

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

Crepin Aziz Jose Oluwafoumi Agani

**ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO  
RESISTENTE AO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA**

Porto Alegre

2018

Crepin Aziz Jose Oluwafoumi Agani

**ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO  
RESISTENTE AO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA**

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

Orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira  
Co-orientadora: B.Sc. Chairini Cássia Thomé

Porto Alegre

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Agani, Crepin Aziz Jose Oluwafoumi  
Estabelecimento de linhagem de glioblastoma humano  
resistente ao quimioterápico temozolomida / Crepin  
Aziz Jose Oluwafoumi Agani. -- 2018.  
53 f.  
Orientador: Diogo Lorch de Oliveira.

Coorientador: Chairini Cássia Thomé.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Glioblastoma (GMB). 2. Resistência. 3.  
Temozolomida (Tmz). I. Oliveira, Diogo Lorch de,  
orient. II. Thomé, Chairini Cássia, coorient. III.  
Título.

Crepin Aziz Jose Oluwafoumi Agani

**ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA HUMANO  
RESISTENTE AO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA**

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

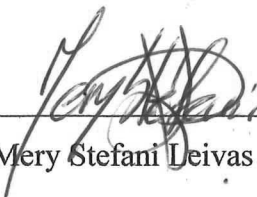
Aprovado em: 20 de Dezembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Fabrício Figueiró (UFRGS)



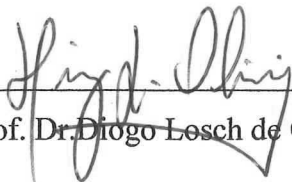
---

Dra. Mery Stefani Leivas Pereira (UFRGS)



---

B.Sc. Chairini Cássia Thomé (UFRGS)



---

Prof. Dr. Diogo Lesch de Oliveira (UFRGS)

## AGRADECIMENTO

A realização de um projeto requer tanto conhecimento teórico como prático, e é uma oportunidade interessante para aprender a gerenciar um trabalho.

A organização revela-se um fator determinante para o bom andamento do projeto e para as conquistas das várias fases que o constituem.

Gostaria de agradecer a Deus por tudo que tem feito por mim.

Expresso meus sinceros agradecimentos ao Diogo Losch, por ter dado essa oportunidade e pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Chairini Cassia Thomé, por seus conselhos, sua ajuda que tem dado à realização deste trabalho, estou muito honrado pelo interesse demonstrado neste trabalho, obrigado!

Expresso minha profunda gratidão a todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica, que participaram a minha formação, e suas dicas que enriqueceram meus conhecimentos ao longo dessa trajetória universitária.

Finalmente, estendo meus sinceros agradecimentos a todos, amigos e familiares que contribuíram

Perto ou longe, na realização desse trabalho

*“O Senhor é meu pastor, nada me faltará”*

Salmos 23: 1

## RESUMO

A reincidência tumoral está geralmente associada a resistência ao tratamento quimioterápico, onde estão envolvidas respostas adaptativas, alterações genéticas surgidas durante o tratamento, aumento da expressão do alvo terapêutico, ativação de vias alternativas de sinalização e vários outros mecanismos ainda desconhecidos. Linhagens de células tumorais resistentes são desenvolvidas *in vitro* para investigar e entender os potenciais mecanismos de reincidência tumoral. Entretanto, a grande maioria desses modelos não se assemelham as condições clínicas durante a quimioterapia. O presente estudo visa estabelecer um protocolo experimental de resistência tumoral ao Temozolomida (TMZ), onde linhagem de célula glioblastoma U87-MG foram exposta um regime de tratamento similar ao regime clínico padrão com TMZ, na tentativa de obter um modelo *in vitro* de quimio-resistência clinicamente relevante. As células foram expostas ao TMZ em duas fases. Na primeira fase as células foram cultivadas com 18 $\mu$ M de TMZ cada 48h por um período de 22 dias, seguido de 4 semanas sem exposição ao fármaco. Já na segunda fase do tratamento, as células foram expostas diariamente a 25  $\mu$ M de TMZ durante 5 dias, seguido de 4 semanas sem exposição ao TMZ. As células controles seguiram o mesmo regime de exposição, mas foram cultivadas com DMSO 0,5%. A resistência das células foi testada tratando-as com concentrações crescentes de TMZ por 72h. A quantidade de células após tratamento foi mensurada através do ensaio do SRB. Comparando as células cultivadas com TMZ e DMSO, observamos que não há diferenças significativas no nível de resistência das células ao quimioterápico. Porém diferenças morfológicas, assim como presenças de vesículas extracelulares, foram observadas nas células previamente expostas ao TMZ, o que sugere provável resposta adaptativa das células ao quimioterápico.

Palavras-chave: Glioblastoma; Resistência; Temozolomida; Célula resistente; Câncer.

## ABSTRACT

Tumor recurrence is usually associated with resistance to chemotherapy and probably caused by adaptative responses, genetic alterations developed during treatment, increase in the expression of therapeutic targets, activation of alternative signaling pathways and other unknown mechanisms. Chemoresistant cell lineages are developed *in vitro* as models to investigate and understand the potential mechanisms behind tumor recurrence. However, the majority of these models do not resemble to conditions experienced by patients during chemotherapy. The goal of this work is to develop an *in vitro* protocol of clinically relevant tumor resistance to Temozolomida (TMZ). The glioblastoma cell lineage U87-MG was exposed to a regime of treatment similar to the clinical standard regime with TMZ. Cells were exposed to TMZ in two phases. In the first phase, the cells were exposed to 18 $\mu$ M TMZ every 48h for 22 days, followed by 4 weeks without treatment. In the second phase, cells were daily exposed to 25  $\mu$ M TMZ during 5 days, followed by 4 weeks without treatment. Control cells followed the same protocol of exposition, but were cultivated with DMSO 0,5%. The chemoresistance were tested by treating the exposed cells with increasing concentrations of TMZ for 72h. With SRB assay, we measured the quantity of cells after treatment. Comparing the cells cultivated with TMZ and DMSO, we observed no significant differences in the TMZ-resistance level between the cells. However, we observed morphological changes and presence of extracellular vesicles in the cells previously exposed to TMZ, indicating an adaptative response of these cells to the drug.

Keywords: Glioblastoma (GBM). Resistance. Temozolomide (TMZ). Cell resistance. Cancer.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho experimental de exposição ao TMZ.....	29
Figura 2 – Regime de tratamento clínico para GBM.....	30
Figura 3 – Imagens fotográficas e comparativas das células.....	32
Figura 4 – Teste da resistência ao TMZ: 1ª fase.....	33
Figura 5 – Teste da resistência ao TMZ; 2ª fase.....	34
Figura 6 – Resposta celular ao Tmz.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características morfofisiológicas das células da linhagem u87-mg submetidas ao protocolo de exposição ao DMSO ou TMZ.....	31
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGT	Alquilguanina-DNA alquiltransferase
ATP	Adenosina-Trifosfato
ATRX	Helicase dependente de ATP
CDKN2A / B	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A e B
DMSO	Dimetilsulfóxido
GBM	Glioblastoma
IDH	Isocitrato desidrogenase
INCA	Instituto Nacional De Câncer
MGMT	O <sup>6</sup> -methylguanine DNA methyltransferase
MMR	Mismatch repair
NF1	Neurofibromina 1
O <sup>6</sup> -MeG	O <sup>6</sup> -metilguanina
PARP	Poli (ADP) -ribose polimerase
PDGFRA	Receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas Alfa
PTEN	Fosftase Tensina
RB1	Proteína do retinoblastoma 1
SFB	O Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
TERT	Telomerase reversa promotor de transcriptase
TMZ	Temozolomida
VEs	Vesículas Extracelulares

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
1.1 DEFINIÇÃO E HISTOPATOLOGIA DO GLIOBLASTOMA .....	7
1.2 TRATAMENTO GLIOBLASTOMA .....	8
<b>1.2.1 Farmacocinética do TMZ em paciente com GBM .....</b>	<b>9</b>
1.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AO TMZ .....	10
1.4 JUSTIFICATIVA .....	12
1.5 OBJETIVOS .....	13
<b>1.5.1 Objetivo geral.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>14</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	17
2.2 MATERIAS E METODOS .....	19
<b>2.2.1 Reagentes.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2 Cultura celular.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.3 Desenvolvimento da linhagem resistente e confirmação da resistência .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.4 Teste da viabilidade celular .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.5 Análise estatística.....</b>	<b>21</b>
2.3 RESULTADOS .....	22
<b>2.3.1 Características morfológicas das células expostas ao TMZ ou DMSO .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 Teste da resistência celular ao quimioterápico .....</b>	<b>22</b>
2.4 DISCUSSÃO .....	24
<b>REFERÊNCIAS DO ARTIGO .....</b>	<b>26</b>
<b>3 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA X.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DEFINIÇÃO E HISTOPATOLOGIA DO GLIOBLASTOMA

O câncer do SNC segundo o Instituto Nacional De Câncer (INCA), representa entre 1,4 a 1,8% de todos tumores malignos no mundo e cerca de 88% dos tumores de SNC são no cérebro. Aproximadamente 176.000 casos de câncer do sistema nervoso central (SNC) são diagnosticados por ano em todo o mundo, com uma estimativa de mortalidade anual de 128.000 (Lanzetta e Minniti, 2010). O Glioblastoma (GBM) é um tipo de câncer altamente agressivo, que apresenta um rápido crescimento infiltrativo. Histologicamente, o GBM é composto de células pleomórficas com alta atividade mitótica, microtrombos intravasculares, necrose com ou sem pseudopaliçada celular e/ou proliferação microvascular. (Olar e Aldape, 2013). A incidência global do GBM é de menos de 10 por 100.000 pessoas (Thakkar et al., 2014). De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde de 2016 para tumores do sistema nervoso central, o GBM pode ser classificado em 3 grupos com base no status do isocitrato desidrogenase (IDH). O tipo mais comum é o GBM com IDH do tipo selvagem, encontrado em cerca de 95% dos pacientes e que corresponde praticamente ao chamado GBM primário (OHGAKI; KLEIHUES, 2012). O risco de desenvolver um GBM aumenta com a idade, com uma taxa de incidência entre os idosos de 17,5 por 100.000 pessoas o ano, e um risco relativo é de 3-4 vezes em comparação com outras faixas etária (Iacob e Dinca, 2009). Segundo Arevalo et. al. (2017), o GBM primário ocorre geralmente em pacientes de mais 55 anos e possui com alterações genéticas que incluem mutações do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), TP53, homólogo de fosfatase e tensina (PTEN), receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGFRA), neurofibromina 1 (NF1), inibidor de quinase dependente de ciclina 2A e B (CDKN2A / B) genes, e na telomerase reversa promotor de transcriptase (TERT). O segundo tipo é o GBM com IDH-mutante (cerca de 10% dos casos), conhecido como GBM secundário na maioria dos casos, possui uma história prévia de glioma difuso de grau II ou III e surge geralmente em pacientes mais jovens (OHGAKI; KLEIHUES, 2012). Seu local de origem mais comum é no lobo frontal (ELLINGSON et al., 2012) e algumas mutações associadas são: Helicase dependente de ATP (ATRX), TP53 e proteína do retinoblastoma 1 (RB1) (AREVALO et al.,

2017). A terceira classificação corresponde ao GBM NOS, que trata-se do tumor cujo o status do IDH não pode ser determinado.

## 1.2 TRATAMENTO DO GLIOBLASTOMA

O tratamento padrão do GBM consiste na ressecção cirúrgica do tumor, seguido de radioterapia e quimioterapia (WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016). A cirurgia é realizada para diminuir o máximo possível a massa tumoral e obter tecido para biopsia (OMURO; DEANGELIS, 2013). Em seguida, os pacientes são submetidos ao tratamento concomitante de radioterapia e quimioterapia, que varia dependendo da idade dos pacientes e marcadores moleculares expressos.

O quimioterápico de primeira escolha é o Temozolomida (TMZ), um agente alquilante do DNA. Em ensaio clínico realizado por Stupp et. al. (2005), constatou-se que o tratamento concomitante de radioterapia e quimioterapia com TMZ é capaz de elevar o tempo médio de sobrevivência dos pacientes de 12 para 15 meses, quando comparado com a radioterapia sozinha. Este ensaio clínico serviu como base para estabelecer o regime padrão de tratamento utilizado na clínica atualmente (Fig I).

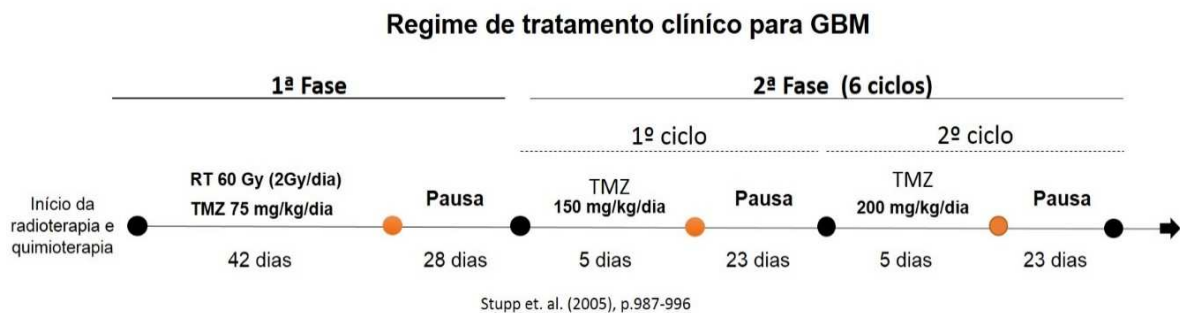


Figura I: figura representando o regime de tratamento clínico para GBM.

O regime padrão de tratamento é composto de duas fases, sendo que a segunda fase é subdividida em ciclos. Na primeira fase, os pacientes recebem a radioterapia, num total de 54-60 Gy fracionados em doses de 1,8 a 2 Gy. Concomitantemente, os pacientes recebem diariamente uma dose oral de 75mg/m<sup>2</sup> por dia de TMZ, desde o primeiro até o último dia da radioterapia. Uma pausa de quatro semanas segue o fim da primeira fase de tratamento. Na segunda fase, os

pacientes seguem o tratamento quimioterápico com TMZ, que é subdividido em até seis ciclos. Cada ciclo tem duração de 28 dias e inicia com a administração oral do TMZ diariamente durante 5 dias, seguido de uma pausa de 23 dias. A dose nessa fase, é de 150 mg/m<sup>2</sup> por dia para o primeiro ciclo e aumenta para 200 mg/m<sup>2</sup> por dia, nos ciclos seguintes, desde que não haja efeitos colaterais graves (WELLER et al., 2014) e respeitando a dose máxima tolerável de 1.000 mg/m<sup>2</sup> em ciclos de 28 dias.

### 1.2.1 Farmacocinética do TMZ em paciente com GBM

O TMZ é um pró-fármaco, que em pH fisiológico é espontaneamente ativada e desempenha a sua função de agente alquilante do DNA (Fig II) (RAMIREZ et al., 2013). Uma vez em contato com o com pH 7,4, o TMZ é hidrolisado em seu metabólito ativo, o MTIC. Esse metabólito é rapidamente convertido em duas moléculas: o AIC, um metabólito inativo, e o cátion metildiazônio, um íon altamente reativo responsável pela adição do grupo metil ao DNA. A citotoxicidade do TMZ está associada à metilação do DNA principalmente nas posições O<sup>6</sup> e N<sup>7</sup> da guanina (KOUKOURAKIS et al., 2009).

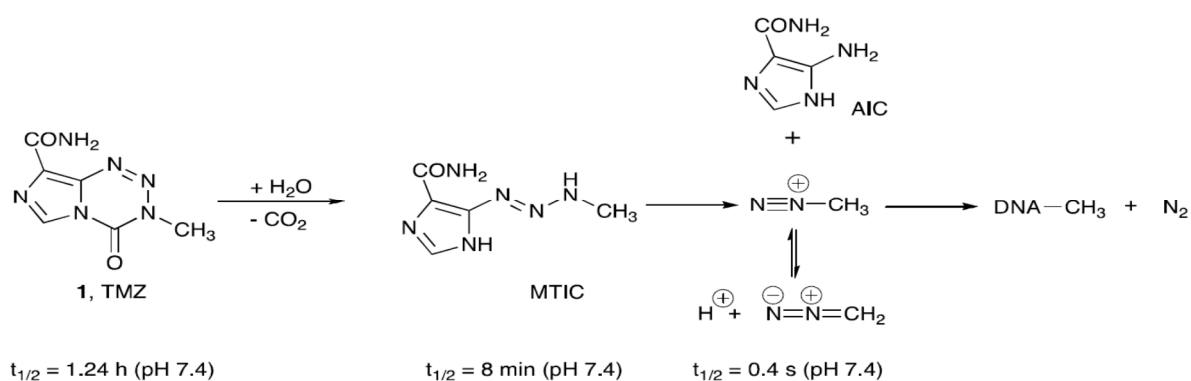


Figura II. Ativação da pró-droga TMZ em sua forma ativa (Adaptado de Ramirez et. al. 2013).

Quando administrado oralmente, o TMZ tem uma rápida absorção e biodisponibilidade de aproximadamente 100%. Estudos farmacocinéticos em humanos mostram que o TMZ atinge a concentração máxima no plasma 1 hora após administração oral, com um tempo de meia vida de aproximadamente 108 minutos. A concentração plasmática máxima de TMZ após ingestão oral das doses de 150 mg/m<sup>2</sup> e 200 mg/m<sup>2</sup> é de 7,75 e 10,7 mg/mL, respectivamente

(KOUKOURAKIS et al., 2009). Entretanto, somente 20% da concentração plasmática de TMZ consegue atravessar a barreira hematoencefálica e chegar ao tumor, o que limita eficiência do fármaco (OSTERMANN, 2004).

Dados pré-clínicos farmacocinéticos de pacientes com gliomas obtidos por Rosso et al. (2009) sugerem que, uma vez atravessada a barreira hematoencefálica, o TMZ penetra mais rápido no tecido tumoral do que no tecido normal, atingindo uma razão AUC tecido tumoral/AUC tecido normal de 1,47. Nesse estudo, os pacientes foram expostos a diferentes protocolos de dosagem (75-200 mg/m<sup>2</sup> por dia) de TMZ marcado na posição metil-<sup>11</sup>C ([*metil-<sup>11</sup>C*] TMZ) e submetidos a análise por PET-Scan, antes e após o regime de tratamento. As concentrações do TMZ nos tecidos cerebrais normal e tumoral foram calculadas considerando-se a disposição tecidual do [*metil-<sup>11</sup>C*] TMZ obtidas com as imagens de PET-Scan. Concentrações máximas de TMZ variaram de 2,9 a 6,7 µg/mL em tecido tumoral e, de 1,8 a 3,7 µg/mL em tecido cerebral normal, após os diferentes regimes de dosagem de tratamento (ROSSO et al., 2009).

### 1.3 MODELOS E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA AO TMZ

O desenvolvimento de linhagem tumoral resistente ao quimioterápico, é uma abordagem que apresenta metodologia de elaboração bastante diversificada. De acordo com (MCDERMOTT et al., 2014), não há um caminho certo para estabelecer linhagem celular resistente à droga. Estudos comparativo realizados por (LEE, 2016) evidenciaram vários modelos já existentes na literatura, onde foram usados regimes de exposição e diferentes concentrações de TMZ para indução de resistência ao quimioterápico, em diferentes linhagens de GBM. Entre outros modelos de indução de resistência estão: regime de exposição contínua onde linhagem celular do GBM foi exposta por exemplo a 100 µM de TMZ durante 2 semanas, para gerar uma variante resistente ao TMZ (UJIFUKU K ET AL., 2010) e regime de exposição pulsada, onde células foram exposta ao TMZ 100 µM por duas semanas, (com meio de TMZ trocado a cada 3 dias (Fan et al., 2014).

A resistência aos quimioterápicos pode ser dividida em duas grandes categorias: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca indica que as células se tornam naturalmente resistentes, devidos aos fatores mediadores da resistência das células tumorais. No caso da



resistência adquirida, as células tumorais que eram inicialmente sensíveis, tornam-se resistentes devido a mutações surgidas durante o tratamento. (HOLOHAN et al., 2013).

Os mecanismos de resistência ao TMZ estão associados a enzima Alquilguanina-DNA alquiltransferase (AGT), assim como a deficiência na via do reparo de pareamentos errados Mismatch repair (MMR) (DINCALCI et al., 1988). Expressa pelo gene MGMT, a AGT desempenha um papel primordial na resistência ao TMZ, removendo os grupos metil da posição O6 da guanina, revertendo o a lesão citotóxica do TMZ. Células desprovidas da atividade da AGT endógena conferem, portanto, um alto nível de resistência ao TMZ e a outros agentes de metilação (BOBOLA et al., 1996). O nível de metilação no promotor do MGMT também está relacionado á resistência das células ao TMZ, sendo considerado um biomarcador preditivo no tratamento de pacientes com GBM (WELLER et al., 2010). Quando o promotor do MGMT está desmetilado, há um aumento na expressão da enzima de reparo, comprometendo a eficácia do tratamento com TMZ.

De acordo com Jiapaer et al. (2018), o MMR é um sistema que corrige incompatibilidades do pareamento de bases de nucleotídeos gerados no processo de síntese de DNA. O tratamento com TMZ induz a formação de O6-metilguanina (O6-MeG), que parecia erroneamente com a timina durante a replicação do DNA. O sistema MMR reconhece a O6-MeG / T desemparelhado e remove a fita recém-sintetizado, deixando intacto o filamento de DNA parental com a base O6-MeG, o que leva à parada do ciclo celular e apoptose. A perda da função MMR está associada à resistência aos efeitos citotóxicos do TMZ, pois a ausência da enzima permite que o falso pareamento seja mantido no DNA das células.

Outro possível mecanismo de resistência ao TMZ é a via de reparo de excisão de base (BER). Estudos demonstraram que o tratamento de células tumorais com TMZ induziu um aumento na atividade da poli (ADP) -ribose polimerase (PARP), que se acredita estar envolvida na reparação da excisão de nucleotídeos [...] (KOUKOURAKIS et al., 2009)

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de linhagens tumorais resistentes a quimioterapia é uma abordagem metodológica estabelecida para investigar os mecanismos de citotoxicidade e resistência à agentes quimioterápicos. Os modelos propostos, que tentam mimetizar in vitro as condições que os pacientes experimentam durante o tratamento de tumores, levaram ao desenvolvimento de células resistentes a quimioterápicos. Porém, a instabilidade da resistência, o baixo nível de resistência e pequenas mudanças moleculares estão entre os problemas encontrados. Na literatura é possível encontrar diversos modelos de indução de resistência ao TMZ em diferentes linhagens de GBM. Entretanto, a grande maioria desses modelos possui alto nível de resistência, ou seja, o regime de exposição ao TMZ é muito intenso e não se assemelha ao regime clínico de tratamento de GBMs. Desenvolver modelos clinicamente relevantes, pode ser uma forma mais adequada de tentar mimetizar as condições que as células de GBM experimentam durante a quimioterapia, melhorando o entendimento sobre os mecanismos de resistência do tumor ao tratamento.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo geral

Estabelecer e padronizar uma linhagem celular de GBM humano resistente ao quimioterápico TMZ.

### 1.5.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo para obtenção de uma linhagem celular resistente ao quimioterápico TMZ, utilizando a linhagem de GBM humano U87-MG.
- Testar a resistência da linhagem após cada fase de exposição ao TMZ.
- Avaliar a estabilidade da resistência da linhagem após a exposição ao TMZ.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Carta de submissão no formato requerido para o periódico “Cancer Letters”

(<http://www.journals.elsevier.com/cancer-letters/>)

Agani, Crepin Aziz Jose O<sup>1</sup>, Thomé, Chairini Cássia<sup>2</sup>, de Oliveira, Diogo Losh.<sup>2</sup>

1 crepnjose@gmail.com

2 chairini.thome@gmail.com

3 losch@ufrgs.com.br.

## **PROCEDIMENTO METODOLÓGICO PARA OBTENÇÃO DE LINHAGEM CELULAR RESISTENTE AO QUIMIOTERÁPICO TEMOZOLOMIDA**

Agani, Crepin Aziz Jose O<sup>1\*</sup>, Thomé, Chairini Cássia<sup>1\*</sup>, de Oliveira, Diogo Losch<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neurociência Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

\* Endereço para correspondência:

Crepin Aziz Jose O. Agani

Departamento de Bioquímica, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600-anexo

Porto Alegre, RS, Brasil

CEP: 90035-003

E-mail: crepinjose@gmail.com

## RESUMO

A recorrência do tumor em paciente após o tratamento, constitui um grande problema de saúde e representa um grande desafio para a comunidade científica. Esta recorrência é geralmente associada à resistência à quimioterapia, onde respostas adaptativas, mutações surgidas durante o tratamento, aumento da expressão do alvo terapêutico, bem como ativação de vias de sinalização alternativas e vários outros mecanismos desconhecidos estão envolvidos. Linhagens celulares tumorais resistentes são desenvolvidas no laboratório para melhor investigar e compreender os potenciais mecanismos de recorrência do câncer, no entanto, a grande maioria destes modelos não se assemelham às condições que a experiência pacientes com câncer durante a quimioterapia. O presente estudo estabelece um protocolo experimental em que linhagem de célula GBM U87GM foi exposta ao regime clínico padrão de temozolomida (Tmz) na tentativa de obter um modelo de células tumorais quimiorresistentes e clinicamente relevantes. As células previamente expostas a uma concentração crescente de Tmz (18 e 25, respectivamente, durante 22 dias e 5 dias) foram comparadas com as células controles cultivadas em DMSO 0,5% e não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, diferenças morfológicas e presença de vesículas extracelulares foram observadas em células previamente expostas, sugerindo uma provável adaptação das células à Tmz neste estágio de exposição.

Palavras-chave: Glioblastoma (GBM). Resistência. Temozolomida (TMZ). Câncer.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é um dos tumores cerebrais malignos mais comum do Sistema Nervoso Central e apresenta alta taxa de reincidência em pacientes (WIRSCHING; GALANIS; WELLER, 2016). De acordo com o último relatório estatístico do Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS), a taxa de incidência ajustada por idade para o GBM é de 3,19 por 100.000. Essa incidência aumenta com a idade, sendo mais frequente entre 75 e 84 anos e mais comum em homens brancos (Olar e Aldape, 2013). Exceto a idade, o sexo e a genética, os fatores de risco para o desenvolvimento do GBM não são bem definidos (WELLER et AL., 2014). Segundo Westphal e Lamszus, (2011), a reincidência do GBM pode estar associada à resistência das células malignas ao quimioterápico. Essa resistência pode estar relacionada com a alta heterogeneidade desse tipo de tumor (PATEL et AL., 2014; VERHAAK et AL., 2010).

O tratamento clínico padrão do GBM consiste na remoção cirúrgica do tumor, seguido de radioterapia e quimioterapia, sendo o Temozolomida (TMZ) o quimioterápico mais utilizado (DEANGELIS, 2001). O tratamento quimioterápico é contínuo e se baseia no regime proposto por Stupp et.al. (2005). Nesse regime, o tratamento é dividido em duas fases. Na primeira fase, o paciente recebe uma dose oral de TMZ de  $75\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$ , por aproximadamente 42 dias, concomitante com o tratamento radioterápico, seguido de uma pausa de quatro semanas após o tratamento. Na segunda fase, o tratamento é dividido em seis ciclos de 28 dias. Cada ciclo tem 5 dias seguidos de administração oral de TMZ em concentrações crescentes –  $150\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  no primeiro ciclo e  $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$  nos demais ciclos – seguidos por uma pausa de 23 dias (STUPP et al., 2005). Esse regime de tratamento se mostrou eficaz em pacientes com GBM, pois foi capaz de elevar a sobrevida média dos pacientes de 12 a 15 meses (STUPP et al., 2005).

Quando administrado nos pacientes, o TMZ tem uma rápida absorção e alta biodisponibilidade, chegando a atingir a concentração máxima no plasma em até 1h (KOUKOURAKIS et al., 2009). Entretanto, somente 20% da concentração plasmática de TMZ consegue atravessar a barreira hematoencefálica e chegar até o tumor. Em estudo pré-clínico com pacientes com GBM utilizou PET-Scan e TMZ marcado na posição *metil-C*<sup>11</sup> para medir a farmacocinética e biodisponibilidade do TMZ no tecido cerebral e tumoral após a administração de diferentes doses do fármaco. Dados indicam que após o fim de cada fase regime padrão de administração do TMZ, com doses de 75 a  $200\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$ , a concentração do TMZ no tecido tumoral varia entre 2,9 a  $6,7\mu\text{g}/\text{mL}$  (ROSSO et al., 2009).

O TMZ é um agente alquilante que modifica o DNA adicionando grupamento metil nos sítios O<sup>6</sup> e N<sup>7</sup> da guanina, e N3 da adenina. Essas alterações induzem parada do ciclo celular em G2/M e, eventualmente, levam à apoptose (LEE, 2016). Entretanto, a presença de alguns mecanismos de resistência a drogas parece ser responsável pelo insucesso terapêutico do TMZ em pacientes com GBM (Perazzoli et al. 2015). De acordo com Nie et al. (2016), os mecanismos moleculares pelos quais os tumores quimiorresponsivos desenvolvem resistência permanecem ainda pouco entendidos pois a aquisição de resistência a drogas é um problema clínico persistente, limitando o sucesso do tratamento de pacientes com GBM.

Na literatura é possível encontrar diversos modelos de indução de resistência ao TMZ em diferentes linhagens de GBM (LEE, 2016). Entretanto, a grande maioria desses modelos possuem alto nível de resistência, resultante de um intenso regime de exposição ao TMZ, que não se assemelha ao regime clínico de tratamento. Ainda não existe um caminho certo para o desenvolvimento de um modelo celular de resistência ao quimioterápico clinicamente relevante, e publicações neste campo de pesquisa geralmente colocam pouca ênfase em como as linhagens celulares resistentes aos fármacos foram estabelecidas em laboratório (MCDERMOTT et al., 2014). Portanto, é de extrema importância, estabelecer um protocolo padronizado de modelo de resistência ao TMZ, visando mimetizar o regime terapêutico ao qual os pacientes com GBM são submetidos durante a quimioterapia, buscando criar uma ferramenta que permita o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência do GBM ao TMZ



## 2.2 MATERIAS E MÉTODOS

### 2.2.1 Reagentes

A linhagem de glioblastoma humano U87-MG foi obtida da American Type Culture Collection, USA. O TMZ, Dimetilsulfóxido (DMSO), Glicose e os sais para o meio de cultura foram obtidos da Sigma-Aldrich Co., USA. O Soro Fetal Bovino (SFB), Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), fungizona e penicilina/estreptomicina foram obtidos da GIBCO®, Invitrogen™ USA.

Para a exposição contínua das células ao TMZ foi utilizado uma solução estoque de 50mM de TMZ. Para os experimentos de confirmação da resistência, foi utilizado uma solução estoque de 100mM de TMZ, ambas diluídas em DMSO e armazenadas a -20°C.

### 2.2.2 Cultura celular

As células foram cultivadas em DMEM contendo 0,5 U/mL penicilina, 2,5 mg/mL fungizona e suplementadas com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 95% de umidade relativa e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3 Desenvolvimento da linhagem resistente e confirmação da resistência

O modelo de resistência das células de GBM foi desenvolvido de acordo com o protocolo descrito na Figura 1. As células da linhagem U87-MG foram inicialmente cultivadas em garrafas e, antes de serem expostas ao TMZ, elas foram semeadas em uma placa de 6 poços na concentração de 50.000 células/poço. O tratamento das células iniciou na placa e quando as células atingiram confluência, o conteúdo de cada poço foi transferido para garrafas de 25cm<sup>2</sup>. A exposição das células ao TMZ seguiu o regime padrão clínico, constituído de duas fases. As diferentes concentrações TMZ utilizadas em cada fase foram obtidas a partir das concentrações

de TMZ medidas nos tumores de pacientes com GBM após administração de diferentes doses (75 mg/m<sup>2</sup> por dia até 200 mg/m<sup>2</sup> por dia) do quimioterápico (ROSSO et al., 2009).

Na primeira fase, as células foram expostas a uma concentração de 18 µM (equivalente a uma dose de 75 mg/m<sup>2</sup> por dia) de TMZ, com renovação do tratamento a cada 48hrs, totalizando 22 dias de exposições ao quimioterápico. Depois do último dia de exposição, as células foram mantidas em cultivo até atingir a confluência celular (28 dias de confluência) e o meio de cultivo era renovado a cada 3 dias. Na segunda fase, as células foram expostas diariamente a uma concentração de 25 µM (equivalente a dose de 150 mg/m<sup>2</sup> por dia) de TMZ durante cinco dias. O meio de cultivo com tratamento era renovado a cada 24h. Após o quinto dia as células foram incubadas com meio de cultivo até atingir confluência (28 dias de confluência) e o meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias. Paralelo a linhagem exposta ao TMZ, foi mantido uma linhagem controle, aonde as células foram expostas ao DMSO na concentração de 0,5%. Ambos os regimes de exposição seguiram o mesmo protocolo. Foram cultivadas em paralelo um total de 6 garrafas (N=3 para células expostas ao DMSO 0,5% e N=3 para células expostas ao TMZ).

Ao final de cada fase ou ciclo, a resistência das células ao TMZ era averiguada (Fig. 1). Quando atingida a confluência, e antes de iniciar uma nova exposição aos tratamentos, uma alíquota das células eram expandidas para garrafas de 75cm<sup>2</sup> e cultivadas até atingir confluência. Após as células eram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 8.000 células/poço e as restantes foram congeladas e armazenadas em nitrogênio. Após 24h, as células tratadas com TMZ nas concentrações de 240 uM, 660 uM, 1000 uM, durante 72 horas. Os controles utilizados foram meio de cultivo e DMSO 1%. Os tratamentos foram realizados em triplicata

#### **2.2.4 Teste da viabilidade celular**

A viabilidade das células após os tratamentos foi avaliada pela técnica de coloração com sulforrodamina B (SRB). O SRB é um corante arroxeadado que, em condições ácidas, se liga a aminoácidos básicos da proteína celular de forma estequiométrica. Após as células serem coradas por esta técnica, a quantidade de corante extraído será diretamente proporcional ao total de proteína (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Após o tratamento, o meio foi descartado, as células foram fixadas com TCA 10% por 1 hora a 4°C. Logo em seguida foi feita a lavagem

com água destilada e secagem das placas. As células foram marcadas com SRB 0,2% por 15 minutos e solubilizadas com Tris 10 mM. Os valores de absorbância são lidos em espectrofotômetro a 490 nm.

### **2.2.5 Análise estatística**

Os resultados serão expressos como média  $\pm$  erro padrão e a análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguido de Teste de Tukey para múltiplas comparações. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6

## 2.3 RESULTADOS

A primeira fase de exposição durou aproximadamente 2 meses: 22 dias de exposição ao TMZ 18 $\mu$ M ou DMSO 0,5% a cada 48h, seguido de 28 dias sem exposição. A segunda fase de exposição durou 32 dias: 5 dias de exposição diária a diária de 25  $\mu$ M de TMZ ou DMSO 0,5% seguido de 28 dias sem exposição (Fig.1). Esse regime de tratamento foi estabelecido com base, o regime de tratamento clínico considerado como padrão (Fig 2)

### 2.3.1 Características morfológicas das células expostas ao TMZ ou DMSO

Ao longo do experimento, foram observadas através do microscópio de cultura, características morfofisiológicas nas células expostas as concentrações crescentes de TMZ, quando comparadas as células controles expostas ao DMSO. As células cultivadas com TMZ apresentaram uma baixa taxa proliferativa, presença em abundância de vesículas extracelulares. As células tiveram passagens iguais (30) no início, e ao fim dos experimentos as cultivadas com TMZ acumularam um número menor de passagens, quando comparado com as células controles respectivamente 43 e 54 (Tabela1). O cultivo das células com TMZ também causou alterações morfológicas nas células, como aumento do corpo celular e presença de longos prolongamentos. As células controles, por sua vez, são pequenas e apresentam morfologia uniforme tipo-fibroblasto (Fig. 3).

### 2.3.2 Teste da resistência celular ao quimioterápico

A resistência ao TMZ foi testada no final da primeira e da segunda fase de exposição ao quimioterápico utilizando-se a técnica de SRB (Fig. 1), as células cultivadas com TMZ e DMSO foram tratadas com TMZ nas concentrações crescentes de 240  $\mu$ M, 660  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M. Na primeira fase as células cultivadas com TMZ (18  $\mu$ M) e DMSO 0,5% não apresentaram diferenças na porcentagem de células viáveis após 72 horas de tratamento com diferentes concentrações de TMZ (Fig 4). (n=2 , P> 0,05)

Na segunda fase da exposição ao TMZ (25  $\mu$ M), houve uma redução significativa na porcentagem de células viáveis após 72 horas de tratamento com 1000  $\mu$ M de TMZ (n= 3, P= 0,0025), porém, não houve diferença entre os grupos (Fig. 5) (n= 3, P> 0,05).

Quando comparada as fases 1 e 2 de exposição do TMZ, NÃO houve diferença significativa na porcentagem de células viáveis após tratamento por 72h com TMZ (240  $\mu$ M, 660  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M) (Fig. 6). (n= 3, P> 0,05)

## 2.4 DISCUSSÃO

O tratamento de pacientes com GBM constitui um grande desafio, pois a eficácia deste é frequentemente limitada pela reincidência do tumor, possivelmente associada a resistência à quimioterapia (LEE et al., 2015). Alguns mecanismos moleculares que explicam esses fenômenos de resistência, tais como heterogeneidade, aumento de bombas de efluxo de droga, aumento de reparo no DNA, entre outros, foram destacados nas últimas décadas (LEE, 2016). De acordo com Holohan et al. (2013), a resistência aos quimioterápicos pode ser dividida em duas grandes categorias: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca indica que, antes de receber a quimioterapia, existem fatores mediadores de resistência no grosso dos tumores que fazem terapia ineficaz. Já a resistência adquirida, pode ser causada por mutações que surgem durante o tratamento, assim como pela expressão do alvo terapêutico e pela ativação de vias alternativas de sinalização compensatória. O uso de regime de tratamento clínico em paciente com GBM como referência para mimetizar a resistência celular ao TMZ *in vitro* nesse estudo, pode ser entendido como uma alternativa para o modelo de resistência clinicamente relevante, que pode levar a um melhor entendimento dos mecanismos de envolvidos na resistência ao TMZ.

De acordo com Mcdermott et al. (2014), o desenvolvimento de uma linhagem celular resistente a medicamentos pode levar de 3 a 18 meses. Uma das desvantagens dos modelos clinicamente relevantes pode incluir resistência instável, resistência de nível muito baixo e pequenas mudanças moleculares para detectar e analisar. O nível da resistência induzida no presente trabalho, usando baixas concentrações 18  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ , na primeira e a segunda fase de exposição ao TMZ, respectivamente, tenha sido relativamente insuficiente para estabelecer uma quimio-resistência. Porém, não se descarta, presenças de eventos chaves favoráveis ao surgimento da resistência celular ao fármaco, quando chegar ao fim do regime padrão de exposição ao TMZ com seis ciclos na segunda fase.

O resultado de teste da resistência TMZ obtidos depois de 72 horas em ambas fases foi o mesmo, comparando as células controles e as cultivadas com TMZ. O fato de que os grupos controles cultivadas em DMSO e os cultivados em TMZ não apresentaram diferença no teste da resistência na primeira fase de tratamento, pode sugerir um aumento da expressão proteica pelo tamanho maior das células expostas ao quimioterápico ou outras limitações relacionadas com a técnica do SRB. A segunda fase desse trabalho se mostrou eficiente, mas não foi observado nenhuma diferença significativa entre o grupo de células controles e o das células

que foram expostas previamente ao TMZ. Por outro lado, a análise morfológica feita se mostrou bastante promissora, pela presença de vesículas extracelulares no meio de cultivo durante nas fases de exposição celular ao TMZ. Segundo Federici et al. (2014), a liberação das vesículas, que são pequenos restos celulares geralmente esféricos no meio, pode ser visto como outro mecanismo de resistência para remover o quimioterápico para fora das células.

## REFERÊNCIAS DO ARTIGO

- DEANGELIS, Lisa M.. Brain Tumors. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 344, n. 2, p.114-123, 11 jan. 2001. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). Disponível em <http://dx.doi.org/10.1056/nejm200101113440207>. Acessado em 13/11/2018.
- FEDERICI, Cristina et al. Exosome Release and Low pH Belong to a Framework of Resistance of Human Melanoma Cells to Cisplatin. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.88193-88193, 6 fev. 2014. Public Library of Science (PLoS). Disponível em <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088193>. Acessado em 08/12/2018.
- HOLOHAN, Caitriona et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.714-726, out. 2013. Springer Nature. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3599>. Acessado em 08/12/2018.
- KOUKOURAKIS, Georgios et al. Temozolomide with Radiation Therapy in High Grade Brain Gliomas: Pharmaceuticals Considerations and Efficacy;A Review Article. **Molecules**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.1561-1577, 16 abr. 2009. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14041561>. Acessado em 20/10/2018.
- LANZETTA, G., and Minniti G. “Treatment of Glioblastoma in Elderly Patients: An Overview of Current Treatments and Future Perspective.” **Tumori**, v 96. N 5, p 650–658, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/030089161009600502>. Acessado em 08/12/2018
- LEE, Derek et al. MicroRNA-210 and Endoplasmic Reticulum Chaperones in the Regulation of Chemoresistance in Glioblastoma. **Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.227-232, 2015. Ivyspring International Publisher. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7150/jca.10765>. Acessado em 20/10/2018
- LEE, Sang Y.. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.198-210, set. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>. Acessado em 20/10/2018.
- McDermott, Martina et al. “In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies” *Frontiers in oncology* vol. 4 40. 6 Mar. 2014, Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00040> . Acessado em 15/10/2018.
- Nie, E. et al. BACH1 Promotes Temozolomide Resistance in Glioblastoma through Antagonizing the Function of p53. *Sci. Rep.* 6, 39743; doi: 10.1038/srep39743 (2016). Disponível em: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep39743>. Acessado em 10/11/2018.
- OLAR, Adriana; ALDAPE, Kenneth D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 232, n. 2, p.165-177, 10 dez. 2013. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/path.4282>. Acessado em 09/11/2018.
- PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, [s.l.], v. 344, n. 6190, p.1396-1401, 12 jun. 2014. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Disponível em <http://dx.doi.org/10.1126/science.1254257>. Acessado em 11/11/2018.



PERAZZOLI, Gloria et al. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.140131, 8 out. 2015. Public Library of Science (PLoS). Disponível em <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>. Acessado em 10/11/2018.

ROSSO, L. et al. A New Model for Prediction of Drug Distribution in Tumor and Normal Tissues: Pharmacokinetics of Temozolomide in Glioma Patients. **Cancer Research**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.120-127, 1 jan. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2356>. Acessado em 11/10/2018

STUPP, Roger et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 352, n. 10, p.987-996, 10 mar. 2005. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa043330>. Acessado em 09/11/2018.

VERHAAK, Roel G.w. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.98-110, jan. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>. Acessado em 13/11/2018.

VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.1112-1116, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>. Acessado em 09/11/2018.

WELLER, R. et al. Natural new particle formation at the coastal Antarctic site Neumayer. **Atmospheric Chemistry And Physics**, [s.l.], v. 15, n. 19, p.11399-11410, 15 out. 2015. Copernicus GmbH. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5194/acp-15-11399-2015>. Acessado em 12/11/2018.

WESTPHAL, Manfred; LAMSZUS, Katrin. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.495-508, 3 ago. 2011. Springer Nature. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3060>. Acessado em 09/11/2018

WIRSCHING, Hans-georg; GALANIS, Evanthia; WELLER, Michael. Glioblastoma. **Handbook Of Clinical Neurology**, [s.l.], v. 134, n. 3, p.381-397, 2016. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2>. Acessado em 11/10/2018

## Legendas Figuras

**Figura 1:** *Desenho experimental do protocolo de exposição das células U87-MG ao quimioterápico TMZ.*

**Figura 2:** *Esquema representativo do regime de tratamento clínico para GB (Adaptado de Stupp et. Al. 2005).*

**Figura 3:** *Imagem fotográfica das células cultivadas com TMZ (18  $\mu$ M e 25  $\mu$ M) e células cultivadas com DMSO 0,5%. (1) Proliferação celular em grupo, (2) alteração morfológica nas células cultivadas em TMZ.*

**Figura 4:** *Teste da resistência ao TMZ na 1ª fase: comparação entre células cultivadas com TMZ 18 $\mu$ M e células expostas ao DMSO 0,5%.*

**Figura 5:** *Teste da resistência ao TMZ na 2ª fase: comparação entre células cultivadas com TMZ 25 $\mu$ M e células expostas ao DMSO 0,5%. ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ .  $n = 3$  em triplicata.*

**Figura 6:** *Respostas celular ao TMZ: comparação entre células cultivadas com TMZ na primeira e segunda fase. ANOVA de duas vias seguido de teste de Tukey. \*  $P < 0,05$ .  $n = 3$  em triplicata.*

**TABELA 1:** *Características morfofisiológicas das células da linhagem U87-MG submetidas ao protocolo de exposição ao DMSO ou TMZ.*

Figura1

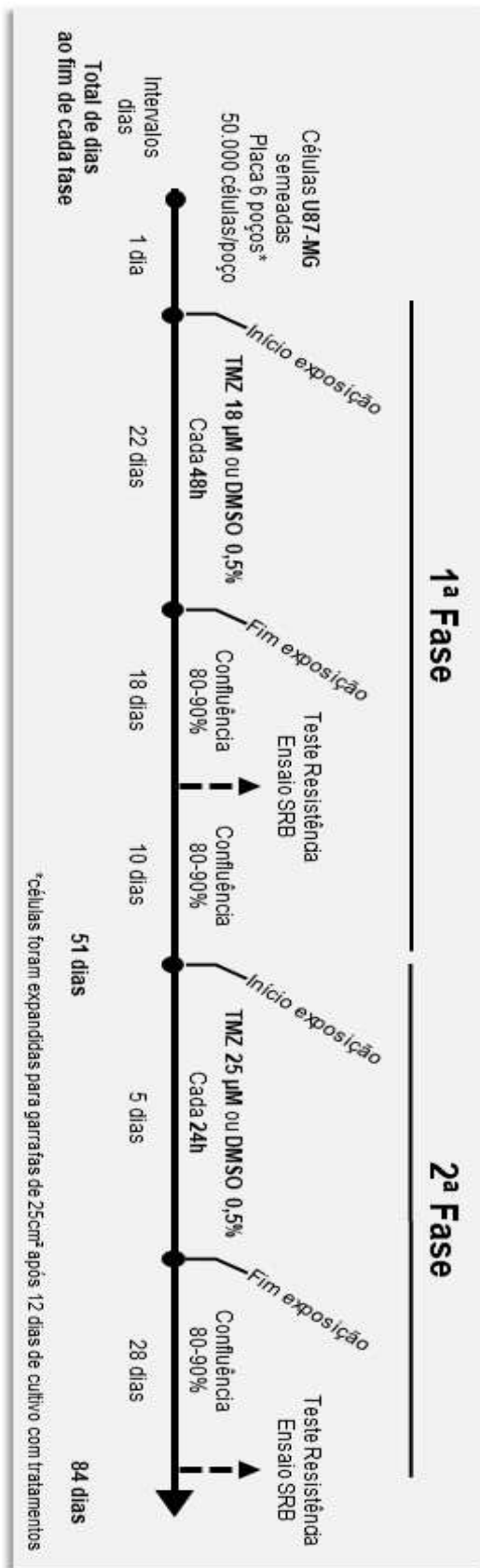
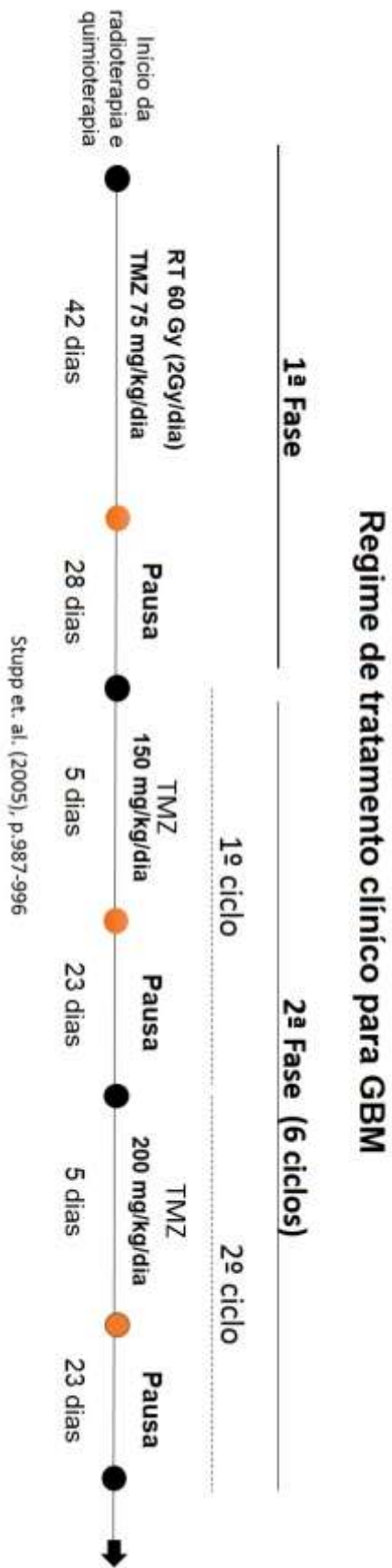


Figura 2



\*

**Tabela1**

**Tabela 1.** Características morfofisiológicas das células da linhagem U87-MG submetidas ao protocolo de exposição contínua ao TMZ ou DMSO.

<b>Características das células</b>	<b>Células expostas ao DMSO</b>	<b>Células expostas ao TMZ</b>
<b>Tamanho corpo celular</b>	Pequeno	Grande
<b>Morfologia</b>	Tipo fibroblasto Pequenos prolongamentos População uniforme	Longos prolongamentos População polimórfica
<b>Taxa proliferativa</b>	Alta	Baixa
<b>Presença de Vesículas Extracelulares</b>	Rara	Abundante
<b>Total de passagens</b>	54	43

Figura 3

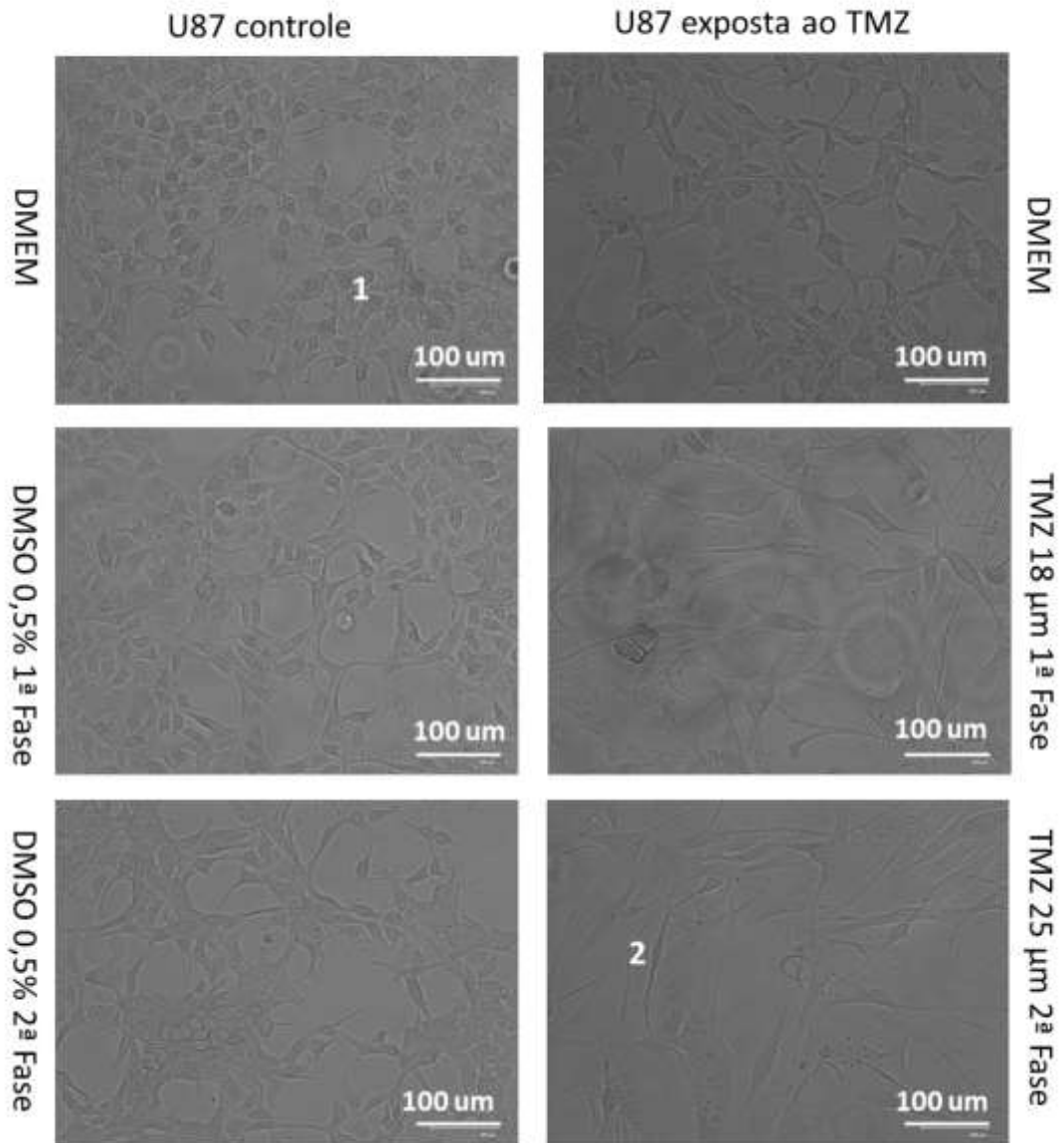


Figura 4

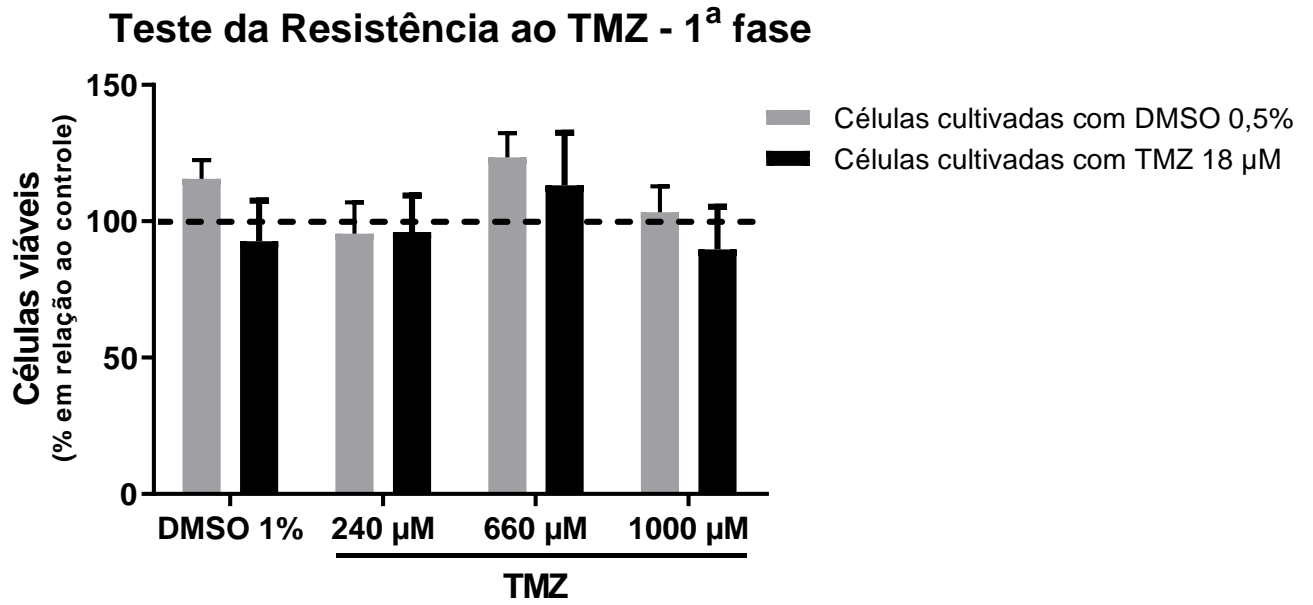


Figura 5

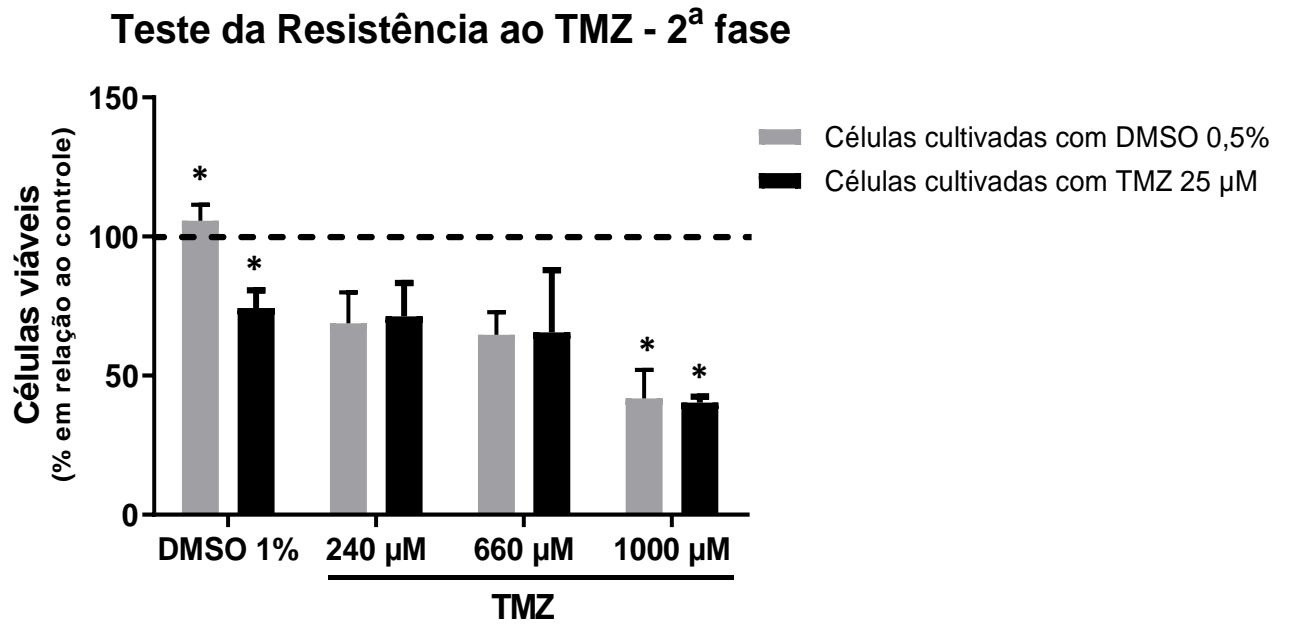
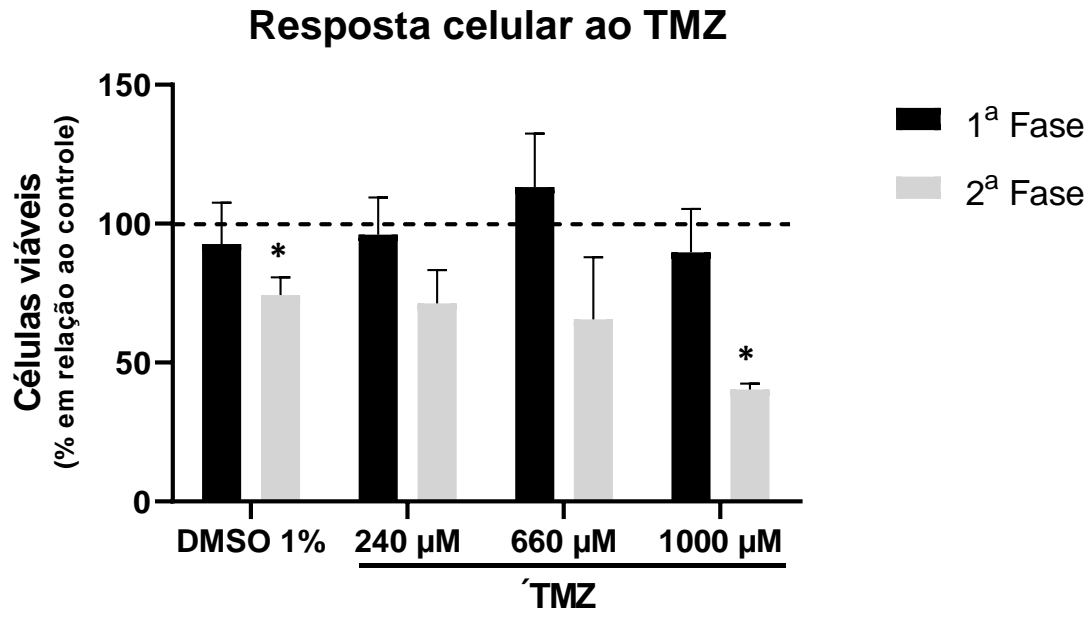




Figura 6



### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de linhagem celular U87-GM resistente ao quimioterápico TMZ, e que seja clinicamente relevante, é um processo demorado, mas continua sendo uma fonte promissora para melhorar o campo de conhecimento científico na saúde. Os presentes resultados obtidos representam dados parciais desse estudo, e sugerem que as células U87-MG previamente submetidas a uma exposição crescente de concentrações do TMZ (18 $\mu$ M e 25 $\mu$ M) resumido em duas fases não adquiriram resistências em comparação as células parentais controles.

Esse projeto está sendo desenvolvido para cumprir todas fases de regime de tratamento de um paciente com GBM. Os próximos passos são:

- Continuar o cultivo das células com TMZ até completar os seis ciclos na segunda fase.
- Investigar marcadores de resistências nas células U87-MG cultivadas com TMZ, como a proteína de reparo de DNA, MGMT.

## REFERÊNCIAS

- AREVALO, O.j. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Practical Approach for Gliomas, Part 1. Basic Tumor Genetics. **Neurographics**, [s.l.], v. 7, n. 5, p.334-343, 1 out. 2017. American Society of Neuroradiology (ASNR). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3174/ng.9170230>. Acessado em 20/10/2018.
- BOBOLA, M S et al. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. **Clinical Cancer Research**: American Association for Cancer Research, Washington, v. 2, n. 4, p.735-741, 1 abr. 1996.
- D'INCALCI, Maurizio et al. Importance of the DNA repair enzyme O6-alkyl guanine alkyltransferase (AT) in cancer chemotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.279-292, dez. 1988. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0305-7372\(88\)90026-6](http://dx.doi.org/10.1016/0305-7372(88)90026-6). Acessado em 08/12/2018.
- ELLINGSON, Benjamin M. et al. Anatomic localization of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylated and unmethylated tumors: A radiographic study in 358 de novo human glioblastomas. **Neuroimage**, [s.l.], v. 59, n. 2, p.908-916, jan. 2012. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.09.076>. Acessado em 20/10/2018.
- FAN TY, Wang H, Xiang P, et al. Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma. **Int J Clin Exp Pathol**. 2014;7(10):6662-70. Published 2014 Sep 15
- HOLOHAN, Caitriona et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.714-726, out. 2013. Springer Nature. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3599>. Acessado em 08/12/2018.
- IACOB, Gabriel and Eduard B Dinca. “Current data and strategy in glioblastoma multiforme” **Journal of medicine and life**, v 2, n 4, p 386-93, 2009. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3019011/>. Acessado em 02/01/20189.
- JIAPAER, Shabierjiang et al. Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma. **Neurologia Medico-chirurgica**, [s.l.], v. 58, n. 10, p.405-421, 2018. Japan Neurosurgical Society. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>. Acessado em 14/11/2018.
- KOUKOURAKIS, Georgios et al. Temozolomide with Radiation Therapy in High Grade Brain Gliomas: Pharmaceuticals Considerations and Efficacy;A Review Article. **Molecules**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.1561-1577, 16 abr. 2009. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14041561>. Acessado em 20/10/2018.
- LANZETTA, G., and Minniti G. “Treatment of Glioblastoma in Elderly Patients: An Overview of Current Treatments and Future Perspective.” **Tumori**, v 96. N 5, p 650–658, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/030089161009600502>. Acessado em 08/12/2018
- LEE, Sang Y.. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. **Genes & Diseases**, [s.l.], v. 3, n. 3, p.198-210, set. 2016. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>. Acessado em 20/10/2018.

McDermott, Martina et al. "In vitro Development of Chemotherapy and Targeted Therapy Drug-Resistant Cancer Cell Lines: A Practical Guide with Case Studies" *Frontiers in oncology* vol. 4 40. 6 Mar. 2014, Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00040> . Acessado em 15/10/2018.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.764-772, 3 dez. 2012. American Association for Cancer Research (AACR). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-12-3002>. Acessado em 11/10/2018.

OLAR, Adriana; ALDAPE, Kenneth D. Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 232, n. 2, p.165-177, 10 dez. 2013. Wiley. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/path.4282>. Acessado em 09/11/2018.

OMURO, Antonio. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. **Jama**, [s.l.], v. 310, n. 17, p.1842-1850, 6 nov. 2013. American Medical Association (AMA). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2013.280319>. Acessado em 09/11/2018.

OSTERMANN, S. Plasma and Cerebrospinal Fluid Population Pharmacokinetics of Temozolomide in Malignant Glioma Patients. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 3728–3736, 2004. Disponível em: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-03-0807>. Acessado em 09/11/2018.

RAMIREZ, Yulian et al. Glioblastoma Multiforme Therapy and Mechanisms of Resistance. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.1475-1506, 25 nov. 2013. MDPI AG. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ph6121475>. Acessado em 11/10/2018

ROSSO, L. et al. A New Model for Prediction of Drug Distribution in Tumor and Normal Tissues: Pharmacokinetics of Temozolomide in Glioma Patients. **Cancer Research**, [s.l.], v. 69, n. 1, p.120-127, 1 jan. 2009. American Association for Cancer Research (AACR). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-2356>. Acessado em 11/10/2018

STUPP, Roger et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. **New England Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 352, n. 10, p.987-996, 10 mar. 2005. New England Journal of Medicine (NEJM/MMS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa043330>. Acessado em 09/11/2018.

THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1985-1996, 22 jul. 2014. American Association for Cancer Research (AACR). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.epi-14-0275>. Acessado em 09/11/2018

UJIFUKU, Kenta et al. MiR-195, miR-455-3p and miR-10a\* are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 296, n. 2, p.241-248, out. 2010. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.04.013>. Acessado em 09/11/2018

WELLER, Michael et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: Ready for personalized medicine? **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 39–51, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2009.197>. Acessado em 09/11/2018

WELLER, Michael et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 15, n. 9, p.395-403, ago. 2014. Elsevier BV. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(14\)70011-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(14)70011-7). Acessado em 09/11/2018

WIRSCHING, Hans-georg; GALANIS, Evanthia; WELLER, Michael. Glioblastoma. **Handbook Of Clinical Neurology**, [s.l.], v. 134, n. 3, p.381-397, 2016. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802997-8.00023-2>. Acessado em 11/10/2018

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CANCER LETTERS

**CANCER LETTERS**

An international journal providing a forum for original and pertinent contributions in cancer research

**AUTHOR INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

• <b>Description</b>	<b>p.1</b>
• <b>Audience</b>	<b>p.1</b>
• <b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
• <b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
• <b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
• <b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0304-3835

**DESCRIPTION**

*Cancer Letters* is an international journal that considers full-length articles and Mini Reviews in the broad area of basic and **translational oncology**. Additionally, Special Issues highlight topical areas in **cancer research**. Basic areas of interest to a broad readership of *Cancer Letters* include the molecular genetics and cell biology of **cancer, radiation biology**, molecular pathology, **hormones** and cancer, **viral oncology, metastasis**, and **chemoprevention**. The journal places emphasis on experimental therapeutics, particularly targeted therapies for personalized cancer medicine.

*Cancer Letters* now offers online submission for authors. Please submit manuscripts at <http://www.ees.elsevier.com/can> and follow the instructions on the site.

**Benefits to authors**

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://service.elsevier.com>.

**AUDIENCE**

Cancer researchers, toxicologists, pathologists, endocrinologists, virologists, molecular, cell and tumor biologists, radiotherapists, epidemiologists.

**IMPACT FACTOR**

2018: 6.508 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS Citation Index  
 Chemical Abstracts  
 Current Contents - Life Sciences  
 Embase  
 PubMed/Medline  
 Oncology Information Service  
 Pascal Francis  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Manfred Schwab**, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany

### *Associate Editor (Shanghai Office)*

**Min Li**, Oklahoma City, United States

### *Editorial Board (Shanghai and Tianjin Editorial Offices)*

**Ceshi Chen**, China  
**Jing Fang**, Shanghai, China  
**Jianren Gu**, Shanghai, China  
**Xiaomao Guo**, Shanghai, China  
**Jie He**, Beijing, China  
**He Ren**, Tianjin, China  
**Changqing Su**, Shanghai, China  
**Hong-Yang Wang**, Shanghai, China  
**Xianjun Yu**, Shanghai, China

### *Associate Editors*

**Hasan Mukhtar**, University of Wisconsin-Madison Department of Dermatology, Madison, Wisconsin, United States

**Toshikazu Ushijima**, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

### *Editorial Board*

**Maria Blanco-Prieto**, Pamplona, Spain  
**Dan Cacsire Castillo-Tong**, Wien, Austria  
**Andrew Chan**, Shatin, Hong Kong  
**Jason Chen**, New York, United States  
**Francois Claret**, Houston, Texas, United States  
**Yan Dong**, Louisiana, United States  
**Deilson Elgui de Oliveira**, BOTUCATU, Brazil  
**Michael Freeman**, Tennessee, United States  
**Simone Fulda**, Frankfurt am Main, Germany  
**Alexandros Georgakilas**, Greenville, North Carolina, United States  
**Sanjay Gupta**, Cleveland, Ohio, United States  
**David Hoskin**, Halifax, Nova Scotia, Canada  
**Chiung-Kuei Huang**, Providence, Rhode Island, United States  
**Honbo Huang**, Chengdu, Sichuan, China  
**Pintong Huang**, Hangzhou, China  
**Evgeny Imyanitev**, Sankt Peterburg, Russian Federation  
**Shuai Jiang**, California, United States  
**Dean Johnston**, New York, New York, United States  
**Miran Kim**, Providence, Rhode Island, United States  
**Guideng Li**, Suzhou, China  
**Min Li**, Oklahoma City, United States  
**Zhihua Liu**, Beijing, China  
**Xiao-Jie Lu**, Nanjing, China  
**Rekha Mehta**, Ottawa, Ontario, Canada  
**Dan Peer**, Tel Aviv, Israel  
**Yong Peng**, Chengdu, Sichuan, China  
**Suhkneung Pyo**, Suwon, Korea, Republic of  
**Liang Qiao**, Westmead, New South Wales, Australia  
**Pranela Rameshwar**, Newark, New Jersey, United States



**Gautam Sethi**, Singapore, Singapore  
**Seema Singh**, Mobile, Alabama, United States  
**Shree Ram Singh**, Frederick, Maryland, United States  
**Yong-Sang Song**, Seoul, Korea, Republic of  
**Gloria H. Su**, New York, New York, United States  
**Young-Joon Surh**, Seoul, Korea, Republic of  
**David Symer**, Houston, Texas, United States  
**Gerald Verhaegh**, Nijmegen, Netherlands  
**Mariano Viapiano**, Syracuse, New York, United States  
**Robert C.A.M. van Waardenburg**, Birmingham, Alabama, United States  
**Kai Wang**, Hangzhou, China  
**Deborah White**, Adelaide, South Australia, Australia  
**Eddy Yang**, Birmingham, Alabama, United States  
**Shyng-Shiou Yuan**, Kaohsiung, Taiwan  
**Andrey Zamyatnin**, Moscow, Russian Federation  
**Hao Zhang**, Guangzhou, Guangdong, China  
**Guoguang Zheng**, Xicheng District, China  
**Shengtao Zhou**, Chengdu, Sichuan, China



## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Types of Papers*

*Cancer Letters* is an international journal that considers full length articles and Mini Reviews in the broad area of basic and translational oncology. Additionally, special issues highlight topical areas in cancer research. Areas of interest to the broad readership of *Cancer Letters* include the molecular genetics and cell biology of cancer, radiation biology, molecular pathology, hormones and cancer, viral oncology, metastasis, chemoprevention and targeted therapies for personalized cancer medicine. **Noncoding RNA (ncRNA) and its role in different types of human cancer** has been a highlight topic for *Cancer Letters* over the past years, manuscripts in this area are particularly welcome.

### Mini Reviews

Authors of Mini Reviews must be a scientific authority for the topic of the manuscript, they must document their relevant own experience for the area by listing their own relevant original publications in the cover letter. Manuscript submissions that fail to list relevant own original publications in the cover letter will be returned to authors. All Mini reviews should be about 5000 words and should not include more than 100 references.

*Cancer Letters* operates a single blind review process. All original papers should be between 3000 and 3500 words and will be initially assessed by the Editors for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information](#) on types of peer review.

The Editorial Office has adopted a rating system, in order to establish which manuscripts will be sent out for peer review. The rating system allows the Editor to assess the manuscript in terms of the following criteria:

- \* Presentation
- \* Style and structure
- \* Quality of English language
- \* Whether the topic being covered is within the aims and scope of the journal
- \* The manuscript's scientific novelty together with how it compares to other manuscripts submitted on similar topics.

Those manuscripts which are judged as being eligible for consideration by the Editors will be subject to peer review.

### *Page charges*

This journal has no page charges.

### *Submission Checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked' and meets a level of English proficiency consistent with English-language journals
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### *Ethics and Procedures*

The editors and publisher of this Journal believe that there are fundamental principles underlying scholarly or professional publishing. While this may not amount to a formal "code of conduct", these fundamental principles with respect to the authors' paper are that the paper should:

- \* be the authors' own original work, which has not been previously published elsewhere
- \* reflect the authors' own research and analysis and do so in a truthful and complete manner,
- \* properly credit the meaningful contributions of co-authors and co-researchers,
- \* not be submitted to more than one journal for consideration (ensuring it is not under redundant simultaneous peer review), and
- \* be appropriately placed in the context of prior and existing research.

Of equal importance are ethical guidelines dealing with research methods and research funding, including issues dealing with informed consent, research subject privacy rights, conflicts of interest, and sources of funding. While it may not be possible to draft a "code" that applies adequately to all instances and circumstances, we believe it useful to outline our expectations of authors and procedures that the Journal will employ in the event of questions concerning author conduct. Relevant conflicts of interest should be disclosed (see <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>).

Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines.

### *Studies in humans and animals*

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Work on human beings that is submitted to Cancer Letters should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The



manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

#### **Guidelines for Formatting Gene and Protein Names**

Please refer to the following [Guidelines](#) to ensure correct formatting for Gene and Protein Names

#### **Reliability of results based on cultivated animal and human cells**

Authors must state in their manuscript how the identity of the cell line was confirmed.

#### **Declaration of Interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

#### **Submission of Manuscripts**

Manuscripts should be submitted online at <http://www.ees.elsevier.com/can> and the instructions on the site should be closely followed. Authors may submit manuscripts and track their progress through to final decision.

Authors unable to submit online should contact the Editorial Office:

Cancer Letters Editorial Office  
Elsevier Ltd  
The Boulevard  
Langford Lane  
Oxford OX5 1GB  
U.K.  
Tel : +44 (0)1865 843203  
Fax : +44 (0)1865 843992  
Email : [cancerletters@elsevier.com](mailto:cancerletters@elsevier.com)

Submission of an article to Cancer Letters implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or any other language, without the written consent of the Publisher.

Manuscripts should be submitted in English. Authors' full names, academic or professional affiliations, and addresses should be included on the first page. All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or the acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. The name, postal address, email address, phone and FAX numbers of the corresponding author should be provided. Authors should supply the names, institutional mailing address and institutional email addresses of 3 to 5 potential reviewers for their manuscript and indicate why each reviewer would be competent for reviewing the manuscript. To provide an international perspective, no more than 2 potential reviewers should be from the same country. Please do not suggest reviewers from your own institution, previous or current collaborators or Editorial Board members. Please do not contact any reviewers that you have



suggested. Without reviewer suggestions, processing of the manuscript may be delayed. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. For more details, visit our [Support site](#).

Online submission guidelines can be followed at <http://www.ees.elsevier.com/can>. Via this website you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files into a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that although manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by email and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

#### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

#### **Preprints**

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

#### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

#### **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

#### **Article transfer service**

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

#### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If



excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

#### **Gold open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for



publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

#### *Elsevier Researcher Academy*

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <https://service.elsevier.com> for more information. Authors should be aware that papers written in poor English are more likely to be rejected.

#### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/can/>.

#### *Reviewer Suggestions*

Authors should supply the names, institutional mailing address and institutional email addresses of 5 potential reviewers for their manuscript and indicate why each reviewer would be competent for reviewing the manuscript. To provide an international perspective, no more than 2 potential reviewers should be from the same country. Please do not suggest reviewers from your own institution, previous or current collaborators or Editorial Board members. Please do not contact any reviewers that you have suggested. Without reviewer suggestions, processing of the manuscript may be delayed. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. For more details, visit our [Support site](#).

## **PREPARATION**

### **Preparation of Manuscript**

Please strive for a professionally prepared manuscript of high technical and scientific quality. Many reviewers are overwhelmed with review requests. Our experience is that they are more likely to agree to review a well prepared manuscript.

Articles should be submitted in the following order : Title, Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References.

Please number the headings in your manuscript as follows:

1. Introduction; 2. Materials and methods; 3. Results; 4. Discussion, etc.; with further numbering for subheadings (e.g. 1.1, 1.2, etc) as required.

All submissions must be accompanied by a covering letter in which the significance of the results is outlined in no more than 5 sentences.

Title must address the main result of the study and preferably not exceed 185 characters, including spaces. Extraneous words such as 'study' 'investigation', 'analysis', etc, should be avoided.



**Acknowledgements.** All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a departmental chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for that assistance.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems and careful thought should be given to them. Titles should be informative, they should present the main result(s), best will be to design the title as a take-home message. Avoid abbreviations and formulae where possible and avoid addressing simply what you have done, such as "Profiling of?.", "Analysis of?.", also "Effect of?.", "Role of?.", "Correlation of?.", "Association of?.", "Modulation of?.", or titles with a question mark.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

**Note - in some instances, such as ethical investigations or corrigenda, the Editorial Team may ask for all authors' contact details. It will be the responsibility of the corresponding author to provide this information and ensure it is correct and up to date.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Note: If there is more than one corresponding author, please mention the main corresponding author and followed by additional corresponding authors in the Title page

#### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

#### **Abstract**

A concise and factual abstract is required not exceeding 185 words excluding spaces. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes, therefore please try to avoid duplicating words which have already appeared in the title of the paper.

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section at the end of the article before the references. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### **Artwork**

##### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
  - Embed the used fonts if the application provides that option.
  - Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
  - Number the illustrations according to their sequence in the text.
  - Use a logical naming convention for your artwork files.
  - Provide captions to illustrations separately.
  - Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
  - Submit each illustration as a separate file.
  - Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.
- A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

##### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.



#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

#### *Illustration services*

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Tables*

Tables should be typed, with double spacing, each on a separate sheet, numbered consecutively with Roman numerals, and should only contain horizontal lines. A short descriptive heading should be given above each table, and any footnotes and explanations underneath.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/cancer-letters>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:



Please ensure to provide the complete author names in reference list. The journal style will be applied at proof stage.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

#### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

#### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Note: If 'Editing services' or 'Language editing certificate' is required, please ensure to submit under 'additional files' in EES. Do not upload under supplementary files as this would appear online.

#### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.



In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### *Online proof correction*

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

#### *Offprints*

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>