Polyploid/Senescent Giant Cancer Cells (PGCCs). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11534, 2023.

7 PELL, R.; *et al*. The use of digital pathology and image analysis in clinical trials. **The Journal of Pathology: Clinical Research**, v. 5, n. 2, p. 81-90, 2019.

8 SAINI, G.; *et al*. Polyploid giant cancer cell characterization: New frontiers in predicting response to chemotherapy in breast cancer. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2022. p. 220-231.

9 FULDA, S.; *et al*. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010.

10 KIM, C.J.; *et al*. Nuclear morphology predicts cell survival to cisplatin chemotherapy. **Neoplasia**, v. 42, p. 100906, 2023.

11 HART, M.; ADAMS, S. D.; DRAVIAM, V.M. Multinucleation associated DNA damage blocks proliferation in p53-compromised cells. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 451, 2021.

12 ANATSKAYA, O.V.; VINOGRADOV, A.E. Polyploidy and myc proto-oncogenes promote stress adaptation via epigenetic plasticity and gene regulatory network rewiring. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9691, 2022.

13 NICULESCU, Vladimir F. Cancer genes and cancer stem cells in tumorigenesis: Evolutionary deep homology and controversies. **Genes & Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1234-1247, 2022.

14 NICULESCU, Vladimir F. The evolutionary cancer genome theory and its reasoning. **Genetics in Medicine Open**, p. 100809, 2023.

15 DEBNATH, Jayanta; GAMMOH, Noor; RYAN, Kevin M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1-16, 2023.

16 WU, Chen-Shiou *et al*. From polyploidy to polyploidy reversal: Its role in normal and disease states. **Trends in Genetics**, 2022.