

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Centro de Biotecnologia  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS NA  
SENESCÊNCIA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA**

Fernanda Dittrich Pinto Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Porto Alegre

2024

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Centro de Biotecnologia  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS NA  
SENESCÊNCIA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Fernanda Dittrich Pinto Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz  
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela

Porto Alegre  
Novembro de 2024

## CIP - Catalogação na Publicação

Dittrich Pinto Oliveira, Fernanda  
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL  
ENOVELADAS NA SENESCÊNCIA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA /  
Fernanda Dittrich Pinto Oliveira. -- 2024.  
106 f.  
Orientador: Guido Lenz.

Coorientador: Eduardo Cremonese Filippi-Chiela.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado  
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,  
2024.

1. Resposta a proteína mal enoveladas. 2. Estresse  
do retículo endoplasmático. 3. Senescência celular. 4.  
Glioblastoma multiforme. 5. Temozolomida. I. Lenz,  
Guido, orient. II. Cremonese Filippi-Chiela, Eduardo,  
coorient. III. Título.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

O trabalho a ser apresentado foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (LabSinal) do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer às agências de fomento por terem possibilitado o desenvolvimento deste trabalho, e à UFRGS e ao PPGBCM por terem me proporcionado uma formação científica de qualidade.

Aos meus orientadores, Prof. Guido e Prof. Eduardo, agradeço por confiarem em mim e no meu trabalho e por serem parte fundamental da minha formação como pesquisadora. Agradeço também a todos os colegas do LabSinal pela parceria diária e pelo apoio mútuo. Em especial, agradeço à Camila pela ajuda como aluna de iniciação científica durante os meus dois anos de mestrado.

À minha família e aos meus amigos, agradeço por estarem sempre ao meu lado me apoiando. Aos meus pais, obrigada por serem meus maiores incentivadores e possibilitarem essa trajetória. À minha irmã Paula, obrigada pelo carinho e acolhimento sempre. Ao Felipe, agradeço por trilhar esse caminho ao meu lado e tornar tudo mais leve.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1. Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR).....	13
1.1. IRE1-XBP1 .....	15
1.2. ATF6.....	16
1.3. UPR no Câncer .....	17
2. Senescência Celular.....	18
2.1. Senescência no Câncer .....	21
2.2. Senescência e UPR .....	24
3. Glioblastoma Multiforme .....	27
3.1. Temozolomida .....	28
3.2. UPR em Modelos de Glioblastoma .....	29
3.3. Senescência em Modelos de Glioblastoma .....	30
4. Análises de Células Únicas e Dinâmica Fenotípica.....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
Objetivo Geral.....	34
Objetivos Específicos.....	34
<b>APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	35

Abstract.....	37
Keywords .....	37
Highlights .....	37
Introduction .....	38
Materials and Methods.....	39
Results.....	44
Discussion .....	59
Conclusion .....	62
Funding sources .....	62
Author contributions .....	62
Acknowledgements.....	63
Declaration of competing interest .....	63
Appendix A. Supplementary data .....	63
Data availability.....	68
References .....	69
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>100</b>
<b><i>CURRICULUM VITAE</i>.....</b>	<b>104</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATF6	Fator ativador da transcrição 6 ( <i>activating transcription factor 6</i> )
BiP	Proteína imunoglobulina de ligação ( <i>binding immunoglobulin protein</i> )
CDK	Quinase dependente de ciclina ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
CHOP	Proteína homóloga C/EBP ( <i>C/EBP homologous protein</i> )
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido ( <i>dimethyl sulfoxide</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Ditiotreitol ( <i>dithiothreitol</i> )
EGFP	Proteína fluorescente verde melhorada ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
ER	Retículo endoplasmático ( <i>endoplasmic reticulum</i> )
ERAD	Degradação de proteínas associada ao retículo endoplasmático ( <i>endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i> )
GBM	Glioblastoma multiforme ( <i>glioblastoma multiforme</i> )
IRE1	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
JNK	c-Jun N-terminal quinase ( <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
MGMT	O6-metilguanina-DNA metiltransferase ( <i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i> )
NF-κB	Fator nuclear kappa B ( <i>nuclear factor kappa B</i> )
NMA	Análise morfométrica nuclear ( <i>nuclear morphometric analysis</i> )
OIS	Senescência induzida por oncogene ( <i>oncogene-induced senescence</i> )

PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PDIA1	Proteína dissulfeto-isomerase A1 ( <i>protein disulfide-isomerase A1</i> )
PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
RIDD	Decaimento regulado dependente de IRE1 ( <i>regulated IRE1-dependent decay</i> )
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>ribonucleic acid</i> )
mRNA	RNA mensageiro ( <i>messenger RNA</i> )
RS	Senescência replicativa ( <i>replicative senescence</i> )
SASP	Fenótipo secretor associado à senescência ( <i>senescence-associated secretory phenotype</i> )
SA- $\beta$ -gal	$\beta$ -galactosidase associada à senescência ( <i>senescence-associated <math>\beta</math>-galactosidase</i> )
TG	Tapsigargina ( <i>thapsigargin</i> )
TIS	Senescência induzida por terapia ( <i>therapy-induced senescence</i> )
TM	Tunicamicina ( <i>tunicamycin</i> )
TMZ	Temozolomida ( <i>temozolomide</i> )
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas ( <i>unfolded protein response</i> )
WT	Tipo selvagem ( <i>wild type</i> )
XBP1	Proteína de ligação X-box 1 ( <i>X-box binding protein 1</i> )
53BP1	Proteína 1 de ligação à proteína supressora de tumor p53 ( <i>tumor protein p53 binding protein 1</i> )

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As principais vias da UPR iniciadas a partir do ER .....	17
Figura 2. Visão geral da senescência celular .....	21
Figura 3. Efeitos pró-tumorais da senescência celular .....	23

## RESUMO

O desequilíbrio entre a carga de proteínas que entra no retículo endoplasmático (ER, do inglês *endoplasmic reticulum*) e sua capacidade de enovelamento proteico resulta no estresse do ER, desencadeando a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*). Três sensores transmembrana do ER - IRE1, PERK e ATF6 - são ativados para aliviar o estresse. Sob estresse, IRE1 realiza o *splicing* do mRNA de XBP1, resultando na tradução do fator de transcrição ativo, enquanto ATF6 é clivada para liberar seu fragmento citosólico, que também funciona como um fator de transcrição. As células tumorais exploram as vias citoprotetoras da UPR para sobreviver ao estresse. A senescência celular é um estado de parada permanente do ciclo celular caracterizada por resistência à morte celular e mudanças morfológicas e metabólicas. Terapias antitumorais, como quimioterápicos que causam dano ao DNA, podem induzir o acúmulo de células senescentes no tumor. Ainda que não sejam proliferativas, as células senescentes podem alterar o microambiente tumoral e promover a progressão do câncer e resistência à terapia. Células senescentes sofrem estresse do ER, mas pouco se sabe sobre a dinâmica de ativação e a regulação das vias da UPR na senescência induzida por terapia. Neste trabalho, utilizamos imagens de células únicas vivas para monitorar a dinâmica de duas importantes vias da UPR, IRE1-XBP1 e ATF6, em células de glioblastoma tratadas com temozolomida (TMZ), a quimioterapia padrão para esse tipo de câncer e um indutor de senescência conhecido. A via IRE1-XBP1 foi altamente ativada em resposta à TMZ. Nossos dados populacionais e de células únicas revelaram ativação concomitante de IRE1-XBP1 e marcadores fenotípicos de senescência. Nós também observamos que fenótipos morfológicos senescentes distintos apresentaram diferentes níveis de ativação da via IRE1-XBP1. Embora a via ATF6 não tenha sido significativamente ativada em células senescentes, a superexpressão de ATF6 induziu senescência em uma fração de células. Além disso, ATF6 potencializou os efeitos do tratamento com TMZ através da indução precoce de senescência e parada de proliferação. Nosso estudo fornece novos *insights* sobre a ativação das vias da UPR em resposta à TMZ no glioblastoma, destacando sua relevância na senescência induzida pela terapia.

## ABSTRACT

An imbalance between the protein load entering the endoplasmic reticulum (ER) and its protein folding capacity results in ER stress, triggering the unfolded protein response (UPR). Three ER transmembrane sensors - IRE1, PERK, and ATF6 - are activated to alleviate stress. Under stress, IRE1 splices XBP1 mRNA, resulting in the translation of the active transcription factor, while ATF6 is cleaved to release its cytosolic fragment, which also functions as a transcription factor. Tumor cells exploit the cytoprotective pathways of the UPR to survive stress. Cellular senescence is a state of permanent cell cycle arrest characterized by resistance to cell death and morphological and metabolic changes. Antitumor therapies, such as DNA-damaging drugs, can induce the accumulation of senescent cells within the tumor. Even though they are not proliferative, senescent cells can alter the tumor microenvironment and promote cancer progression and therapy resistance. Senescent cells undergo ER stress, but little is known about the activation dynamics and regulation of UPR pathways in therapy-induced senescence. Here, we used live single-cell imaging to monitor the dynamics of two key UPR pathways, IRE1-XBP1 and ATF6, in glioblastoma cells treated with temozolomide (TMZ), the standard chemotherapy for this type of cancer and a known senescence inducer. The IRE1-XBP1 pathway was highly activated in response to TMZ. Our population and single-cell data revealed a concomitant activation of IRE1-XBP1 and phenotypic markers of senescence. We also observed that distinct senescent morphological phenotypes displayed different activation levels of IRE1-XBP1 pathway. Although the ATF6 pathway was not significantly activated in senescent cells, ATF6 overexpression induced senescence in a fraction of cells. Furthermore, ATF6 potentiated the effects of TMZ treatment by causing early induction of senescence and proliferation arrest. Our study provides new insights into the activation of the UPR pathways in response to TMZ in glioblastoma, highlighting their relevance in therapy-induced senescence.

## INTRODUÇÃO

### 1. A Resposta a Proteínas Mal Enoveladas (UPR)

O retículo endoplasmático (ER, do inglês *endoplasmic reticulum*) é uma organela essencial para a síntese, o enovelamento e a modificação pós-traducional de proteínas, sendo responsável por processar cerca de um terço do proteoma celular (BRAAKMAN; BULLEID, 2011). Organizado como uma rede de túbulos e vesículas interligadas, o ER mantém comunicação direta com o envoltório nuclear e serve como ponto de ancoragem para ribossomos, onde proteínas destinadas ao próprio ER, à membrana plasmática, ao complexo de Golgi, aos lisossomos ou à secreção extracelular são sintetizadas. No lúmen do ER, essas proteínas são enoveladas em suas conformações tridimensionais e passam por modificações pós-traducionais, como glicosilação e formação de pontes dissulfeto. Esses processos são mediados por uma maquinaria composta por proteínas residentes do ER que englobam chaperonas, enzimas glicosilantes e oxido-redutases (HETZ; PAPA, 2018). Para assegurar que as proteínas sejam dobradas e processadas corretamente, o ER conta com um complexo sistema de controle de qualidade. Esses mecanismos garantem um enovelamento e um tráfego de proteínas eficientes. As proteínas mal enoveladas são transportadas ao citosol para serem ubiquitinadas e subsequentemente degradadas pelo proteassoma 26S, através do processo conhecido como degradação de proteínas associada ao ER (ERAD, do inglês *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (SMITH; PLOEGH; WEISSMAN, 2011).

A capacidade do ER de realizar suas funções é, contudo, altamente sensível a distúrbios no ambiente celular. Essas perturbações podem ser causadas por alterações nos níveis de cálcio ou no estado redox do ER, condições de privação de nutrientes ou hipóxia, mutações que causam proteínas defeituosas, entre outras condições que podem sobrecarregar a capacidade de processamento do ER (ANKEN; BRAAKMAN, 2005; HETZ; PAPA, 2018). O desequilíbrio entre a carga de proteínas que entra no ER e sua capacidade de enovelamento proteico gera o

acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do ER. Essa condição é chamada de estresse do ER (HETZ; PAPA, 2018).

Como resposta a essa condição de estresse, a célula ativa uma complexa rede de vias de sinalização interconectadas, que são conjuntamente denominadas de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês *unfolded protein response*). As vias da UPR visam restaurar a homeostase do ER e preservar a função celular. Para isso, a UPR atua de duas principais maneiras: (1) diminui a carga proteica no ER por meio da atenuação transitória da síntese proteica e da degradação de proteínas mal dobradas através de ERAD; e (2) aumenta a capacidade de processamento do ER pelo aumento da expressão de proteínas envolvidas no enovelamento proteico, como chaperonas e proteínas dissulfeto-isomerases (HETZ; PAPA, 2018; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). No entanto, se essas estratégias não forem suficientes para restaurar a homeostase no ER, o estresse prolongado ou irreversível pode levar à morte celular por apoptose (HETZ, 2012).

A UPR é regulada por três cascatas de sinalização, cada uma iniciada por uma proteína transmembrana do ER: PERK, IRE1 e ATF6 (Figura 1). O mecanismo de ativação desses três sensores ainda não é totalmente conhecido, mas se sabe que o envolvimento da proteína chaperona BiP (ou GRP78), e possivelmente de outras chaperonas, é importante. Em condições normais, BiP está associada aos domínios luminais dessas três proteínas, impedindo sua ativação. Sob estresse do ER, BiP é recrutada pelas proteínas mal enoveladas e se dissocia dos sensores, permitindo a oligomerização e a autofosforilação de PERK e IRE1, bem como o transporte de ATF6 para o complexo de Golgi (BERTOLOTTI *et al.*, 2000; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Além disso, modelos mais recentes propõem que, simultaneamente ao desligamento de BiP das proteínas sensoras, as proteínas mal dobradas podem ser diretamente reconhecidas pelo domínio luminal dessas proteínas (KARAGÖZ; ACOSTA-ALVEAR; WALTER, 2019).

Se o estresse do ER persistir e as respostas adaptativas não forem suficientes para restaurar a homeostase, a UPR pode desencadear morte celular por apoptose. Diferentes vias da UPR contribuem para a indução de sinais pró-apoptóticos que no final convergem na via intrínseca da apoptose (IURLARO;

MUÑOZ-PINEDO, 2016). Nesse contexto, a via da PERK é particularmente importante, pois ela regula positivamente as proteínas CHOP e GADD34. Esses fatores de transcrição, por sua vez, induzem a expressão de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, além de promoverem a retomada da síntese proteica e conseqüentemente o aumento de estresse oxidativo (HETZ, 2012; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Apesar de também possuir importantes funções adaptativas, como a atenuação transitória da síntese proteica e a indução de respostas antioxidantes e autofagia, a via da PERK está fortemente associada à indução de apoptose sob estresse do ER. Assim como a via da PERK, IRE1 também pode desencadear mecanismos pró-apoptóticos (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Para além de sua função clássica de ativar o fator de transcrição XBP1 através de um *splicing* não convencional, IRE1 degrada RNAs-alvo essenciais para a sobrevivência celular por intermédio de um processo chamado de decaimento regulado dependente de IRE1 (RIDD, do inglês *regulated IRE1-dependent decay*) (MAUREL *et al.*, 2014). Por fim, IRE1 pode se associar à proteína TRAF2, que interage com outros fatores para finalmente ativar a quinase JNK, sendo esse outro mecanismo pelo qual IRE1 pode levar à morte celular por apoptose (URANO *et al.*, 2000).

No entanto, neste trabalho, iremos focar nas duas principais vias da UPR que classicamente desempenham funções citoprotetoras: IRE1-XBP1 e ATF6. Suas funções centrais para a manutenção da homeostase do ER e a sobrevivência celular diante do estresse do ER serão discutidas em mais detalhes a seguir.

### **1.1. IRE1-XBP1**

IRE1 (ou IRE1 $\alpha$  em mamíferos) é uma proteína transmembrana do tipo I que desempenha um papel central na resposta ao estresse do ER. Localizada na membrana do ER, IRE1 possui dois domínios funcionais no lado citosólico: uma serina/treonina quinase e uma endoribonuclease (RNase). Em resposta ao acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do ER, ocorre a oligomerização e autofosforilação de IRE1, eventos que promovem uma alteração conformacional na proteína, ativando sua atividade de RNase. Esse processo marca o início da via de

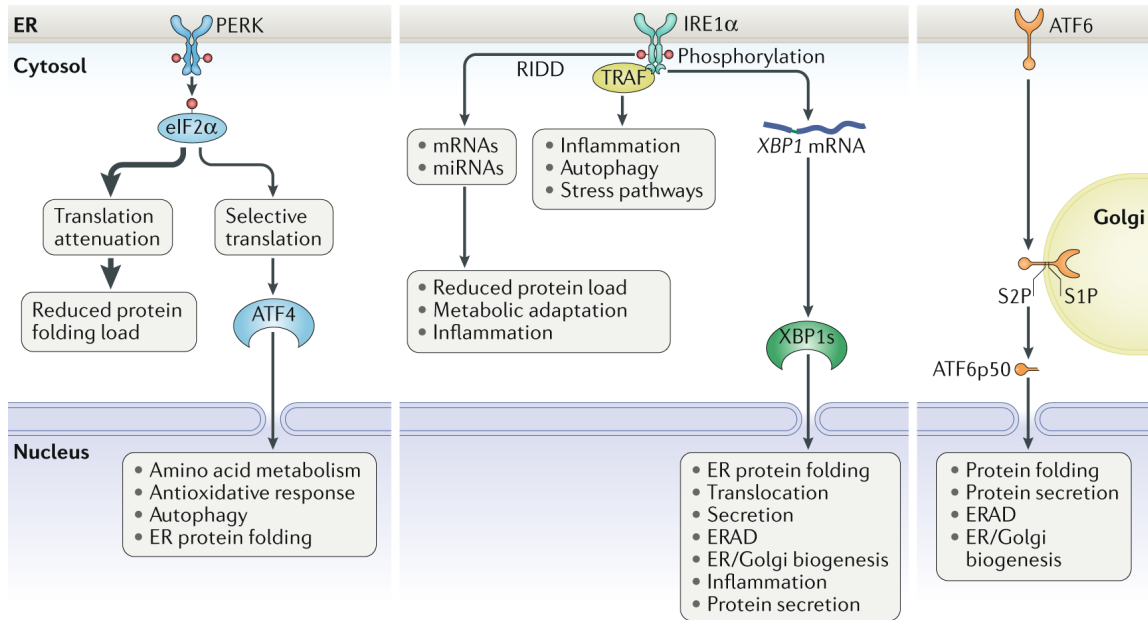
sinalização mais conservada da UPR. Em leveduras, modelo em que a UPR foi inicialmente descoberta, há apenas a via originada da proteína ortóloga de IRE1 (Ire1), o que tornou essa a via mais estudada e conhecida (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020; READ; SCHRÖDER, 2021).

A ativação de IRE1 leva a um evento de *splicing* não convencional em que um pequeno íntron de 26 nucleotídeos é removido do mRNA que codifica o fator de transcrição XBP1. Esse *splicing* altera a fase de leitura do mRNA, resultando na produção de uma isoforma funcional e estável de XBP1 (XBP1s), que é translocada para o núcleo (CALFON *et al.*, 2002). Lá, XBP1s atua como um regulador da expressão de genes envolvidos no enovelamento, no transporte e na degradação de proteínas, além de participar de processos relacionados à biogênese de organelas como o ER. Essa via é crucial para o aumento da capacidade do ER em momentos de sobrecarga, e seu papel é amplamente associado a adaptação e sobrevivência celular ao estresse do ER (LEE, A.-H.; IWAKOSHI; GLIMCHER, 2003).

## 1.2. ATF6

ATF6 (ou ATF6 $\alpha$ ) é uma proteína transmembrana do tipo II que possui um domínio citosólico contendo um fator de transcrição do tipo zíper de leucina. Sob condições de estresse do ER, ATF6 é transportada para o complexo de Golgi, onde é clivada sequencialmente pelas proteases S1P e S2P. Isso resulta na liberação de um fragmento solúvel que se transloca para o núcleo para atuar como fator de transcrição ativo (ATF6f) (HAZE *et al.*, 1999). ATF6f induz a transcrição de genes envolvidos na restauração da homeostase do ER. Entre seus principais alvos estão genes codificadores de chaperonas e outros componentes do ER envolvidos no processamento e na degradação de proteínas, promovendo o aumento da capacidade de enovelamento do ER e o alívio do estresse (WU *et al.*, 2007). O próprio gene que codifica XBP1 é um importante alvo de ATF6f, o que evidencia a integração entre essas duas vias da UPR. Embora as vias de IRE1-XBP1 e ATF6 possam atuar de maneira independente, elas compartilham muitos genes-alvo e frequentemente convergem em programas de expressão gênica sobrepostos. Há,

inclusive, indícios de que esses dois fatores podem formar heterodímeros, aumentando a complexidade das respostas celulares ao estresse do ER (SHOULDERS *et al.*, 2013; YAMAMOTO *et al.*, 2007).



**Figura 1. As principais vias da UPR iniciadas a partir do ER.** Ilustração das vias de sinalização da UPR com funções adaptativas. Adaptado de: HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020.

### 1.3. UPR no Câncer

No microambiente tumoral, as células malignas estão sob constante pressão de fatores que promovem o acúmulo de proteínas mal enoveladas no ER. Hipóxia, falta de nutrientes, estresse oxidativo e alterações no pH são condições frequentes nos tumores sólidos. Ademais desses fatores extrínsecos à célula, a ativação de oncogenes e a perda de genes supressores tumorais, além da alta demanda metabólica e taxa proliferativa dessas células, intensificam a síntese proteica, elevando a demanda por enovelamento proteico no ER. A combinação desses fatores gera um quadro de estresse do ER crônico, no qual as células tumorais ativam a UPR para se adaptar às condições adversas (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; ZHANG *et al.*, 2024).

Em diversos tipos de câncer, incluindo gliomas e carcinomas de mama, de pulmão, de fígado e colorretal, a UPR foi encontrada altamente ativa (MADDEN *et al.*, 2019). Estudos demonstram que a UPR contribui para processos essenciais na progressão tumoral, como angiogênese, metástase e resistência a terapia (CHEN; CUBILLOS-RUIZ, 2021; ZHANG *et al.*, 2024). Chaperonas do ER, como GRP78 e GRP94, que desempenham papel central no enovelamento proteico e cujos genes são alvos das vias da UPR, têm sua expressão elevada em uma ampla gama de tumores (MADDEN *et al.*, 2019). A ativação constitutiva das vias da UPR com funções citoprotetoras promove o aumento da capacidade de enovelamento proteico do ER nas células tumorais e promove a adaptação da via secretora às condições estressantes. Como essas células regulam a UPR de modo a favorecer as funções citoprotetoras e evitar os mecanismos pró-apoptóticos ainda é pouco compreendido.

Diante dessas funções pró-tumorais da UPR, estratégias terapêuticas têm sido investigadas para explorar esse mecanismo no tratamento do câncer. Abordagens como aumentar o estresse do ER de modo a induzir a apoptose ou inibir componentes-chave das vias da UPR para impedir suas funções citoprotetoras vêm sendo propostas (ALMANZA *et al.*, 2019; MARKOULI *et al.*, 2020). Moléculas que modulam a UPR estão sendo testadas em diversos tipos de câncer. Inibidores de PERK e IRE1, como GSK2656157 e MKC-3946, já demonstraram efeitos promissores em modelos pré-clínicos (ATKINS *et al.*, 2013; MIMURA *et al.*, 2012), e o inibidor do sítio de RNase da IRE1 MKC-8866 está em ensaio clínico para tumores sólidos em estágio avançado (RIMAWI *et al.*, 2023). No entanto, a modulação da UPR enfrenta desafios, e é ainda limitada pela falta de conhecimento dos mecanismos e das funções da UPR no contexto do câncer (MARKOULI *et al.*, 2020).

## **2. Senescência Celular**

A senescência celular é um estado de parada permanente e irreversível do ciclo celular que ocorre em resposta a situações de estresse, sejam causadas por estímulos intrínsecos ou extrínsecos. Esse processo celular foi documentado pela

primeira vez em 1961, quando foi observado que os fibroblastos humanos têm capacidade proliferativa finita *in vitro* (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961). Mais tarde, foi descoberto que as células paravam de se proliferar em cultura porque entravam em senescência replicativa (RS, do inglês *replicative senescence*) devido ao encurtamento dos telômeros (HARLEY; FUTCHER; GREIDER, 1990). Atualmente, diversos outros estímulos que são capazes de induzir senescência já foram descritos. A senescência independente do encurtamento dos telômeros é conjuntamente chamada de senescência induzida ou prematura, e pode ser induzida por dano ao DNA, ativação de oncogenes, perda de supressores tumorais, estresse oxidativo, entre outros (KUILMAN *et al.*, 2010) (Figura 2a).

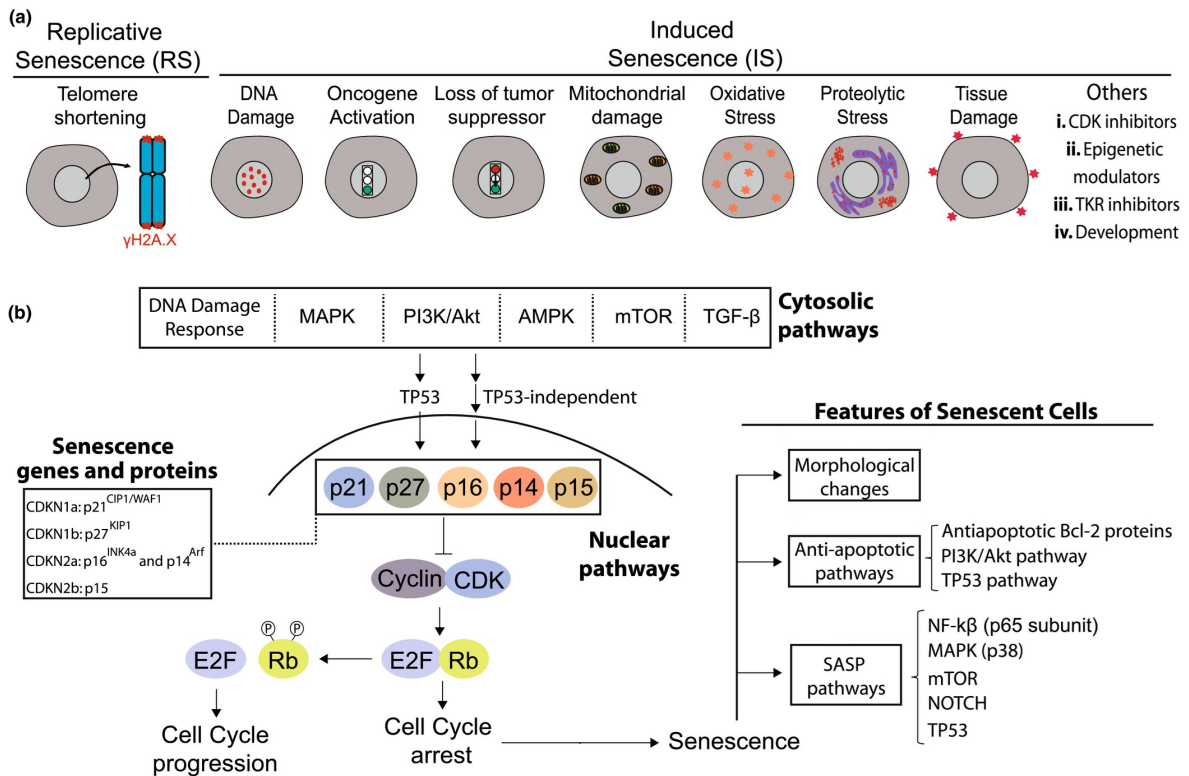
O fenótipo senescente é caracterizado por modificações moleculares, metabólicas e morfológicas (HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018) (Figura 2b). A principal característica das células senescentes é a parada no ciclo celular, que é causada pelas proteínas inibidoras de CDKs, especialmente p16, p15 e p21, frequentemente utilizadas como marcadores de senescência. Além disso, a ativação das vias de resposta a dano ao DNA é comumente observada em células senescentes, visto que danos no DNA levam à senescência quando não resolvidos, através da ativação de p53. Outra modificação molecular importante é o aumento dos níveis de vários fatores anti-apoptóticos, como os membros da família BCL-2, especificamente BCL-XL e BCL-W, o que torna essas células resistentes à morte celular por apoptose (YOSEF *et al.*, 2016).

Apesar de terem perdido a capacidade de proliferar, as células senescentes se mantêm metabolicamente ativas e secretam uma grande quantidade de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, proteinases, entre outras moléculas, para o meio extracelular. Esse programa secretório das células senescentes é chamado de fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês *senescence-associated secretory phenotype*) (COPPÉ *et al.*, 2010). Diversos trabalhos já demonstraram o papel essencial de SASP na atividade fisiológica e patológica das células senescentes, sendo implicado tanto positivamente quanto negativamente em diversos processos biológicos, como cicatrização e câncer (COPPÉ *et al.*, 2008, 2010; DEMARIA *et al.*, 2014). Porém, o SASP tem se mostrado muito heterogêneo

e específico para cada programa de senescência dependendo do tipo celular e do estímulo indutor (HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2017).

Como consequência de todas essas alterações moleculares e metabólicas, as células senescentes apresentam drásticas mudanças morfológicas, que são amplamente utilizadas para identificação de senescência sobretudo em estudos *in vitro* (HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018). A principal mudança observada nas células senescentes em cultura é o aumento do corpo celular acompanhado por uma morfologia mais irregular e achatada. Essas modificações morfológicas se devem principalmente a alterações na composição, estrutura e funcionamento do citoesqueleto, majoritariamente dos filamentos de vimentina (NISHIO; INOUE, 2005). Além disso, o aumento do tamanho e da irregularidade nuclear também são características notáveis das células senescentes (BELHADJ *et al.*, 2023; HECKENBACH *et al.*, 2022). A perda de lamin-B1, uma proteína filamentosa intranuclear essencial para a estrutura e função nuclear através da ancoragem da cromatina, gera uma desestabilização da integridade nuclear, além de uma reorganização global da cromatina (SADAIE *et al.*, 2013). Além do núcleo, várias organelas e componentes celulares sofrem alterações significativas durante o processo de senescência, incluindo a membrana plasmática, as mitocôndrias e o ER (BITENCOURT *et al.*, 2024). O aumento do conteúdo lisossômico é uma característica extensivamente utilizada como marcador de senescência através da atividade da enzima lisossomal  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal) (LEE, B. Y. *et al.*, 2006).

As células senescentes podem desempenhar tanto funções benéficas quanto prejudiciais na fisiologia e patologia humana (MUÑOZ-ESPÍN; SERRANO, 2014). Por um lado, elas promovem remodelação dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário e após lesões na vida adulta (ANTELO-IGLESIAS *et al.*, 2021). Além disso, a senescência é considerada um importante mecanismo de supressão tumoral, uma vez que impede a proliferação de células estressadas potencialmente malignas. Por outro lado, o acúmulo de células senescentes nos tecidos está associado ao declínio das capacidades regenerativas durante o envelhecimento e à progressão de doenças relacionadas à idade, incluindo câncer (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2023).



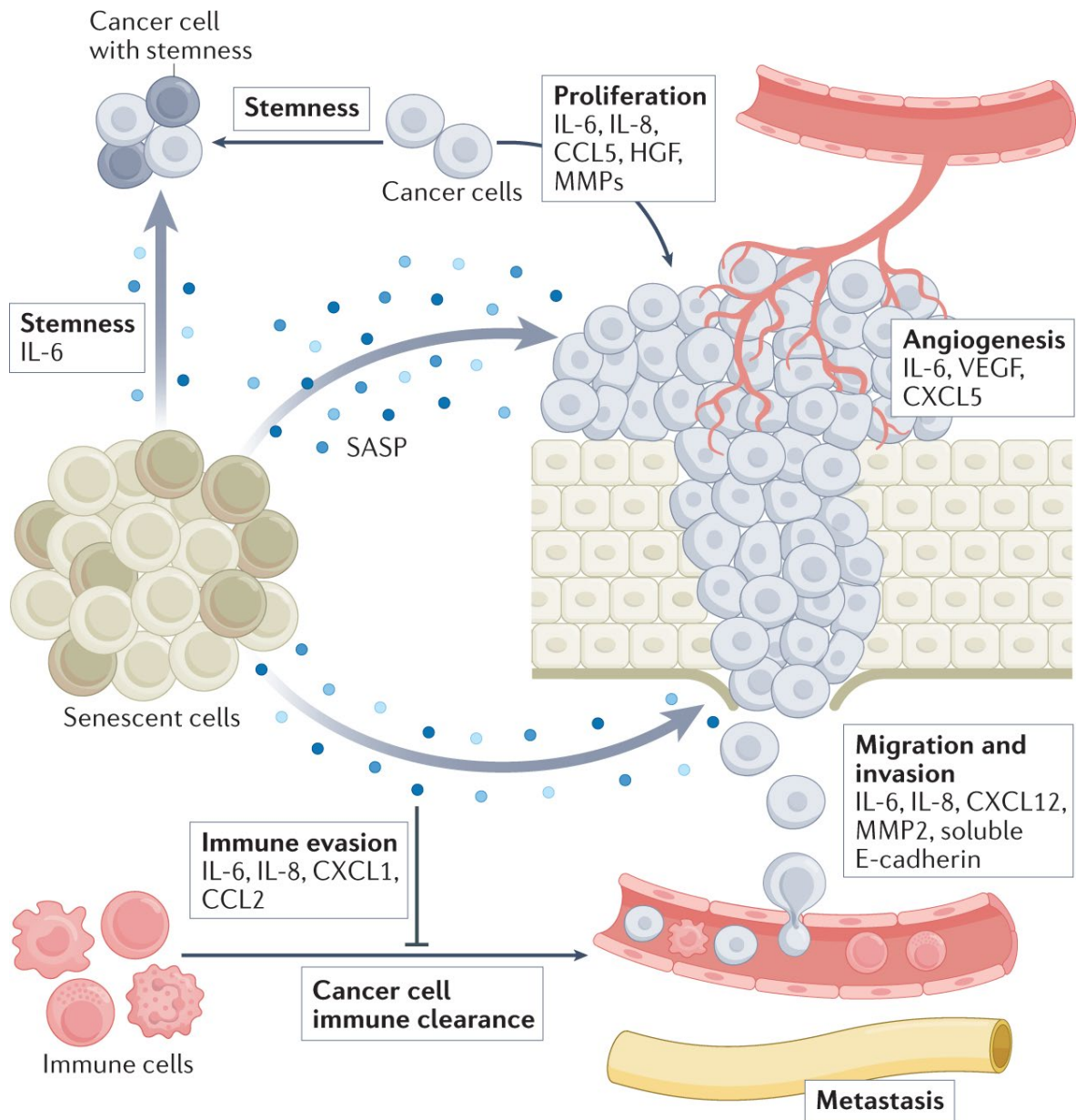
**Figura 2. Visão geral da senescência celular.** (a) Principais indutores de senescência, incluindo senescência replicativa e induzida (prematura). (b) Topo e centro – vias citosólicas e nucleares que levam à parada do ciclo celular. À esquerda, é mostrada uma caixa com os genes e proteínas que promovem a senescência. As principais características das células senescentes são mostradas à direita. Adaptado de: BITENCOURT et al., 2024.

## 2.1. Senescência no Câncer

Por estarem em um estado de parada estável do ciclo celular, as células senescentes funcionam como um mecanismo endógeno de supressão tumoral (SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022). Especificamente, a senescência induzida por oncogene (OIS, do inglês *oncogene-induced senescence*) possui uma importante função protetora contra a tumorigênese ao impedir a proliferação de células pré-malignas (BRAIG *et al.*, 2005; MICHALOGLOU *et al.*, 2005). O papel supressor tumoral da OIS também ocorre por mecanismos extrínsecos à célula. As células senescentes promovem a indução de senescência parácrina em células cancerígenas vizinhas através da secreção de fatores do SASP (ACOSTA *et al.*, 2013). Além disso, a OIS pode atuar modulando o sistema imunológico e

promovendo a imunidade antitumoral. Os efeitos imunogênicos de SASP foram observados tanto na remoção de células senescentes pré-malignas quanto no contexto de células tumorais que entram em senescência induzida por terapia (TIS, do inglês *therapy-induced senescence*) (GOEL *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2011).

Diversas intervenções terapêuticas antitumorais comumente utilizadas na clínica têm se mostrado potentes indutores de senescência em células e tecidos tumorais ou normais. Essas intervenções incluem diversos quimioterápicos que causam danos ao DNA, como agentes alquilantes e inibidores de topoisomerase, além de radioterapia e inibidores de CDKs (WANG, B.; KOHLI; DEMARIA, 2020). Apesar dos efeitos supressores tumorais da senescência, nos últimos anos o SASP vêm sendo reportado como um importante mecanismo pró-tumoral, especialmente no contexto da TIS (Figura 3) (SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022; WANG, B.; KOHLI; DEMARIA, 2020). Fatores inflamatórios do SASP, como IL-6 e IL-8, promovem vários aspectos da progressão tumoral, como a proliferação, a migração e a invasão de células cancerígenas (COPPÉ *et al.*, 2008; KRTOLICA *et al.*, 2001). Além disso, o SASP modula o microambiente tumoral, induzindo angiogênese bem como inibindo a imunidade antitumoral (ANCRILE; LIM; COUNTER, 2007; EGGERT *et al.*, 2016). Por fim, fatores do SASP foram associados com a indução da transição epitelial-mesenquimal e com uma maior capacidade metastática (COPPÉ *et al.*, 2008).



**Figura 3. Efeitos pró-tumorais da senescência celular.** Os fatores do SASP promovem proliferação, migração, invasão e metástase do tumor. Além disso, podem modular o microambiente tumoral, promovendo angiogênese e inibindo a imunidade antitumoral. Fonte: SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022.

Dados os diversos trabalhos apontando as funções pró-tumorais da TIS, abordagens terapêuticas que têm como alvo as células senescentes vêm sendo propostas, especialmente em combinação com agentes quimioterápicos já utilizados (WANG, B.; KOHLI; DEMARIA, 2020). A senoterapia pode se referir tanto à eliminação seletiva de células senescentes (agentes senolíticos) quanto à modulação da produção e secreção de fatores do SASP (agentes senomórficos).

Os fármacos senolíticos têm como principal alvo as vias antiapoptóticas que são reguladas positivamente nas células senescentes e que garantem uma maior resistência à apoptose. A droga navitoclax (ou ABT-263), um inibidor da família BCL-2, elimina seletivamente células senescentes *in vitro* e *in vivo* (CHANG *et al.*, 2016). O uso do navitoclax após a exposição aos quimioterápicos doxorrubicina ou etoposídeo promoveu regressão tumoral em um modelo de xenoenxerto em camundongo (SALEH *et al.*, 2020). Essa e outras drogas senolíticas estão sendo atualmente investigadas para diferentes tipos de câncer, além de outras doenças relacionadas à idade (SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022).

Considerando que a maioria das funções pró-tumorais das células senescentes parecem estar associadas com o SASP, os medicamentos senomórficos estão sendo considerados como alternativas aos senolíticos, de forma a preservar funções benéficas das células senescentes (SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022). A sinalização mediada pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B tem se mostrado uma importante reguladora dos fatores inflamatórios do SASP. Dessa forma, fármacos que previnem a ativação dessas vias inflamatórias, como a metformina e a rapamicina, estão sendo investigados como meios de reduzir o SASP pró-inflamatório e diminuir os efeitos pró-tumorais da senescência (LABERGE *et al.*, 2015; MOISEEVA *et al.*, 2013).

## **2.2. Senescência e UPR**

Como previamente mencionado, a senescência é um estado celular complexo que pode ser induzido por diferentes estímulos estressantes, no qual várias alterações moleculares, metabólicas e morfológicas ocorrem. Uma das principais características funcionais das células senescentes é o SASP, que vêm sendo associado extensivamente com efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais da senescência no organismo. Considerando que o ER desempenha um papel fundamental na síntese e no processamento do secretoma, era esperado que essa organela sofresse modificações durante o processo de senescência. De fato, células senescentes induzidas por diferentes estímulos apresentam alterações estruturais do ER. Fibroblastos em RS e melanócitos em OIS possuem ER

aumentado, enquanto células de linfoma submetidas à TIS apresentaram desorganização e dilatação das cisternas do retículo rugoso (DENOYELLE *et al.*, 2006; DÖRR *et al.*, 2013; DRUELLE *et al.*, 2016).

Tendo em vista essas alterações estruturais do ER e a natureza hipersecretória do SASP, parece provável que o ER ative sua rede de sinalização de resposta a estresse, a UPR. A ativação das vias da UPR já foi observada em diferentes modelos de senescência (ABBADIE; PLUQUET, 2020). Fibroblastos e queratinócitos durante RS e melanócitos submetidos à OIS têm níveis aumentados de chaperonas do ER que são alvos transcricionais clássicos da UPR, como BiP (DENOYELLE *et al.*, 2006; DRUELLE *et al.*, 2016; DRULLION *et al.*, 2018; MATOS; GOUVEIA; ALMEIDA, 2015). Além disso, há uma ativação das três vias da UPR durante RS em fibroblastos dérmicos (DRUELLE *et al.*, 2016; MATOS; GOUVEIA; ALMEIDA, 2015). Outros estudos com modelos celulares de senescência diferentes avaliaram apenas algumas vias da UPR. Por exemplo, melanócitos em OIS, queratinócitos em RS e células de linfoma em TIS ativaram a via PERK e IRE1, mas a via da ATF6 não foi avaliada diretamente (DENOYELLE *et al.*, 2006; DÖRR *et al.*, 2013; DRULLION *et al.*, 2018). Enquanto isso, fibroblastos senescentes induzidos por estresse oxidativo apresentaram ativação da via PERK, mas não ativaram as vias IRE1 e ATF6, sugerindo uma especificidade no envolvimento das vias da UPR dependendo do indutor de senescência e possivelmente do tipo celular (MATOS; GOUVEIA; ALMEIDA, 2015).

Esses poucos trabalhos demonstram que a UPR é ativada durante diferentes tipos de senescência e indicam que essas vias de sinalização podem ser um mecanismo importante que contribui para o fenótipo senescente. Contudo, se e como a UPR atua no estabelecimento ou na manutenção das propriedades das células senescentes ainda não é totalmente compreendido. Os indutores de estresse do ER tapsigargina, tunicamicina e DTT induziram senescência prematura, avaliada pelo marcador de senescência SA- $\beta$ -gal, em fibroblastos (CORMENIER *et al.*, 2018; DRUELLE *et al.*, 2016). A abordagem inversa de modular os efetores das vias da UPR em células induzidas à senescência forneceram resultados mais complexos, que sugerem funções bastante diferentes para cada via.

A ativação de ATF6 parece ser um mecanismo importante para as modificações morfológicas e metabólicas do ER e da célula como um todo durante a senescência. Em fibroblastos em RS, a expansão do ER, o aumento no tamanho celular, e a secreção do fator pró-inflamatório e marcador clássico do SASP IL-6 foram parcialmente prevenidos pelo silenciamento de ATF6 (CORMENIER *et al.*, 2018; DRUELLE *et al.*, 2016). Além disso, a superexpressão de ATF6 resultou em um aumento da atividade de SA- $\beta$ -gal (DRUELLE *et al.*, 2016). Já em queratinócitos, o silenciamento de ATF6 retardou a entrada em senescência. (DRULLION *et al.*, 2018). Em células de câncer de mama submetidas à OIS, o silenciamento de ATF6 preveniu o aparecimento de marcadores de senescência, como atividade de SA- $\beta$ -gal, parada na proliferação, e aumento na expressão de p21, enquanto sua superexpressão foi capaz de induzir esses marcadores em células não senescentes (KIM *et al.*, 2019). A superexpressão de um mutante de ATF6 incapaz de se ligar ao DNA demonstrou que sua atividade transcricional é importante para a indução de senescência.

Por outro lado, embora o *splicing* de XBP1 esteja aumentado em vários modelos de senescência, a via IRE1-XBP1 vem sendo associada a um retardo na entrada em senescência. O bloqueio do *splicing* de XBP1 usando abordagens farmacológicas, genéticas ou de silenciamento promoveu parada na proliferação e acelerou a entrada em senescência de queratinócitos submetidos à OIS (BLAZANIN *et al.*, 2017). Curiosamente, esse estudo mostrou que o *splicing* de XBP1 é importante para a proliferação logo após a ativação do oncogene, enquanto a entrada em senescência requer a ativação de RIDD. Além disso, o *knockout* de IRE1 no cérebro de camundongos causou o aparecimento precoce de células senescentes e acelerou o declínio cognitivo relacionado à idade (CABRAL-MIRANDA *et al.*, 2022). A superexpressão da forma ativa de XBP1 foi capaz de restaurar a função cognitiva dos animais, além de reduzir a senescência celular no cérebro.

Esses trabalhos suportam a ideia de que as vias de sinalização da UPR, especialmente ATF6 e IRE1-XBP1, são importantes mecanismos associados às características das células senescentes, embora pareçam ter efeitos bastante diferentes entre si. Dessa forma, a modulação farmacológica de componentes da

UPR poderia atuar como métodos senolíticos ou senomórficos, de modo a inibir os aspectos deletérios da senescência. É evidente que investigações mais aprofundadas em diferentes modelos de senescência *in vitro* e *in vivo* ainda são necessárias para entendermos melhor o envolvimento das vias da UPR na senescência celular e o potencial terapêutico da modulação de seus componentes. Além disso, ainda não é claro se a ativação das vias da UPR é uma causa ou consequência do processo de senescência, embora possivelmente ambas as situações sejam verdadeiras (ABBADIE; PLUQUET, 2020). Portanto, determinar a dinâmica temporal desses eventos também será importante para esclarecer a relação causa-efeito entre a UPR e a senescência.

### **3. Glioblastoma Multiforme**

O glioblastoma multiforme (GBM) é um glioma de grau IV, sendo classificado como um astrocitoma, por ter sua origem a partir das células da glia chamadas astrócitos. É o tumor do sistema nervoso central mais prevalente e maligno, representando aproximadamente 15% de todos os tumores do sistema nervoso central e cerca de 45% dos tumores cerebrais malignos primários (OSTROM *et al.*, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). O tratamento padrão para GBM é a ressecção cirúrgica máxima segura, seguida por terapia adjuvante, que normalmente consiste em radioterapia e quimioterapia concomitante (STUPP, ROGER *et al.*, 2005). No entanto, devido à natureza agressiva do tumor e a sua infiltração e invasão difusa no cérebro, a remoção cirúrgica completa é extremamente desafiadora (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Somado a isso, o GBM é notoriamente resistente às terapias convencionais, o que resulta em uma alta taxa de recidiva tumoral (SINGH *et al.*, 2020). Apesar de extensivos esforços de pesquisa para um melhor entendimento e uma otimização terapêutica desse tipo tumoral, a doença ainda apresenta um curso clínico severo, com uma progressão rápida e uma sobrevida média de apenas 15 meses após o diagnóstico (STUPP, ROGER *et al.*, 2005). Atualmente, apenas cerca de 18% dos pacientes com GBM sobrevivem por mais de dois anos (POON *et al.*, 2020). Dado esse prognóstico, há uma necessidade urgente de aprofundar o conhecimento sobre os

mecanismos moleculares que conduzem o desenvolvimento do GBM e sua resistência aos tratamentos atualmente disponíveis.

### 3.1. Temozolomida

A temozolomida (TMZ), conhecida pelos nomes comerciais Temodar ou Temodal, tem sido amplamente empregada como o tratamento quimioterápico padrão para GBM (SINGH *et al.*, 2020). A adição do tratamento com TMZ concomitante à radiação levou a um aumento de 2 meses na sobrevida global média dos pacientes com GBM, sendo a melhoria mais significativa alcançada por um novo medicamento quimioterápico para esse câncer (STUPP, R. *et al.*, 2014). A TMZ pertence a uma classe de agentes alquilantes, como um derivado da imidazotetrazina, que é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica e, portanto, pode ser administrado por via oral. Esse fármaco é ativado no pH fisiológico através da sua conversão em 5-(3-metiltriazeno-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC). O MTIC é hidrolisado em íons de metildiazo, que são capazes de causar dano no DNA ao transferir seu grupo metil às purinas, o que induz o mal pareamento de bases. O principal aduto de DNA tóxico e mutagênico induzido por TMZ é a O6-metilguanina. As quebras de DNA de fita simples e dupla geradas por esses adutos causam parada do ciclo celular em G2/M e eventualmente resultam em apoptose ou senescência (LEE, S. Y., 2016; SINGH *et al.*, 2020; STUPP, R. *et al.*, 2014).

Apesar de representar um grande avanço no tratamento do GBM, a resistência à TMZ é extremamente comum e mais de 50% dos pacientes não respondem à terapia (LEE, S. Y., 2016). O status de metilação do promotor do gene O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) é considerado o fator mais importante para a resistência à TMZ, devido ao seu papel direto na neutralização do dano ao DNA causado pelo agente alquilante (FELDHEIM *et al.*, 2019). A MGMT é uma enzima endógena de reparo de DNA que é capaz de remover o grupo metil em O6-metilguanina e reparar as lesões induzidas pela TMZ. Portanto, a expressão de MGMT, que é determinada pelo status de metilação da região promotora do gene, é fundamental na resposta ao tratamento. Apesar desse importante marcador preditivo para a resposta à TMZ, a resistência à quimioterapia continua sendo um

obstáculo clinicamente significativo. Isso se torna ainda mais complexo ao considerarmos que a resistência pode ser uma característica inerente do tumor ou adquirida após a exposição ao fármaco (SINGH *et al.*, 2020). Assim, uma compreensão aprofundada tanto dos mecanismos moleculares que contribuem para o desenvolvimento de resistência quanto das populações celulares que impulsionam esse processo é de extrema importância.

### **3.2. UPR em Modelos de Glioblastoma**

De acordo com a hipótese de que a UPR possui uma função protetora contra os estímulos estressores intrínsecos das células tumorais e o microambiente tumoral hostil, diversos estudos relataram um aumento na atividade da UPR em modelos de GBM. Linhagens celulares de GBM, xenoenxertos em animais e amostras de pacientes apresentam níveis transcricionais e proteicos aumentados de chaperonas do ER, como BiP, GRP94 e PDIA1, cujas expressões elevadas foram correlacionadas com um pior prognóstico em pacientes (EPPLÉ *et al.*, 2013; FATHALLAH-SHAYKH, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2024; PYRKO *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2019). Além disso, as três vias da UPR foram encontradas altamente ativas em amostras de pacientes, e os níveis de seus efetores e alvos foram associados com o grau do tumor (DOWDELL *et al.*, 2023; EPPLÉ *et al.*, 2013; HOU *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2024). Os fatores de transcrição da UPR ATF4, XBP1 e ATF6 vêm sendo propostos como fatores importantes para a reprogramação da expressão gênica durante a progressão tumoral, contribuindo para a agressividade do tumor (PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016). Por exemplo, a via IRE1 possui um papel na angiogênese, na invasão das células tumorais e na infiltração de células imunes no GBM (AUF *et al.*, 2010; DROGAT *et al.*, 2007; LHOMOND *et al.*, 2018).

Como mencionado anteriormente, o GBM é particularmente conhecido por ser altamente resistente às terapias convencionais. Nesse contexto, vários estudos vêm propondo um papel importante da UPR em mediar a resistência em GBM, e a modulação de componentes da UPR tem mostrado potencial como uma abordagem complementar às terapias existentes (PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT,

2016; SIMBILYABO *et al.*, 2024). Em linhagens de GBM, o silenciamento de BiP sensibilizou as células à TMZ, enquanto sua superexpressão conferiu uma maior resistência (PYRKO *et al.*, 2007). De maneira similar, o silenciamento da proteína dissulfeto-isomerase PDIA1 foi capaz de sensibilizar populações de células de GBM resistentes à TMZ *in vitro* e *in vivo* e sua inibição farmacológica teve um efeito sinérgico com TMZ (SUN *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2019). A inibição farmacológica do domínio de endonuclease de IRE1 também potencializou o efeito citotóxico da TMZ em células de GBM (DOWDELL *et al.*, 2023). O papel da UPR na resposta à TMZ e a outros agentes que causam danos ao DNA parece estar associado a proteínas das vias de reparo do DNA, sugerindo uma interação dessas vias nesse contexto (LIU *et al.*, 2019; MILANO *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2019).

Esses trabalhos indicam que a UPR está altamente ativa nas células de GBM e propõem que suas vias de sinalização funcionam como um mecanismo de resistência à TMZ. No entanto, pouco se sabe sobre a ativação das vias UPR após a exposição à TMZ. A expressão de BiP e PDIA1 aumentou após o tratamento em células de GBM e amostras de pacientes, sugerindo um aumento da atividade das vias da UPR em resposta à TMZ (HE *et al.*, 2018; LAN *et al.*, 2024; PYRKO *et al.*, 2007; SUN; KIANG; LEUNG, 2022). Porém, a dinâmica de ativação dessas vias e como elas são reguladas ainda precisa ser caracterizado. Essa caracterização será especialmente interessante em modelos que utilizem doses clinicamente relevantes e que permitam um acompanhamento, tanto de populações celulares quanto células individuais, por períodos mais longos após o tratamento, quando é possível observar a indução de senescência celular.

### **3.3. Senescência em Modelos de Glioblastoma**

A senescência celular em GBM é um processo complexo que pode ser induzido por envelhecimento, radiação ionizante, ativação de oncogenes e pelas estratégias terapêuticas de radioterapia e quimioterapia baseada em TMZ, que atuam gerando danos ao DNA. As células malignas de GBM empregam vários mecanismos para contornar ou escapar da senescência celular e permanecer em estado proliferativo. Porém, especialmente no contexto da TIS, apesar de

constituírem uma barreira inicial para a progressão tumoral, as células senescentes permanecem viáveis e adquirem resistência à apoptose, além de secretarem uma alta quantidade de fatores pró-inflamatórios através do SASP. Dessa forma, paradoxalmente, a senescência em GBM desempenha um papel na resistência à terapia e na progressão tumoral, favorecendo a recorrência do tumor (CHOJAK *et al.*, 2023).

As lesões de DNA causadas pelo tratamento com TMZ resultam em quebras de fita dupla do DNA e desencadeiam respostas a danos no DNA. Embora o tratamento com TMZ induza morte celular por apoptose, o principal desfecho observado após o tratamento é a entrada em senescência celular, que ocorre em mais de 80% da população celular *in vitro* (BELTZIG *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2016). Foi observado que tumores recorrentes contêm uma proporção maior de células senescentes do que o GBM primário, indicando que o tratamento terapêutico em GBM resulta no acúmulo de células senescentes no tumor, levando a mudanças significativas no microambiente tumoral (BELTZIG *et al.*, 2022).

A expressão elevada de uma assinatura transcricional de senescência foi capaz de predizer um pior prognóstico em pacientes com GBM (SALAM *et al.*, 2023). Embora constituam menos de 10% do tumor, a remoção das células malignas positivas para a expressão do marcador de senescência p16 aumentou a sobrevivência de camundongos com GBM (SALAM *et al.*, 2023). A eliminação das células senescentes impactou não apenas as células malignas restantes como também a abundância e atividade de células imunes associadas ao tumor. Além de induzir as células malignas à senescência, o tratamento, em especial a radiação ionizante, causa senescência generalizada no cérebro, incluindo células normais (CHOJAK *et al.*, 2023). Isso também foi apontado como um mecanismo para a recorrência em GBM. A pré-irradiação de cérebros de camundongos aumentou a proliferação e invasão de células de GBM implantadas, e o tratamento com o senolítico ABT-263 atenuou esse efeito (FLETCHER-SANANIKONE *et al.*, 2021).

Considerando o impacto negativo do acúmulo de células senescentes induzidas pela terapia e sua contribuição para a recorrência tumoral, abordagens terapêuticas chamadas de “*one-two punch*” podem ser benéficas para GBM. Essa abordagem consiste na combinação sequencial de uma terapia indutora de

senescência, como TMZ e irradiação, seguida pela eliminação das células senescentes por senolíticos, como o ABT-263, prevenindo o acúmulo de células senescentes persistentes prejudiciais (CHOJAK *et al.*, 2023). Apesar dos avanços recentes, ainda são necessárias mais investigações para o melhor entendimento dos mecanismos por trás da indução e manutenção da TIS em GBM e das suas funções pró-tumorais.

#### **4. Análises de Células Únicas e Dinâmica Fenotípica**

Nas últimas décadas, as tecnologias de sequenciamento de células únicas se tornaram ferramentas poderosas para estudar a heterogeneidade inter e intratumoral. Dentre essas metodologias, o sequenciamento de RNA de célula única se destaca por permitir o estudo da expressão gênica do tumor a nível de células individuais, possibilitando a descoberta de tipos celulares raros e diferentes estados celulares nos tumores (PATEL *et al.*, 2014; TIROSH *et al.*, 2016). Além de possibilitar um melhor entendimento da biologia tumoral no geral, a análise dos perfis transcricionais de células únicas do mesmo tumor é sobretudo útil no contexto da resistência à terapia, visto que permite a identificação de subpopulações resistentes e conseqüentemente pode facilitar a otimização de estratégias terapêuticas. No entanto, essas tecnologias não são capazes de acompanhar o perfil de uma mesma célula ao longo do tempo e, portanto, não conseguem capturar de forma adequada funções celulares complexas e processos biológicos dinâmicos.

Nesse contexto, o imageamento e a análise de células únicas vivas permite a visualização de processos celulares dinâmicos enquanto a viabilidade e a função celular são mantidas. Isso pode ser obtido por meio da microscopia de campo claro, mas é comumente realizado utilizando microscopia de fluorescência, na qual o uso de sondas ou proteínas fluorescentes permite a identificação de componentes celulares específicos. Diversos repórteres fluorescentes e biossensores vêm sendo utilizados para o monitoramento de moléculas ou estruturas específicas dentro das células vivas ao longo do tempo, possibilitando a análise de mudanças dinâmicas em vias de sinalização ou processos intracelulares, que são de extrema importância

tanto para o desenvolvimento e progressão tumoral quanto para a resposta e resistência ao tratamento (ALIEVA *et al.*, 2023; BEGNINI *et al.*, 2022).

Dessa forma, essas abordagens são relevantes para elucidar fenômenos celulares dinâmicos e que ocorrem a nível de células únicas, e que muitas vezes não conseguem ser distinguidos em análises pontuais a nível populacional. Por exemplo, utilizando um biossensor fluorescente da via de sinalização MAPK-ERK em células vivas de câncer colorretal, um estudo desvendou o mecanismo por trás da eficácia de uma combinação terapêutica (PONSIOEN *et al.*, 2021). Outro trabalho foi capaz de rastrear células individuais vivas em xenotransplantes através de um repórter fluorescente e identificou uma população de células tumorais dormentes que resistem à quimioterapia (OHTA *et al.*, 2022). Em um trabalho prévio do nosso grupo, dados populacionais indicaram que os processos celulares de autofagia e senescência estavam correlacionados negativamente em resposta ao tratamento quimioterápico TMZ. Contudo, essa correlação não existia em células individuais, nas quais esses processos eram ativados de uma forma heterogênea (FILIPPI-CHIELA, EDUARDO CREMONESE *et al.*, 2015). Isso destaca a importância dessas metodologias e do cuidado necessário ao tentarmos chegar a conclusões sobre fenômenos celulares dinâmicos e heterogêneos somente através de análises populacionais.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Investigar a relação entre a resposta a proteínas mal enoveladas e a senescência celular em células de glioblastoma tratadas com o quimioterápico temozolomida.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Construir e validar linhagens celulares de glioblastoma que expressem estavelmente repórteres para monitorar a ativação das vias da UPR IRE1-XBP1 e ATF6.
- II. Avaliar a dinâmica de ativação das vias IRE1-XBP1 e ATF6 em resposta ao tratamento com temozolomida.
- III. Investigar a ativação das vias IRE-XBP1 e ATF6 em células senescentes induzidas pelo tratamento com temozolomida.
- IV. Avaliar a dinâmica de ativação das vias da UPR e de marcadores de senescência a nível de célula única.
- V. Caracterizar os efeitos da superexpressão de ATF6 na indução de senescência em linhagens de glioblastoma tratadas ou não com temozolomida.

## APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O manuscrito intitulado “*Unfolded protein response pathways are differentially activated in temozolomide-induced senescent glioblastoma cells*” foi resultado do trabalho desenvolvido durante o período do curso de Mestrado, e foi formatado conforme as normas de publicação requeridas pelo periódico *Experimental Cell Research*. A discussão geral do trabalho será feita com base nos resultados apresentados no manuscrito, complementados pelos dados contidos nos APÊNDICES A e B.

Nesse manuscrito, investigamos a ativação das vias IRE1-XBP1 e ATF6 em resposta ao tratamento com TMZ em glioblastoma, focando na sua relevância na senescência induzida pela terapia. Os experimentos, a análise de dados e a redação do manuscrito foram realizados por mim, sob supervisão dos orientadores Guido Lenz e Eduardo Chiela. As coautoras deste trabalho, Camila Cassel e Luiza Pereira, tiveram participação na produção de dados experimentais e, principalmente, na análise de imagens.

**Unfolded protein response pathways are differentially activated in  
temozolomide-induced senescent glioblastoma cells**

Fernanda Dittrich Oliveira<sup>1,2</sup>, Camila Bünecker Cassel<sup>1,2</sup>, Luiza Cherobini Pereira<sup>1,2</sup>,  
Eduardo Cremonese Filippi-Chiela<sup>2,3,4\*</sup>, Guido Lenz<sup>1,2\*</sup>

1 Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

3 Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

4 Serviço de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto  
Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding authors: [eduardochiela@gmail.com](mailto:eduardochiela@gmail.com) and [lenz@ufrgs.br](mailto:lenz@ufrgs.br)

## **Abstract**

An imbalance between the protein load entering the endoplasmic reticulum (ER) and its protein folding capacity results in ER stress, triggering the unfolded protein response (UPR). Tumor cells exploit the cytoprotective branches of the UPR for survival. Cellular senescence is a state of permanent cell cycle arrest that contributes to tumor progression and therapy resistance by altering the cellular microenvironment. Senescent cells experience ER stress, but little is known about the activation dynamics and regulation of UPR pathways in therapy-induced senescence. Using live single-cell imaging, we monitored the dynamics of two key UPR pathways, IRE1-XBP1 and ATF6, in glioblastoma cell lines treated with temozolomide (TMZ), the standard chemotherapy for this cancer type and a known senescence inducer. The IRE1-XBP1 pathway was highly activated in response to TMZ, correlated with phenotypic markers of senescence, and was differentially activated in distinct senescent morphological phenotypes. Single-cell tracking further supported a concomitant activation of IRE1-XBP1 pathway and senescence phenotypic markers. Although the ATF6 axis was not significantly activated in senescent cells, ATF6 overexpression increased senescence in both control and TMZ-treated cells. These findings provide new insights into the complex regulation of UPR pathways under TMZ treatment, which may reveal new targets to modulate therapy-induced senescence.

## **Keywords**

Unfolded protein response; endoplasmic reticulum stress; senescence; glioblastoma; temozolomide; single cell; live-cell imaging.

## **Highlights**

- IRE1 pathway, but not ATF6, is highly activated in response to temozolomide.
- Activation of IRE1 pathway correlates with phenotypic markers of senescence.

- IRE1 pathway is differentially activated in distinct senescent phenotypes.
- Overexpression of ATF6 accelerates senescence in temozolomide-treated cells.

## Introduction

The unfolded protein response (UPR) is a signaling cascade activated in response to the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) lumen, a condition known as ER stress. Three ER transmembrane sensors - IRE1, PERK, and ATF6 - are activated to restore proteostasis [1]. IRE1 activation leads to the unconventional splicing of XBP1 mRNA, resulting in the translation of the active transcription factor XBP1 [2]. ATF6 is trafficked to the Golgi where it is cleaved to release its cytosolic fragment, which also functions as a transcription factor [3]. Together, these two pathways upregulate ER chaperones and ER-associated degradation components to alleviate ER stress [4–6]. In cancer, cell-intrinsic metabolic alterations and the hostile tumor microenvironment induce persistent ER stress, leading malignant cells to exploit the cytoprotective branches of the UPR for survival [7].

Cellular senescence is a state of permanent cell cycle arrest characterized by resistance to cell death and significant morphological and metabolic changes, including cellular and nuclear enlargement and a hypersecretory phenotype [8]. Anticancer therapies, such as DNA-damaging drugs, can induce the accumulation of senescent cells within the tumor, which promotes cancer progression and therapy resistance by altering the tumor microenvironment [9]. UPR activation occurs in various cell types undergoing senescence induced by different stressors [10–14], including in therapy-induced senescent tumor cells [15–17], suggesting that the UPR may be an important mechanism regulating the senescent phenotype. However, the contribution of UPR pathways to the establishment or maintenance of senescence remains unclear [18].

Glioblastoma is an aggressive brain tumor with a median survival of approximately 15 months and a 2-year survival rate of 18% [19]. The standard treatment is surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy with the

DNA methylating agent temozolomide (TMZ) [20], but resistance to treatment often leads to poor response and recurrence [21]. Senescence is the major cellular outcome induced by TMZ [22], and recent reports have shown that the elimination of senescent cells increases survival and attenuates recurrence in glioblastoma-bearing mice [23,24]. In addition, the UPR has been implicated in glioblastoma chemoresistance, and targeting its various pathways has shown to sensitize cells to TMZ [25–30]. The UPR-induced chaperones BiP and PDIA1 were upregulated by TMZ treatment in glioblastoma cells and patient samples, respectively [25,26,31,32]. However, little is known about the activation dynamics and regulation of UPR pathways in response to TMZ, especially at clinically relevant doses and longer post-treatment periods when senescence is induced.

To better understand the UPR response to TMZ and its association with the therapy-induced senescent phenotype, we used a live single-cell imaging approach. Using reporter glioblastoma cell lines, we monitored the activation dynamics of the IRE1-XBP1 and ATF6 signaling pathways following TMZ treatment. The IRE1-XBP1 pathway, but not the ATF6 branch, was highly activated in response to TMZ, correlated with senescence markers, and was activated in distinct senescent morphological phenotypes. Single-cell tracking further supported a concomitant activation of the IRE1-XBP1 axis and senescence phenotype. Interestingly, we found that ATF6 overexpression accelerated senescence induction in TMZ-treated cells. These findings provide new insights into the complex regulation of UPR pathways under TMZ treatment, which may reveal new targets to modulate therapy-induced senescence.

## **Materials and Methods**

### *Cell culture and treatments*

A-172 and U-87 MG glioma cell lines obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC) were cultured in DMEM Low (Gibco #31600-034) supplemented with 10% fetal bovine serum (Laborclin #630111), 100 U/mL penicillin/streptomycin (Gibco #15140-122), 0.25 µg/mL amphotericin B (Gibco #15290-018) and

maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. HEK-293 cells were grown in DMEM High (Gibco #12100-038) supplemented as described above. Cells were routinely tested for *Mycoplasma* spp. using the Mycoplasma Detection Kit MycoAlert (Lonza #LT07-318). For ER stress induction, cells were treated with 2 μM tunicamycin (MedChem #HY-A0098), 200 nM thapsigargin (Sigma-Aldrich #T9033), or 5 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich #D9779). Temozolomide (Sigma-Aldrich #T2577) was used at 50 or 100 μM. Control cultures were treated with an equivalent volume of vehicle DMSO to a final concentration not to exceed 0.5%.

### *Plasmids*

For the ATF6 reporter, the full-length CMV-pEGFP-ATF6 construct was amplified from the pEGFP-ATF6 plasmid [33] (Addgene #32955) and the lentiviral vector pLentiLox was linearized using EcoRI and AgeI restriction enzymes. Cloning was performed using the Gibson Assembly Cloning Kit (New England Biolabs #E5510S). For the XBP1 and 53BP1 reporters, pLVX-XBP1 mNeonGreen NLS [34] (Addgene #115968) and Apple-53BP1trunc [35] (Addgene #69531) were used, respectively.

### *Lentivirus production and transduction*

Lentiviral particles were produced by co-transfecting HEK-293 cells with the reporter plasmid and the third-generation lentiviral vectors (pMDLg/pRRE [Addgene #12251], pMD2.G [Addgene #12253], and pRSV-Rev [Addgene #12259]) using linear polyethylenimine 25,000 (Polysciences #23966). Medium containing viral particles was harvested 4 and 5 days after transfection, filtered through a 45 μm syringe filter and stored at -80 °C. For transduction, A172 and U87 cells were seeded in a 24-well plate and incubated with 500 μL virus suspension and 8 μg/mL polybrene per well. Cells transduced with two different reporters were incubated with 250 μL virus suspension of each reporter. Cells were centrifuged at 700 x g for 45 min at 25 °C. Medium was changed after 24 h. Stable cell lines were selected in medium containing 5 μg/mL puromycin (Sigma-Aldrich #P8833) for 3 days. ATF6 reporter cells were further selected by fluorescence-activated cell sorting (FACS

ARIA III Cell Sorting, BD Biosciences). Monoclonal XBP1 reporter cells were isolated by seeding single cells into individual wells of a 96-well plate using limiting dilution.

### *Western blotting*

A172 and U87 reporter and parental cell lines were washed three times with cold 1x PBS, lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2 mM EDTA, 4% SDS), and then heated at 75 °C for 5 min. Total protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific #23225). Whole cell lysate (30 µg) was loaded into each lane, resolved on a 12% SDS-PAGE gel, and transferred to PVDF membranes. Rabbit anti-BiP (1:1000, Cell Signaling #3177) and mouse anti-CHOP (1:1000, Cell Signaling #2895) were used as the primary antibodies, and peroxidase-conjugated anti-rabbit (1:1000, Cell Signaling #7074) and anti-mouse (1:1000, Cell Signaling #7076) were used as secondary antibodies. Blots were imaged using the ChemiDoc Imaging System (Bio Rad). Quantification was performed using the Gel tool in ImageJ software. Band density was measured and corrected for loading by the total lane signal of Ponceau S Red staining. All samples were then normalized to the control sample.

### *RT-PCR*

RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen #15596026) according to the manufacturer's instructions. XBP1 RT-PCR was performed using oligo dT priming for the reverse transcriptase reaction with M-MLV-RT (Sigma-Aldrich #M1302) as recommended by the manufacturer. The following primer pair was used: 5' CCTTG TAGTTGAGAACCAGG 3' and 5' GGGGCTTGGTATATATGTGG 3'. A 25 µL PCR reaction was prepared with a single denaturation cycle of 94 °C for 2 min followed by 30 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min. Unspliced (442 bp) and spliced (416 bp) XBP1 RT-PCR products were resolved on a 2.5% agarose gel. Gels were imaged using the ChemiDoc Imaging System (Bio Rad).

Quantification was performed using the Gel tool in ImageJ software. Band density was measured and the ratio of spliced to unspliced XBP1 was calculated.

#### *Senescence-associated $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) staining*

Cells were treated with 50 or 100  $\mu$ M TMZ or 0.05% DMSO for 3 h followed by growth in drug-free medium. After 6 days, cells were washed with 1x PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and incubated with SA- $\beta$ -gal staining solution (1 mg/mL X-gal [Sigma-Aldrich #B4252], 40 mM citric acid/sodium phosphate [pH 6.0], 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, and 2 mM  $MgCl_2$ ) for 4 h at 37 °C. Results are presented as the ratio of SA- $\beta$ -gal-positive cells to total cells for at least 60 cells per well (n = 3 wells per condition).

#### *Live single-cell imaging and image analysis*

All images were captured with a 20x objective on an Incucyte System (Sartorius) and analyzed in ImageJ software, unless indicated otherwise. Background was subtracted from all images using a rolling ball algorithm.

#### ER stress measurement

For XBP1 reporter cells, images were taken every 2 h after treatment for 24 h. Green fluorescence was manually measured for each nucleus, and integrated density (green density), which is the product of area and mean gray value, was used to indicate reporter activation. Cells were considered positive if the green density was greater than the mean plus one standard deviation of the control condition (DMSO). For ATF6 reporter cells, images were taken every 30 min starting immediately after treatment for 8 h. The red channel (53BP1 reporter) was used to segment the nuclei. Paired nuclear and cytoplasmic measurements were performed manually in the green channel and the ratio between the mean intensity in the nucleus and in the cytoplasm (nuclear-cytoplasmic ratio) was calculated for each cell. Cells were

considered positive if the nuclear-cytoplasmic ratio was greater than the mean plus half the standard deviation of the control condition (DMSO). For each time point and treatment, 150 cells from 3 wells were analyzed.

### Response to TMZ treatment

Cells were treated with 50  $\mu$ M TMZ for 5 days, followed by growth in drug-free medium for 7 days. Images were captured every 24 h for 12 days. For each cell, XBP1 or ATF6 reporter activation, nuclear area, cell area, and number of 53BP1 foci were measured manually. 53BP1 foci were counted up to 4 foci per nucleus, and nuclei with more than 4 foci were labeled as having  $\geq 5$  foci. Cells were considered positive for the XBP1 reporter if the green density was greater than the mean plus four standard deviations of the control condition (DMSO) in the first 5 days of the experiment. For the ATF6 reporter, cells were considered positive if the nuclear-cytoplasmic ratio was greater than the mean plus two standard deviations of the control condition (DMSO) in the first 5 days of the experiment. For both reporter cell lines, nuclei were considered large if the area was greater than the mean plus four standard deviations of the control condition (DMSO). For each time point and treatment, 60 cells from 3 wells were analyzed. For single-cell tracking, images were taken at 4 h intervals and tracking was performed manually.

### Nuclear and cell morphometric analyses

Nuclear and cell morphometric analyses were performed based on a tool developed by our group [36]. Nuclear and cell area and shape descriptions were measured manually. Irregularity was calculated as the sum of the inverse of circularity, the inverse of roundness, the inverse of solidity, and the aspect. Data from control cells (DMSO) were used to set the parameters of the normal population, which is represented by an ellipse in the plots. For both area and irregularity measurements, the mean plus two standard deviations was used, and outliers were excluded. In the nuclear morphometric analysis, nuclei with normal irregularity but increased area are termed large regular (LR), whereas nuclei with both increased area and

irregularity are termed large irregular (LI). We further subdivided the LR population into LR 1 and LR 2. LR 2 nuclei had an area greater than two times the threshold used for LR. For cell morphometric analysis, cells with an increase in area compared to normal cells were empirically divided into three categories representing relevant phenotypes induced by treatment: cells with extensions, flattened cells, and intermediate cells. For each time point and treatment, 60 cells from 3 wells were analyzed.

#### Cumulative population doubling and nuclear area of U87 cells

Images were captured every 24 h after treatment for 10 days. Nuclei were automatically segmented and counted using a software developed by our group (available upon request). For each time point and condition, 3 wells were counted. The cumulative population doubling (CPD) was calculated as  $CPD = CDP_0 + (\log_2 C_F - \log_2 C_I)$ , where  $CPD_0$  is the initial CPD,  $C_F$  is the final number of cells, and  $C_I$  is the initial number of cells. The nuclear area of cells 6 days after treatment was measured manually. For each condition, 120 nuclei from 3 wells were analyzed. Nuclei were considered large if the area was greater than the mean plus two standard deviations of the control condition (DMSO). Very large nuclei had an area greater than two times the threshold used for large nuclei.

#### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.2 software. Two-sided p-values < 0.05 were considered statistically significant. In all figures, \* indicates  $p \leq 0.05$ , \*\* indicates  $p \leq 0.01$ , and \*\*\* indicates  $p \leq 0.001$ .

## **Results**

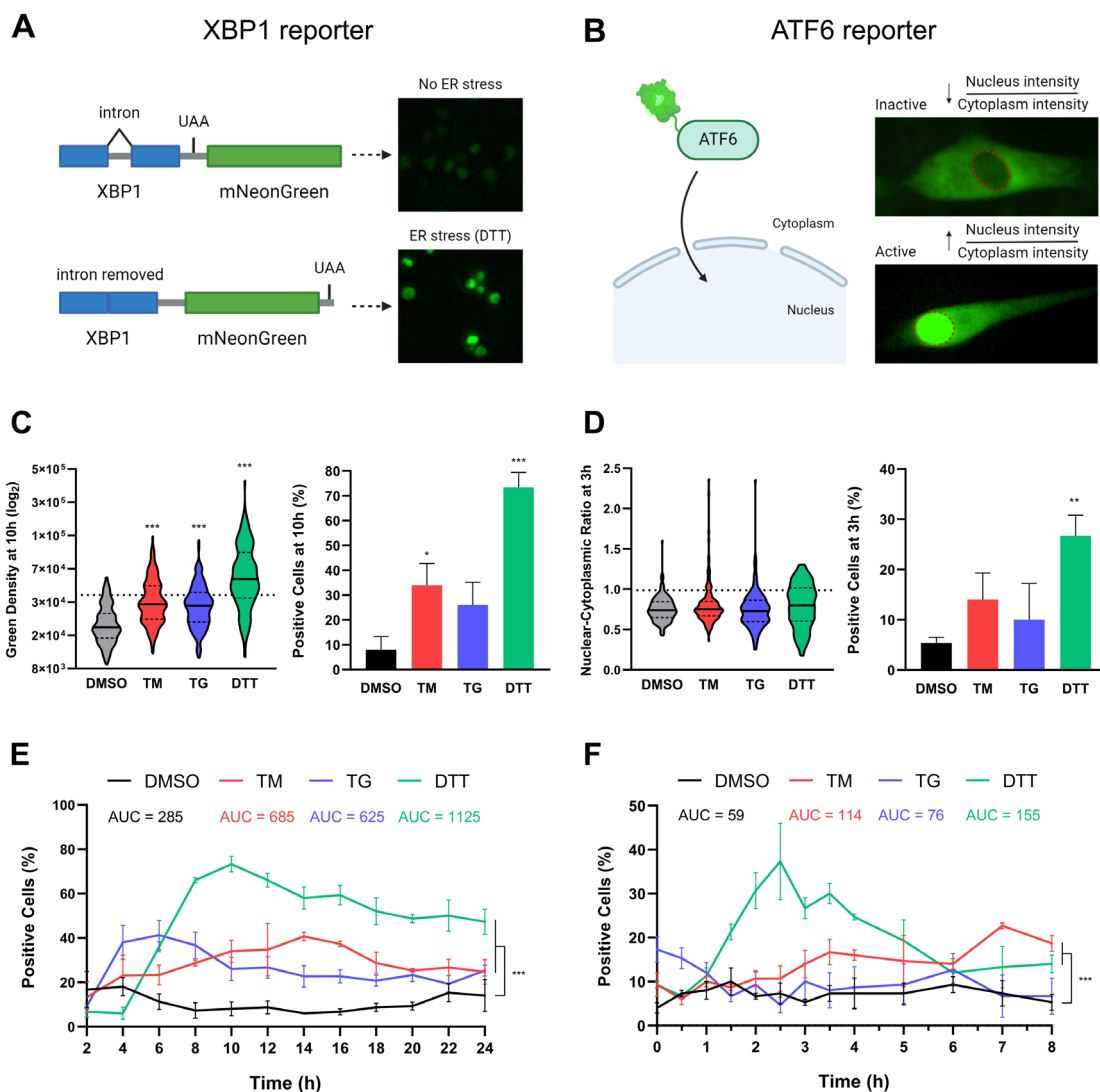
### *Generation and validation of reporter cell lines to monitor IRE1-XBP1 and ATF6 activation*

To assess UPR activation in real time at the single-cell level, we generated glioblastoma cells stably expressing fluorescent protein reporters for the IRE1-XBP1 and ATF6 signaling pathways. The XBP1 reporter consists of the 410 - 633 nucleotide sequence of the XBP1 gene, including the 26 bp intron spliced by IRE1, followed by the green fluorescent protein mNeonGreen. Under ER stress, IRE1 removes the intron, resulting in a frame shift that allows translation of mNeonGreen fused to a nuclear localization signal (Fig. 1A, Fig. S1A) [34]. A172 cells were transduced with the XBP1 reporter construct and the nuclear marker and DNA damage reporter Apple-53BP1trunc [35]. The ATF6 reporter construct encodes EGFP followed by the full-length ATF6 protein. In response to ER stress, the N-terminal portion of ATF6 fused to the fluorescent protein is released and translocates to the nucleus (Fig. 1B, Fig. S1B) [33,37]. Reporter activation for each cell can be calculated as the ratio of nuclear to cytoplasmic green intensity (nuclear-cytoplasmic ratio), with the nucleus being defined by the red fluorescence from Apple-53BP1 reporter.

To induce ER stress, reporter cell lines were treated with the classical inducers dithiothreitol (DTT), tunicamycin (TM), and thapsigargin (TG). First, we compared the ER stress response between reporter and parental wild-type cells by assessing the protein levels of BiP and CHOP, transcriptional targets of UPR pathways, as well as XBP1 splicing levels (Fig. S1C-E). Both reporter cells exhibited higher basal ER stress levels compared to parental cells. This may be due to the constitutive expression of two reporter proteins and, in the case of the ATF6 reporter, also to the overexpression of the full-length ATF6 protein. Nevertheless, they remained capable of responding to ER stress inducers.

Next, we examined the activation dynamics of XBP1 and ATF6 reporters in response to treatment with ER stress inducers. Reporter cells were treated with TM, TG, DTT, or DMSO and imaged by time-lapse fluorescence microscopy. In XBP1 reporter cells, the green density per cell and the percentage of positive cells increased significantly after all treatments, and the activation peak was around 10 h (Fig. 1C and E, Fig. S1F). Interestingly, the activation kinetics were very different for each inducer. While TG induced an increase in fluorescence only a few hours after treatment, DTT and TM took longer to activate the reporter. For the ATF6 reporter

cell line, the average nuclear-cytoplasmic ratio was not altered during treatments compared to the control (Fig. S1G). However, the percentage of positive cells showed a significant increase mainly with DTT treatment, and the activation peak was around 3 h (Fig. 1D and F). In both cell lines, ER stress inducers increased cell variability (Fig. 1C and D). Unexpectedly, single cells responded very differently to ER stress induction, as there were highly activated cells and cells that remained at low basal activation levels. Taken together, these results indicate that the developed reporter cell lines are suitable models to study UPR dynamics in glioblastoma cells.



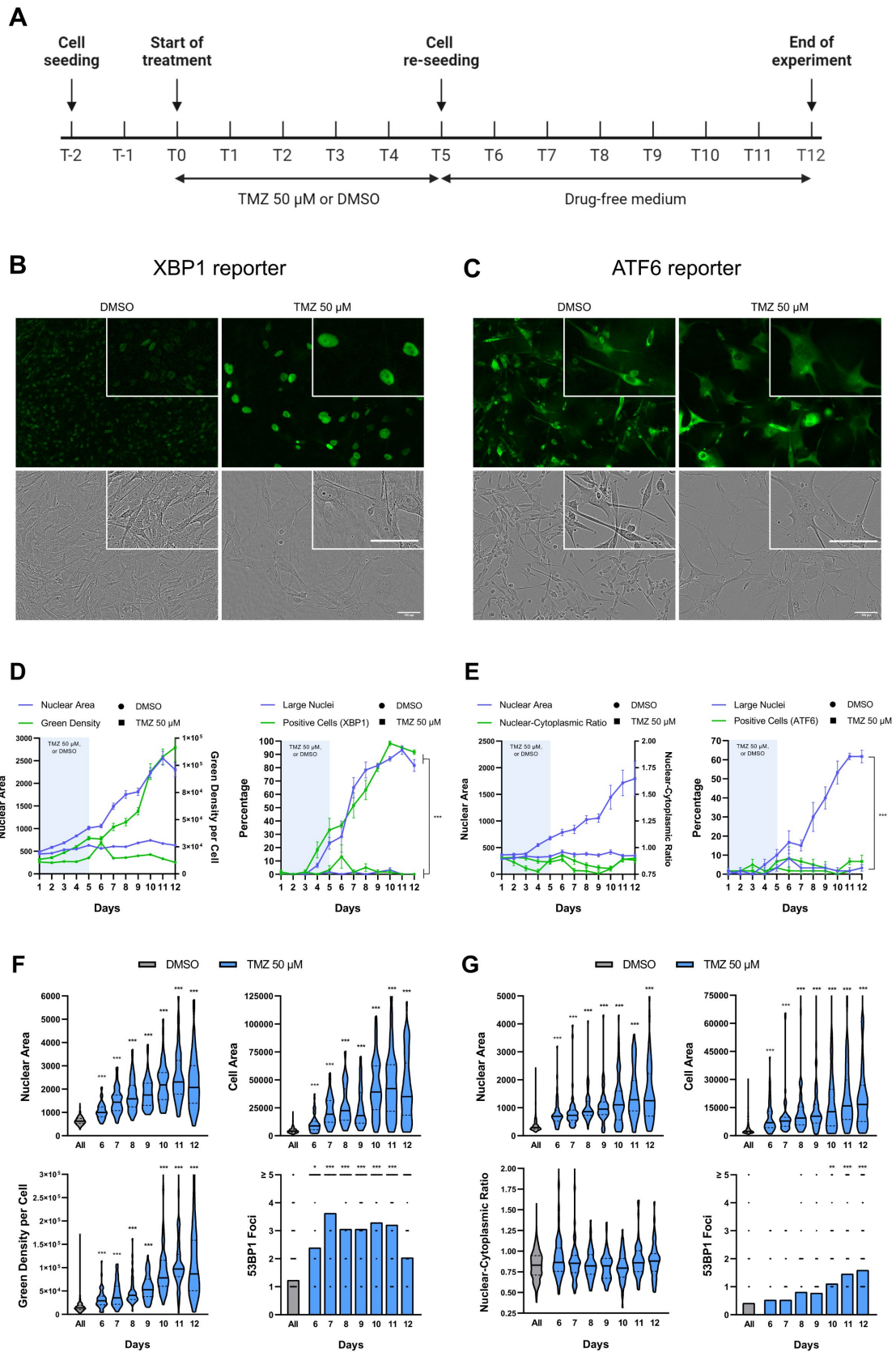
**Figure 1. Activation of XBP1 and ATF6 reporters in response to ER stress. (A)** Schematic representation of the XBP1 reporter construct. Under ER stress, IRE1 splices XBP1 mRNA, allowing the translation of the XBP1-mNeonGreen reporter fusion protein. In the absence of IRE1 activation, a premature stop codon prevents the translation of the

fluorescent protein. **(B)** Schematic representation of the ATF6 reporter construct. In response to ER stress, ATF6 is transported from the ER to the Golgi where it is cleaved, and its N-terminal portion carrying the GFP fluorescent protein is released and translocates to the nucleus. On the right, we measure the reporter activation by calculating the ratio of nuclear to cytoplasmic green intensity (nuclear-cytoplasmic ratio). Red dotted lines outline the nuclei. **(C-F)** Cells were treated with 2  $\mu$ M TM, 200 nM TG, 5 mM DTT, or 0.1% DMSO. For XBP1 reporter cells, images were taken at 2 h intervals after treatment for 24 h, and, for ATF6 reporter cells, images were taken at 0.5 h intervals starting immediately after treatment for 8 h. **(C)** Green density ( $\log_2$ ) and percentage of positive cells for XBP1 reporter 10 h after treatment with ER stress inducers. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison ( $n = 150$  cells) and ANOVA followed by Tukey's multiple comparison ( $n = 3$  wells) were used, respectively. Error bars indicate SD. **(D)** Nuclear-cytoplasmic ratio and percentage of positive cells for ATF6 reporter 3 h after treatment with ER stress inducers. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison ( $n = 150$  cells) and ANOVA followed by Tukey's multiple comparison ( $n = 3$  wells) were used, respectively. Error bars indicate SD. Dotted lines in **(C)** and **(D)** indicate the threshold value above which cells were considered positive. **(E, F)** Percentage of positive cells for XBP1 reporter **(E)** and for ATF6 reporter **(F)** over time after treatment with ER stress inducers. Error bars indicate SEM of three wells per time point and treatment. For each treatment, AUC was calculated and ANOVA followed by Tukey's multiple comparison was performed ( $n = 3$  wells).

### *IRE1-XBP1 pathway, but not ATF6, is activated in response to TMZ*

To better understand the activation of UPR pathways in response to TMZ, we used live imaging to monitor the dynamics of XBP1 and ATF6 reporters. Reporter cell lines were treated with 50  $\mu$ M TMZ for 5 days, followed by growth in drug-free medium for 7 days (Fig. 2A). This experimental design was based on the standard adjuvant therapy in which patients receive 5 days of TMZ every 28 days [20], resulting in peak plasma concentrations of approximately 50  $\mu$ M [38]. By the last day of the experiment, cell morphology had changed drastically, as cells were enlarged, flattened, and had many membrane extensions (Fig. 2B and C). Here, we used nuclear enlargement as a phenotypic marker of senescence [39,40]. The XBP1 reporter was activated concomitantly with nuclear enlargement in A172 cells (Fig. 2D). Both markers increased more expressively after TMZ withdrawal. U87 cells expressing the ATF6 reporter also showed enlarged nuclei but the increase was less expressive and started a few days later (Fig. 2E). Surprisingly, the ATF6 reporter was not activated under TMZ treatment, as it remained at similar levels to control cells.

Together with nuclear enlargement, we observed a significant increase in cell area and DNA damage as measured by the number of 53BP1 foci. In both cell lines, these features increased significantly over the days following TMZ withdrawal (Fig. 2F and G). Interestingly, as we observed with ER stress inducers, TMZ treatment increased cell variability regarding XBP1 reporter activation levels (Fig. 2F). Nuclear and cell area also showed a similar increase in cell variability over time, suggesting not only that there are still cells of normal size and with basal IRE1-XBP1 activation levels but also that TMZ-induced senescent cells have a heterogeneous phenotype.



**Figure 2. Dynamics of XBP1 and ATF6 reporter cell lines in response to TMZ. (A)** Reporter cell lines were treated with 50  $\mu\text{M}$  TMZ for 5 days, followed by growth in drug-free

medium for 7 days. **(B, C)** Representative images of XBP1 **(B)** and ATF6 **(C)** reporter cells 12 days after TMZ or DMSO treatment. Scale bar = 100  $\mu$ m. **(D)** On the left, nuclear area and green density in XBP1 reporter cells over time after treatment. Error bars indicate SEM of all cells per time point and condition (n = 60). On the right, percentage of large nuclei and positive cells for XBP1 reporter. Error bars indicate SEM of three wells per time point and condition. Multiple t-tests were performed (n = 3 wells). **(E)** On the left, nuclear area and nuclear-cytoplasmic ratio in ATF6 reporter cells over time after treatment. Error bars indicate SEM of all cells per time point and condition (n = 60). On the right, percentage of large nuclei and positive cells for ATF6 reporter. Error bars indicate SEM of three wells per time point and condition. Multiple t-tests were performed (n = 3 wells). **(F)** Nuclear area, cell area, green density, and number of 53BP1 foci in XBP1 reporter cells at the indicated days after treatment. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison was used (n = 60 cells). **(G)** Nuclear area, cell area, nuclear-cytoplasmic ratio, and number of 53BP1 foci in ATF6 reporter cells at the indicated days after treatment. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison was used (n = 60 cells).

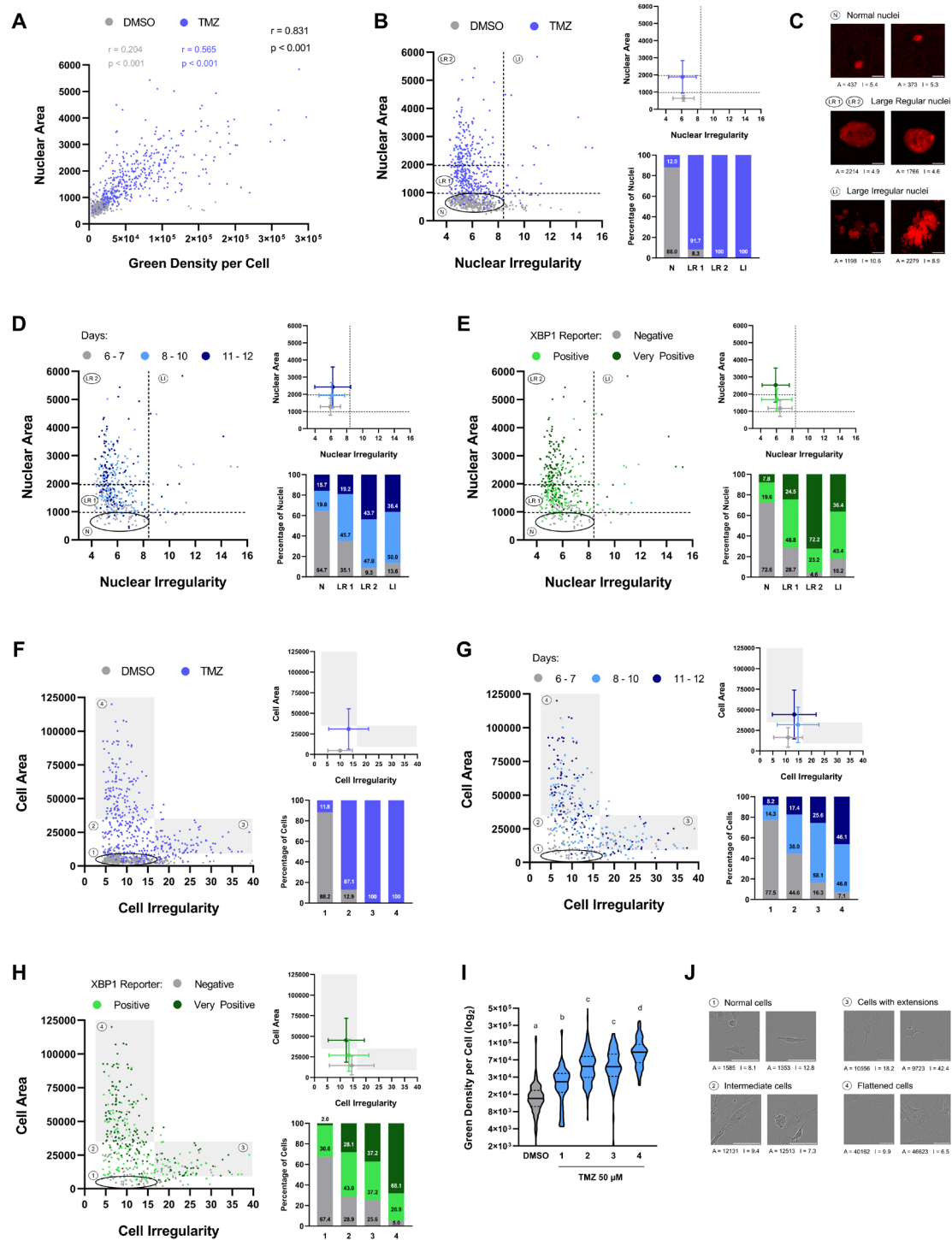
### *IRE1-XBP1 pathway is differentially activated in distinct senescent phenotypes*

Since TMZ strongly induced phenotypic markers of senescence accompanied by XBP1 reporter activation, we next investigated whether this increase in IRE1-XBP1 activity was associated with the appearance of senescence. Indeed, nuclear area and XBP1 reporter activation correlated strongly during TMZ treatment (Fig. 3A), whereas the ATF6 reporter did not (Fig. S2A). Given that single cells were highly heterogeneous with respect to morphology and reporter activation, we investigated the different senescent morphological phenotypes induced by treatment.

First, we used a tool developed by our group that separates different nuclear phenotypes in an area versus irregularity plot by Nuclear Morphometric Analysis (NMA) [36]. The NMA plot showed that TMZ induced the appearance of some large irregular (LI) nuclei, which may be due to mitotic catastrophe (Fig. 3B and C, Fig. S2B and C). However, the major outcome induced by TMZ was the appearance of large regular (LR) nuclei. We subdivided these into LR 1 and LR 2, representing nuclei from arrested cells and senescent cells, respectively. Accordingly, the LR 2 population consisted of many cells from the last days of the experiment, whereas the LR 1 population consisted mainly of cells from the first days after TMZ withdrawal (Fig. 3D, Fig. S2D). Although the LI and LR 1 populations also showed a significant

increase in positive cells for the XBP1 reporter, the LR 2 population was composed of more than 95% of positive cells (Fig. 3E).

Based on the NMA tool, we performed a similar area versus irregularity plot through a cell morphology analysis. Using this approach, we were able to classify cells into four categories representing relevant phenotypes: normal cells (1), intermediate cells (2), cells with extensions (3), and flattened cells (4) (Fig. 3F and J, Fig. S2F and J). Cells with extensions and flattened cells are two distinct senescent morphological phenotypes that we observed *in vitro*, whereas intermediate cells could represent “pre-senescent” cells. Consistent with this view, intermediate cells were mainly composed of cells from the first days after TMZ withdrawal, while cells with extensions and especially flattened cells were from the last days of the experiment (Fig. 3G, Fig. S2G). The XBP1 reporter was highly activated in both senescent phenotypes, but mainly in flattened cells, of which almost 70% we considered “very positive” (Fig. 3H and I). The different morphologies induced by treatment can explain the increased cell variability we observed in terms of cell and nuclear morphology as well as reporter activation. Furthermore, these data suggest that the activation of the IRE1-XBP1 axis is closely associated with cellular senescence, especially in cells with flattened morphological phenotype, highlighting the relevance of this pathway in TMZ-induced senescence.



**Figure 3. XBP1 reporter activation in TMZ-induced senescent phenotypes.** XBP1 reporter cells were treated as described in Figure 2A. Data shown here are from cells during the 7 days after drug withdrawal (days 6 to 12). **(A)** Correlation between green density and nuclear area. Spearman's correlation coefficient ( $r$ ) and p-value ( $p$ ) are shown. **(B)** On the left, distribution of nuclei in a nuclear morphometric analysis (NMA) plot of area versus irregularity. Nuclei were divided into four categories: normal, large regular 1 (LR1), large regular 2 (LR2), and large irregular (LI), as indicated. On the top right, NMA plot showing

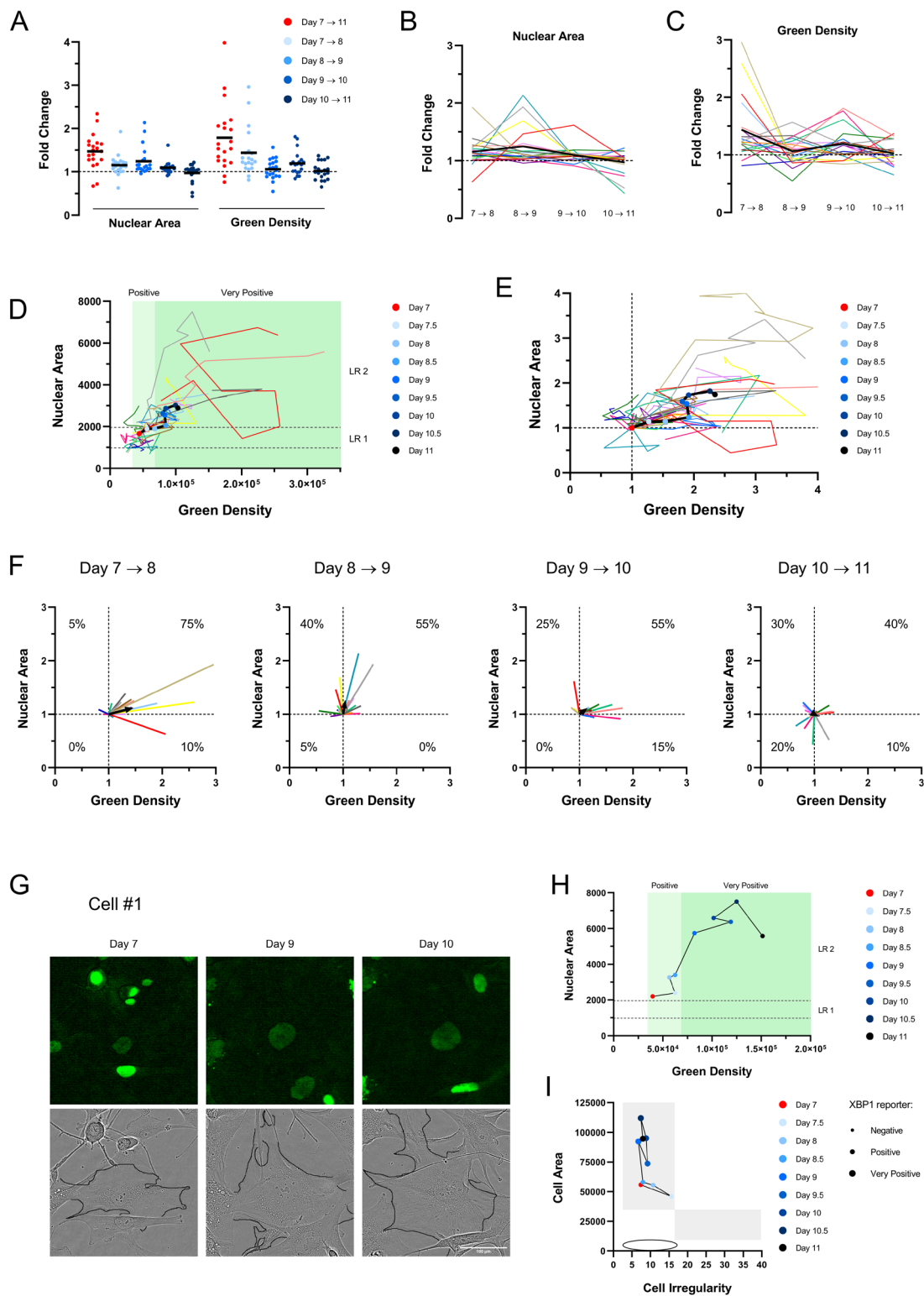
the mean and SD of each condition. On the bottom right, the percentage of nuclei from DMSO and TMZ conditions in each category is shown. **(C)** Examples of nuclei from the four categories. Area (A) and irregularity (I) are indicated for each nucleus. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ . **(D)** On the left, NMA plot of TMZ-treated nuclei. Colors indicate the number of days after treatment. On the top right, NMA plot showing the mean and SD of each time period. On the bottom right, the percentage of nuclei from each time period in each category is shown. **(E)** On the left, NMA plot of TMZ-treated nuclei. Colors indicate XBP1 reporter activation. On the top right, NMA plot showing the mean and SD of each activation status. On the bottom right, the percentage of nuclei from each activation status in each category is shown. **(F)** On the left, distribution of cells in a cell morphometric analysis plot of area versus irregularity. Cells were divided into four categories representing relevant phenotypes: normal cells (1), intermediate cells (2), cells with extensions (3), and flattened cells (4), as indicated. On the top right, plot showing the mean and SD of each condition. On the bottom right, the percentage of cells from DMSO and TMZ conditions in each category is shown. **(G)** On the left, cell morphometric analysis plot of TMZ-treated cells. Colors indicate the number of days after treatment. On the top right, plot showing the mean and SD of each time period. On the bottom right, the percentage of cells from each time period in each category is shown. **(H)** On the left, cell morphometric analysis plot of TMZ-treated cells. Colors indicate XBP1 reporter activation. On the top right, plot showing the mean and SD of each activation status. On the bottom right, the percentage of cells from each activation status in each category is shown. **(I)** Green density ( $\log_2$ ) in the different cell categories. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison was used (DMSO: n = 420; TMZ 1: n = 49; TMZ 2: n = 121; TMZ 3: n = 86; TMZ 4: n = 141). Different letters indicate statistical significance ( $p \leq 0.05$ ). **(J)** Examples of cells from the four categories. Area (A) and irregularity (I) are shown for each cell. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

### *Dynamics of IRE1-XBP1 activation and senescence at the single-cell level*

Our population analysis revealed that the XBP1 reporter was activated concomitantly with nuclear enlargement after TMZ withdrawal (Fig. 2D). To assess whether individual cells responded similarly, we tracked randomly selected XBP1 reporter cells between days 7 and 11 (Fig. 2A). Time points were grouped into four intervals according to the days of the experiment (day 7 to day 11) to allow evaluation of changes in nuclear area and XBP1 reporter activation at the single-cell level over time. As expected, most cells (80%, 16/20) showed an increase in both nuclear area and reporter activation when comparing day 7 to day 11 (Fig. 4A-C). Notably, the most pronounced increases in reporter activation and nuclear area occurred in the first and second intervals, respectively, whereas the last interval was the one with the least pronounced increase for both markers (Fig. 4A-C).

Similar to the pattern observed in the population data, single-cell traces revealed that most cells showed simultaneous nuclear enlargement and reporter activation (Fig. 4D, e.g., cells #1, #3, #4, #6, and #8 [Fig. 4G-I, Fig. S3A]). However, some cells showed an initial increase in one marker, followed by a subsequent increase in the other (e.g., cells #2 and #5 [Fig. S3A]). To better dissect these cell responses, we plotted the trajectories of all cells over the intervals relative to their initial value, considered as 1. Most cells (75%) activated both markers simultaneously between days 7 and 8, showing a more heterogeneous and stable phenotype in the last two days. There was a tendency for a more pronounced increase in reporter activation in the first interval followed by a more significant nuclear enlargement between days 8 and 9 (Fig. 4E and F). These results suggest that while there is variability in the dynamics of IRE1-XBP1 activation and senescence at the single-cell level, most cells follow a concomitant activation pattern, with the most significant changes occurring not too late after TMZ withdrawal.

Regarding morphological phenotypes, cells were distributed across the four categories. Some maintained a stable senescent morphological phenotype throughout the observation period (e.g., cells #1, #2, and #8; Fig. 4I, Fig. S3B), while others transitioned between different senescent phenotypes (e.g., cells #4 and #5; Fig. S3B). Cells with higher reporter activation levels were predominantly associated with a flattened phenotype, consistent with our previous findings (Fig. 4E and F, S3A and B). These observations further support a connection between elevated IRE1-XBP1 activation and distinct senescent morphological changes.



**Figure 4. Single-cell analysis of XBP1 reporter cells after TMZ treatment. (A)** Fold change in nuclear area and green density for each cell between the indicated intervals ( $n = 20$  cells). To calculate the fold changes, the averages of measurements over the indicated days were used. Each dot represents a single cell. **(B, C)** Comparison of the fold change in nuclear area **(B)** and green density **(C)** from the same cell between the indicated intervals.

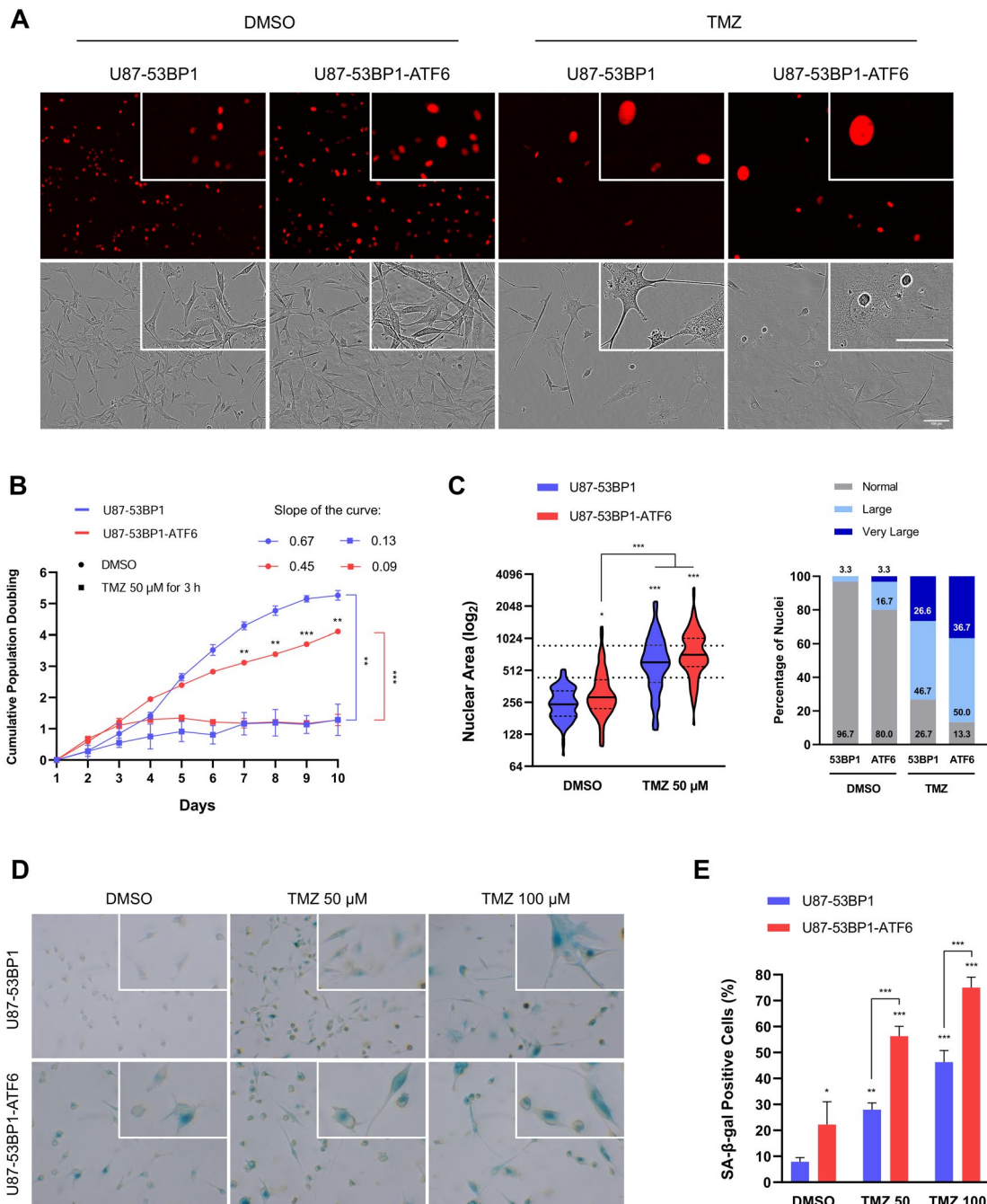
Each line represents a single cell, indicated by different colors. The black line is the average fold change of all cells. **(D, E)** Nuclear area and green density of all single cells measured over time. Each line represents a single cell, indicated by different colors. The black line shows the average of all cells, and the colors of the dots indicate the number of days after treatment. Dotted lines indicate the threshold values above which nuclei were considered LR 1 and LR 2. The background colors indicate threshold values above which cells were considered positive and very positive for the XBP1 reporter. **(D)** shows the absolute values while **(E)** shows the relative values, considering the initial value for each cell as 1. **(F)** Single-cell tracks of nuclear area and green density, considering the initial value as 1 for each cell in each interval, as indicated. Each line represents a single cell, indicated by different colors. The black arrow shows the average of all cells. The percentage of cells in each quadrant at the end of the interval is shown. **(G)** Representative images of a single cell at the indicated days. The black lines outline the cells. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ . **(H)** Nuclear area and green density of the single cell shown in **(G)** measured over time. The colors of the dots indicate the number of days after treatment. **(I)** Cell morphometric analysis plot of the single cell shown in **(G)** measured over time. Colors indicate the number of days after treatment and different sizes represent the activation status of the XBP1 reporter. The gray boxes and the ellipse delineate the different morphologies described in Figure 3F.

#### *Overexpression of ATF6 accelerates senescence induction in TMZ-treated cells*

Even though the ATF6 reporter was not activated in TMZ-induced senescent cells, previous studies have reported that modulation of ATF6 interferes with the senescence phenotype [10,12,14,41]. Given that our ATF6 reporter cell line overexpresses the full-length ATF6 protein and has a high basal expression of ATF6's major transcriptional target BiP, we investigated the induction of senescence in these cells. We compared U87 cells stably expressing the 53BP1 reporter or expressing both the 53BP1 and ATF6 reporters treated with 50  $\mu\text{M}$  TMZ or DMSO. ATF6 reporter cells showed increased cell and nuclear size, phenotypic markers of senescence in vitro [8,39,40] even under control conditions (Fig. 5A). The untreated ATF6 reporter cell line also showed reduced proliferation and an increased nuclear area (Fig. 5B and C).

Under TMZ treatment, the ATF6 reporter cell line exhibited cells with a highly enlarged, flattened shape (Fig. 5A). Although ATF6 overexpression did not significantly alter proliferation after TMZ treatment, we observed that it anticipated the reduction in the slope of the cumulative population doubling curve (Fig. 5B). While control cells only ceased proliferation around day 7, ATF6 reporter cells already had stopped proliferating 4 days after treatment. Consistent with the

observed cell morphology, the TMZ-treated ATF6 reporter cell line showed a marked increase in the percentage of very large nuclei, typical of senescent cells, after only 6 days (Fig. 5C). SA- $\beta$ -gal staining further confirmed these results, showing a significant increase in the percentage of positive cells in the ATF6 reporter cell line under control and 50 or 100  $\mu$ M TMZ treatment conditions (Fig. 5D and E). Interestingly, these data suggest that ATF6 overexpression not only induces senescence in a fraction of cells, but also potentiates the effects of TMZ treatment by causing early induction of senescence and proliferation arrest.



**Figure 5. ATF6 overexpression increases senescence in control and TMZ-treated U87 cells. (A)** Representative images of U87 cells stably expressing the 53BP1 reporter (U87-53BP1) or expressing both the 53BP1 and the ATF6 reporters (U87-53BP1-ATF6) treated with 50 μM TMZ or 0.05% DMSO for 3 h followed by growth in drug-free medium for 6 days. Scale bar = 100 μm. **(B)** Cumulative population doubling of U87-53BP1 and U87-53BP1-ATF6 cells treated with 50 μM TMZ or 0.05% DMSO for 3 h followed by growth in drug-free medium. Multiple t-tests were performed (n = 3 wells). The slope of the linear regression of each curve is shown. Error bars indicate SEM. **(C)** On the left, nuclear area (log<sub>2</sub>) 6 days after treatment. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison was used (n = 120

cells). Dotted lines indicate the threshold value above which nuclei were considered large or very large. On the right, percentage of nuclei in each category (normal, large, and very large). **(D)** Representative images of SA- $\beta$ -gal staining of U87 cells treated with 50 or 100  $\mu$ M TMZ or 0.05% DMSO for 3 h followed by growth in drug-free medium for 6 days. **(E)** Percentage of SA- $\beta$ -gal positive cells. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison was performed ( $n = 3$  wells). Error bars indicate SD.

## Discussion

The UPR has been identified as a promising therapeutic target to overcome chemoresistance in glioblastoma [42]. However, the activation of UPR pathways in response to TMZ, the standard chemotherapy for this cancer type, remains poorly understood. Furthermore, the crosstalk between the UPR and senescence, one of the primary cellular responses induced by TMZ, has not been investigated in glioblastoma. Here, we monitored the activation of two key UPR pathways, IRE1-XBP1 and ATF6, in response to TMZ and evaluated their activity in different senescent phenotypes induced by treatment. We used live single-cell imaging to assess the dynamics and heterogeneity of responses and to correlate phenotypes within the cell population.

First, we generated glioblastoma cell lines stably expressing fluorescent reporters to monitor the activation of the IRE1-XBP1 and ATF6 signaling pathways. The XBP1 reporter indicates the level of XBP1 mRNA splicing, which is triggered by IRE1 activation, while the ATF6 reporter tracks the translocation of ATF6 from the ER to the nucleus during ER stress. Our reporter cell lines exhibited high levels of basal ER stress, which may be partly due to oxidative stress induced by fluorescent protein expression [43]. Nevertheless, the cell lines remained capable of responding to ER stress inducers, with significant activation of the reporters under stress. Activation kinetics varied between inducers, likely due to their different mechanisms of action, in agreement with a previous study showing different UPR activation dynamics for TM and TG [44]. Notably, ER stress induction increased variability in a clonal population with similar basal XBP1 splicing levels, suggesting that non-genetic heterogeneity among individual cells leads to different sensitivity to ER stress. When comparing the engineered cell lines, the XBP1 reporter proved to be a more suitable tool, as the ATF6 reporter was less responsive to ER stress and

possibly interfered with the endogenous UPR pathway by overexpressing full-length ATF6 protein.

We found that the XBP1 reporter was highly activated in response to TMZ, and its activation occurred concomitantly with the appearance of senescence phenotypic markers. Single cells also showed a similar concurrent activation pattern. The nuclear area and XBP1 reporter activation strongly correlated during TMZ treatment, suggesting that the increase in IRE1-XBP1 activity was not a direct response to the TMZ-induced damage, but was associated with the appearance of the senescent phenotype. This is consistent with previous studies that observed increased XBP1 splicing in skin cells undergoing replicative senescence [10,14,45] and in senescent lymphoma cells induced by the DNA damaging drug doxorubicin [15]. Furthermore, there are no data reporting IRE1-XBP1 activation under acute TMZ treatment. Interestingly, while XBP1 splicing appears to be increased across various senescent models, IRE1-XBP1 signaling has been associated with delayed senescence. For example, XBP1 knockdown accelerated HRas-induced senescence in keratinocytes [46], and overexpression of spliced XBP1 reduced senescence in the hippocampus of aged mice [47]. Taken together, our results support previous data showing that therapy-induced senescent cells activate the IRE1-XBP1 pathway and highlight the need for further investigation to determine whether and how modulation of this UPR axis interferes with the senescent phenotype in TMZ-treated glioblastoma cells.

In addition, TMZ treatment led to increased variability in XBP1 reporter activation levels, as well as in nuclear and cellular area, in A172 cells. This variability was particularly high during the last days of the experiment, when nearly the entire cell population exhibited phenotypic markers of senescence. To better explore this heterogeneity, we analyzed nuclear and cell morphology using area and irregularity features [36]. In the last days of the experiment, only a small fraction of cells retained normal morphology, whereas senescent cells exhibited highly heterogeneous morphologies. This aligns with previous studies suggesting that senescent cells display high intra-population morphological heterogeneity [48–50].

In terms of nuclear morphology, the most notable outcome induced by TMZ was the presence of cells with very enlarged nuclei, termed “LR 2”, which were

nearly all positive for the XBP1 reporter. Regarding cellular morphology, we identified two distinct senescent phenotypes common to both A172 and U87 cell lines: one characterized by enlarged, flattened cells with low irregularity, and another by enlarged cells with high irregularity due to membrane extensions. The XBP1 reporter was highly activated in both these senescent phenotypes compared to normal and intermediate phenotypes. However, while 37% of the cells with membrane extensions had very high XBP1 reporter levels, this number rose to 68% in the flattened cells. Single-cell tracking revealed that cells can transition between these senescent phenotypes, and further supported that higher reporter activation was predominantly associated with a flattened phenotype. A recent article using single-cell morphology to cluster senescent fibroblast subtypes demonstrated that these subtypes have different responses to senolytics, indicating functional differences [50]. Here, our data reveal that senescent glioblastoma cells can also be classified based on cell morphology and that these morphological phenotypes show differential activation of IRE1-XBP1 signaling. These findings further highlight the importance of the IRE1-XBP1 pathway in TMZ-induced senescence.

Previous reports support a critical role for ATF6 in mediating cellular senescence. Knockdown of ATF6 in senescent keratinocytes and fibroblasts reduced senescence markers such as SA- $\beta$ -gal and morphological changes [10,14,41]. Moreover, ATF6 overexpression in breast cancer cells induced senescence through its transcriptional activity [12]. Similarly, we showed that ATF6 overexpression decreased proliferation, increased SA- $\beta$ -gal activity, and increased nuclear size in untreated glioblastoma cells. Although EGFP-ATF6 was mainly localized in the cytoplasm under control conditions, the expression of ATF6 major transcriptional target BiP was markedly upregulated, suggesting that at least part of the overexpressed ATF6 acts as a transcription factor. Interestingly, ATF6 overexpression accelerated senescence induction in TMZ-treated cells. Six days after treatment, ATF6 reporter cells already showed a stable proliferation arrest, with over 50% being SA- $\beta$ -gal positive and nearly 40% showing highly enlarged nuclei.

Surprisingly, the ATF6 reporter was not activated under TMZ treatment, even though most cells displayed phenotypic markers of senescence. In contrast to our findings, previous reports have observed increased ATF6 transcriptional activity

during senescence [10,12], although these studies did not evaluate therapy-induced senescence. Notably, stress-induced senescence via hydrogen peroxide did not activate the ATF6 axis, and stressed senescent fibroblasts showed reduced ATF6 nuclear localization [45,51]. While our reporter may have lacked the sensitivity to detect ATF6 activation in response to TMZ, our results suggest that this UPR branch plays a crucial role in mediating the therapy-induced senescent phenotype, even if it does not display increased activation.

## **Conclusion**

Our study provides new insights into the activation of the UPR pathways IRE1-XBP1 and ATF6 in response to TMZ treatment in glioblastoma, highlighting their relevance in therapy-induced senescence. Using live single-cell imaging, we demonstrated that the IRE1-XBP1 pathway is highly activated in cells induced to senescence by TMZ, and its activation levels differs between distinct senescent morphological phenotypes. Although the ATF6 axis was not activated in response to TMZ treatment, its overexpression accelerated the therapy-induced senescent phenotype. Our findings highlight the complex regulation of UPR pathways during therapy-induced senescence and reinforce the importance of further understanding their role in regulating the senescent phenotype.

## **Funding sources**

This work was supported by Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul State (FAPERGS). FDO and GL received CNPq fellowships, CBC received a FAPERGS fellowship, and LCP received a CAPES fellowship.

## **Author contributions**

FDO: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing, Project administration. CBC: Methodology, Investigation. LCP:

Methodology, Investigation, Software. ECFC: Conceptualization; Resources; Writing - Review & Editing; Supervision. GL: Conceptualization; Resources; Writing - Review & Editing; Supervision; Funding acquisition.

### **Acknowledgements**

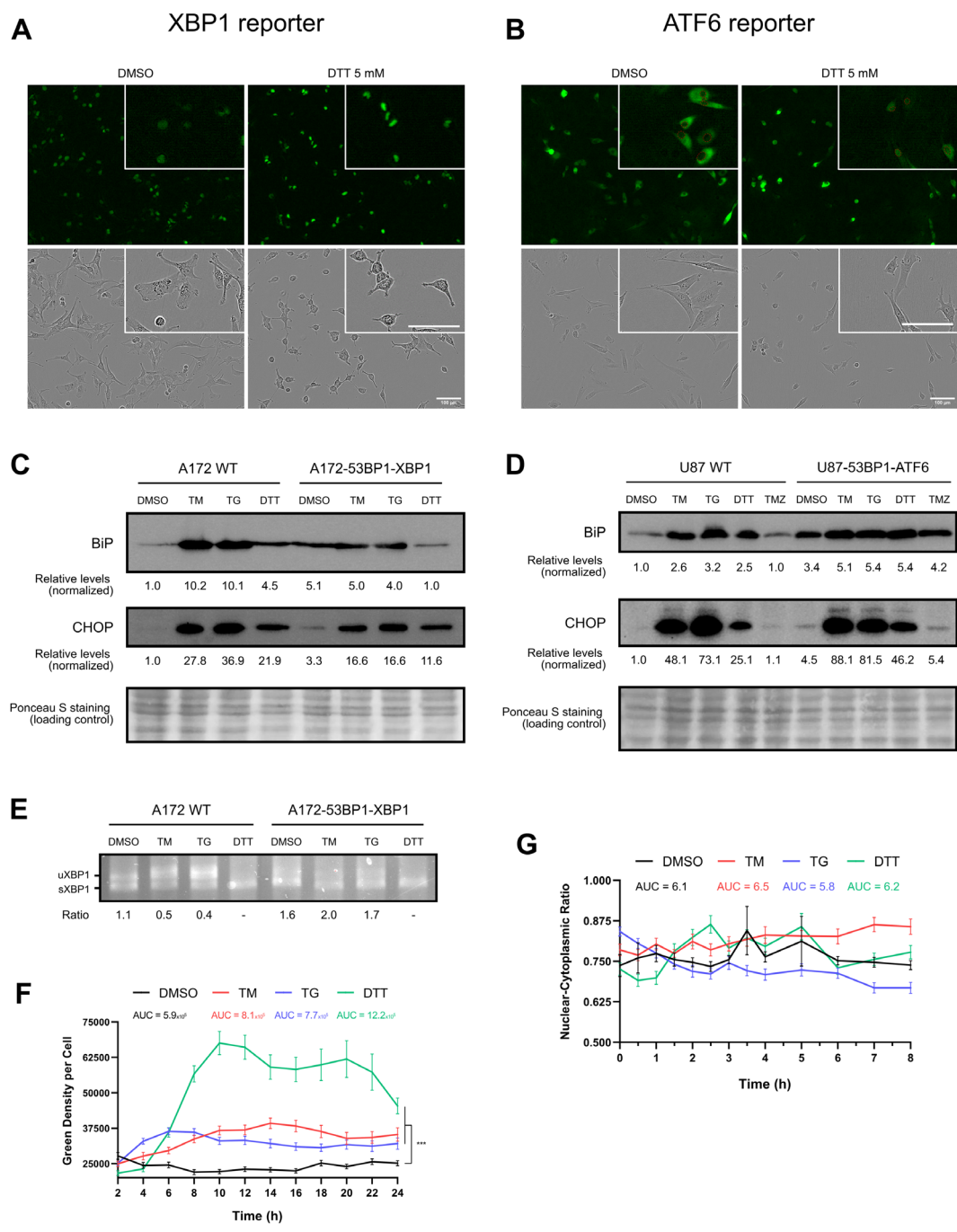
We wish to thank Ralph Weissleder for the Apple-53BP1trunc plasmid (Addgene #69531). We also thank the CBIot/UFRGS facilities for image acquisition.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no competing interests.

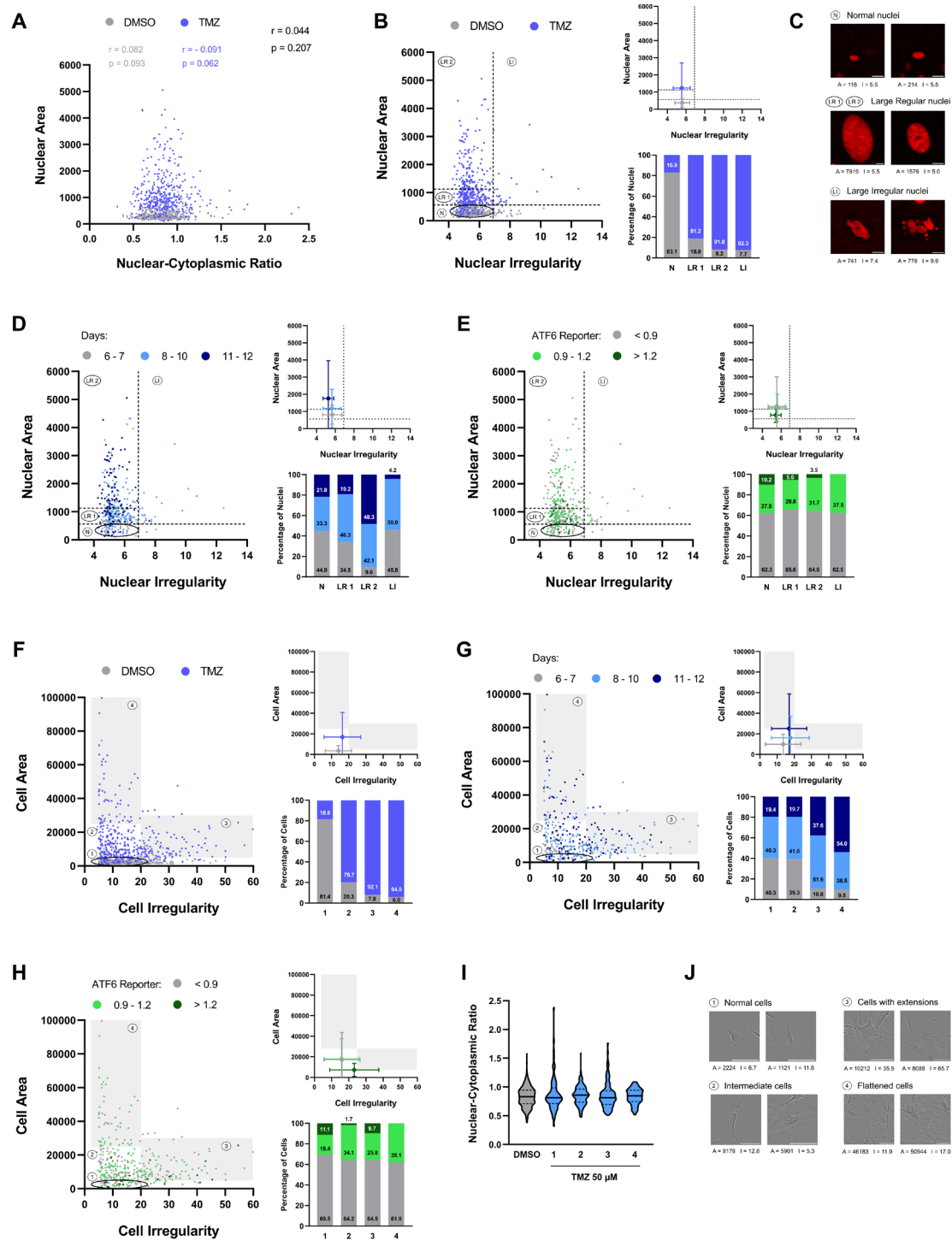
### **Appendix A. Supplementary data**

The following are the Supplementary data to this article.



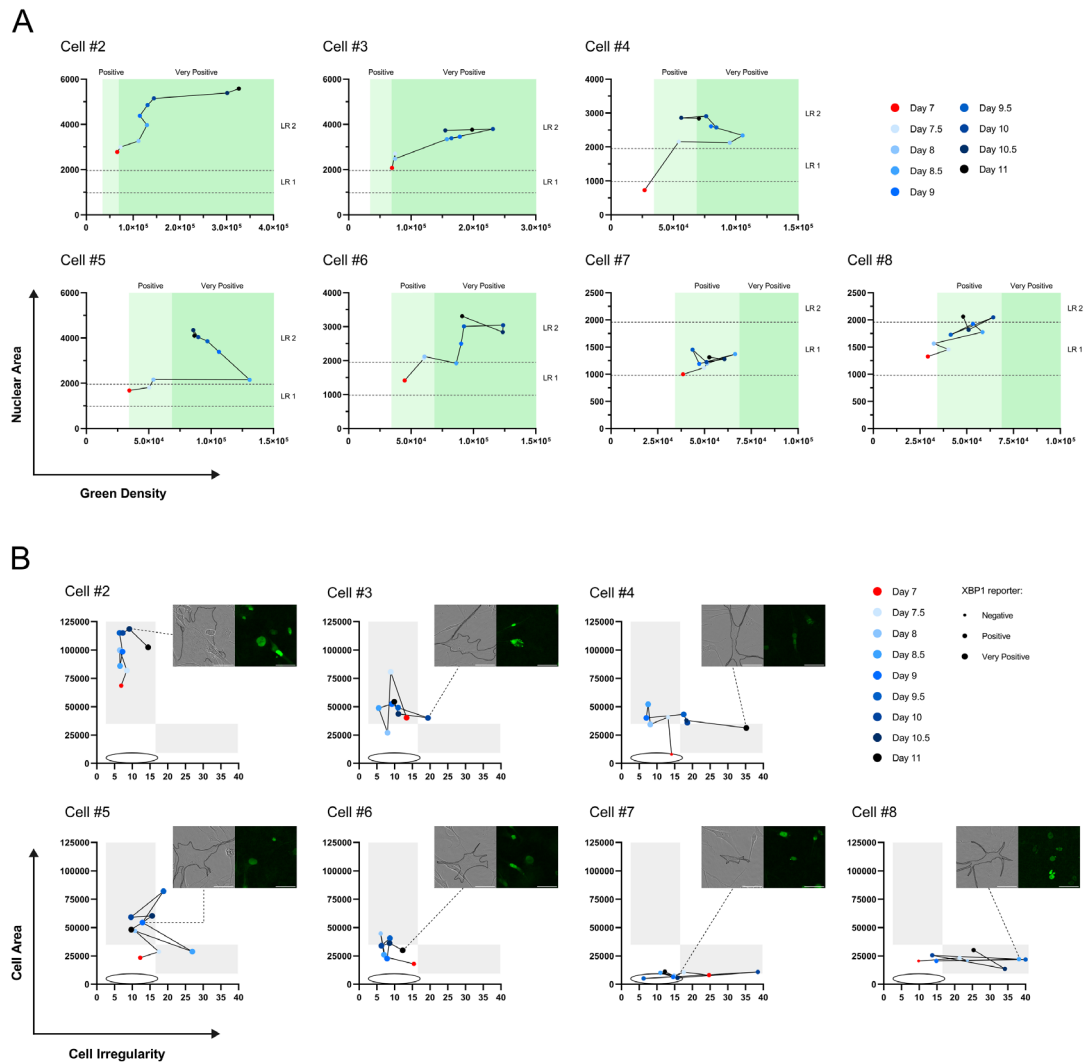
**Figure S1. Generation and validation of XBP1 and ATF6 reporter cell lines.** (A) A172 cells stably expressing the XBP1 reporter were treated with 5 mM DTT or DMSO for 6 h. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) U87 cells stably expressing the ATF6 reporter were treated with 5 mM DTT or DMSO for 2 h. Scale bar = 100  $\mu$ m. Red dotted lines outline the nuclei. (C, D) Western blot analysis of the ER stress markers BiP and CHOP in XBP1 reporter (A172-53BP1-XBP1) and parental wild-type (A172 WT) cells (C) and in ATF6 reporter (U87-53BP1-ATF6) and parental wild-type (U87 WT) cells (D). Cells were treated with 2  $\mu$ M TM, 200 nM TG, 5 mM DTT, 50  $\mu$ M TMZ (for U87 cells only), or 0.1% DMSO and harvested after 16 h (except for A172 cells treated with DTT, which were lysed after 7 h). Ponceau S Red staining was used as a loading control. (E) XBP1 reporter and parental wild-type cells were

treated as described above and harvested after 7 h. XBP1 splicing was analyzed by RT-PCR and agarose gel electrophoresis. The ratio of spliced (sXBP1) to unspliced XBP1 (uXBP1) is indicated; DTT treatment showed only the spliced band. **(F, G)** Green density per cell in XBP1 reporter cells **(F)** and nuclear-cytoplasmic ratio per cell in ATF6 reporter cells **(G)** over time after treatment with ER stress inducers. Error bars indicate SEM of all cells per time point and treatment (n = 150 cells). For each treatment, the area under the curve (AUC) was calculated and ANOVA followed by Tukey's multiple comparison was performed (n = 3 wells).



**Figure S2. ATF6 reporter activation in TMZ-induced senescent phenotypes.** ATF6 reporter cells were treated as described in Figure 2A. Data shown here are from cells during the 7 days after drug withdrawal (days 6 to 12). **(A)** Correlation between nuclear-cytoplasmic ratio and nuclear area. Spearman's correlation coefficient ( $r$ ) and p-value ( $p$ ) are shown. **(B)** On the left, distribution of nuclei in a nuclear morphometric analysis (NMA) plot of area versus irregularity. Nuclei were divided into four categories: normal, large regular 1 (LR1), large regular 2 (LR 2), and large irregular (LI), as indicated. On the top

right, NMA plot showing the mean and SD of each condition. On the bottom right, the percentage of nuclei from DMSO and TMZ conditions in each category is shown. **(C)** Examples of nuclei from the four categories. Area (A) and irregularity (I) are indicated for each nucleus. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ . **(D)** On the left, NMA plot of TMZ-treated nuclei. Colors indicate the number of days after treatment. On the top right, NMA plot showing the mean and SD of each time period. On the bottom right, the percentage of nuclei from each time period in each category is shown. **(E)** On the left, NMA plot of TMZ-treated nuclei. Colors indicate ATF6 reporter activation (nuclear-cytoplasmic ratio). On the top right, NMA plot showing the mean and SD of each activation status. On the bottom right, the percentage of nuclei from each activation status in each category is shown. **(F)** On the left, distribution of cells in a cell morphometric analysis plot of area versus irregularity. Cells were divided into four categories representing relevant phenotypes: normal cells (1), intermediate cells (2), cells with extensions (3), and flattened cells (4), as indicated. On the top right, plot showing the mean and SD of each condition. On the bottom right, the percentage of cells from DMSO and TMZ conditions in each category is shown. **(G)** On the left, cell morphometric analysis plot of TMZ-treated cells. Colors indicate the number of days after treatment. On the top right, plot showing the mean and SD of each time period. On the bottom right, the percentage of cells from each time period in each category is shown. **(H)** On the left, cell morphometric analysis plot of TMZ-treated cells. Colors indicate ATF6 reporter activation (nuclear-cytoplasmic ratio). On the top right, plot showing the mean and SD of each activation status. On the bottom right, the percentage of cells from each activation status in each category is shown. **(I)** Nuclear-cytoplasmic ratio in the different cell categories. Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison was used (DMSO: n = 420; TMZ 1: n = 72; TMZ 2: n = 173; TMZ 3: n = 93; TMZ 4: n = 63). Different letters indicate statistical significance ( $p \leq 0.05$ ). **(J)** Examples of cells from the four categories. Area (A) and irregularity (I) are shown for each cell. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figure S3. Single-cell responses of XBP1 reporter cell line to TMZ treatment. (A)** Nuclear area and green density of representative single cells measured over time. The colors of the dots indicate the number of days after treatment. Dotted lines indicate the threshold values above which nuclei were considered LR 1 and LR 2. The background colors indicate threshold values above which cells were considered positive and very positive for the XBP1 reporter. **(B)** Cell morphometric analysis plot of the single cells shown in **(A)** over time. Colors indicate the number of days after treatment and different sizes represent different activation status of the XBP1 reporter. The gray boxes and the ellipse delineate the different morphologies described in Figure 3F. Representative images of the cells are shown. The black lines outline the cells. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ .

## Data availability

Data will be made available on request.

## References

- [1] C. Hetz, K. Zhang, R.J. Kaufman, Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response, *Nat Rev Mol Cell Biol* 21 (2020) 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>.
- [2] M. Calton, H. Zeng, F. Urano, J.H. Till, S.R. Hubbard, H.P. Harding, S.G. Clark, D. Ron, IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA, *Nature* 415 (2002) 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>.
- [3] K. Haze, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, K. Mori, Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress, *Mol Biol Cell* 10 (1999) 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>.
- [4] J. Wu, D.T. Rutkowski, M. Dubois, J. Swathirajan, T. Saunders, J. Wang, B. Song, G.D.-Y. Yau, R.J. Kaufman, ATF6 $\alpha$  Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress, *Dev Cell* 13 (2007) 351–364. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.005>.
- [5] A.-H. Lee, N.N. Iwakoshi, L.H. Glimcher, XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response, *Mol Cell Biol* 23 (2003) 7448–7459. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003>.
- [6] K. Yamamoto, T. Sato, T. Matsui, M. Sato, T. Okada, H. Yoshida, A. Harada, K. Mori, Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 $\alpha$  and XBP1, *Dev Cell* 13 (2007) 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.018>.
- [7] W. Zhang, Y. Shi, L. Oyang, S. Cui, S. Li, J. Li, L. Liu, Y. Li, M. Peng, S. Tan, L. Xia, J. Lin, X. Xu, N. Wu, Q. Peng, Y. Tang, X. Luo, Q. Liao, X. Jiang, Y. Zhou, Endoplasmic reticulum stress—a key guardian in cancer, *Cell Death Discov* 10 (2024) 343. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02110-3>.
- [8] A. Hernandez-Segura, J. Nehme, M. Demaria, Hallmarks of Cellular Senescence, *Trends Cell Biol* 28 (2018) 436–453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>.
- [9] B. Wang, J. Kohli, M. Demaria, Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes?, *Trends Cancer* 6 (2020) 838–857. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.004>.
- [10] C. Druelle, C. Drullion, J. Deslé, N. Martin, L. Saas, J. Cormenier, N. Malaquin, L. Huot, C. Slomianny, F. Bouali, C. Vercaemer, D. Hot, A. Pourtier, E. Chevet, C. Abbadie, O. Pluquet, ATF6 $\alpha$  regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts, *Oncotarget* 7 (2016) 67699–67715. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11505>.

- [11] C. Denoyelle, G. Abou-Rjaily, V. Bezrookove, M. Verhaegen, T.M. Johnson, D.R. Fullen, J.N. Pointer, S.B. Gruber, L.D. Su, M.A. Nikiforov, R.J. Kaufman, B.C. Bastian, M.S. Soengas, Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway, *Nat Cell Biol* 8 (2006) 1053–1063. <https://doi.org/10.1038/ncb1471>.
- [12] H.S. Kim, Y. Kim, M.J. Lim, Y.-G. Park, S.I. Park, J. Sohn, The p38-activated ER stress-ATF6 $\alpha$  axis mediates cellular senescence, *The FASEB Journal* 33 (2019) 2422–2434. <https://doi.org/10.1096/fj.201800836R>.
- [13] O. Pluquet, A. Pourtier, C. Abbadie, The unfolded protein response and cellular senescence. A Review in the Theme: Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 308 (2015) C415–C425. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2014>.
- [14] C. Drullion, G. Marot, N. Martin, J. Desle, L. Saas, C. Salazar-Cardozo, F. Bouali, A. Pourtier, C. Abbadie, O. Pluquet, Pre-malignant transformation by senescence evasion is prevented by the PERK and ATF6 $\alpha$  branches of the Unfolded Protein Response, *Cancer Lett* 438 (2018) 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.008>.
- [15] J.R. Dörr, Y. Yu, M. Milanovic, G. Beuster, C. Zasada, J.H.M. Däbritz, J. Lisec, D. Lenze, A. Gerhardt, K. Schleicher, S. Kratzat, B. Purfürst, S. Walenta, W. Mueller-Klieser, M. Gräler, M. Hummel, U. Keller, A.K. Buck, B. Dörken, L. Willmitzer, M. Reimann, S. Kempa, S. Lee, C.A. Schmitt, Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy, *Nature* 501 (2013) 421–425. <https://doi.org/10.1038/nature12437>.
- [16] R.A.M. Panganiban, O. Mungunsukh, R.M. Day, X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells, *Int J Radiat Biol* 89 (2013) 656–667. <https://doi.org/10.3109/09553002.2012.711502>.
- [17] M. Ketkar, S. Desai, P. Rana, R. Thorat, S. Epari, A. Dutt, S. Dutt, Inhibition of PERK mediated UPR acts as a switch for reversal of residual senescence and as senolytic therapy in glioblastoma, *Neuro Oncol* (2024). <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae134>.
- [18] C. Abbadie, O. Pluquet, Unfolded Protein Response (UPR) Controls Major Senescence Hallmarks, *Trends Biochem Sci* 45 (2020) 371–374. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.02.005>.
- [19] M.T.C. Poon, C.L.M. Sudlow, J.D. Figueroa, P.M. Brennan, Longer-term ( $\geq 2$  years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis, *Sci Rep* 10 (2020) 11622. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68011-4>.

- [20] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, R.O. Mirimanoff, Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma, *New England Journal of Medicine* 352 (2005) 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>.
- [21] N. Singh, A. Miner, L. Hennis, S. Mittal, Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review, *Cancer Drug Resistance* (2020). <https://doi.org/10.20517/cdr.2020.79>.
- [22] L. Beltzig, C. Schwarzenbach, P. Leukel, K.B.M. Frauenknecht, C. Sommer, A. Tancredi, M.E. Hegi, M. Christmann, B. Kaina, Senescence Is the Main Trait Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells, *Cancers (Basel)* 14 (2022) 2233. <https://doi.org/10.3390/cancers14092233>.
- [23] R. Salam, A. Saliou, F. Bielle, M. Bertrand, C. Antoniewski, C. Carpentier, A. Alentorn, L. Capelle, M. Sanson, E. Huillard, L. Bellenger, J. Guégan, I. Le Roux, Cellular senescence in malignant cells promotes tumor progression in mouse and patient Glioblastoma, *Nat Commun* 14 (2023) 441. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36124-9>.
- [24] E. Fletcher-Sananikone, S. Kanji, N. Tomimatsu, L.F.M. Di Cristofaro, R.K. Kollipara, D. Saha, J.R. Floyd, P. Sung, R. Hromas, T.C. Burns, R. Kittler, A.A. Habib, B. Mukherjee, S. Burma, Elimination of Radiation-Induced Senescence in the Brain Tumor Microenvironment Attenuates Glioblastoma Recurrence, *Cancer Res* 81 (2021) 5935–5947. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-0752>.
- [25] B. Lan, Z. Zhuang, J. Zhang, Y. He, N. Wang, Z. Deng, L. Mei, Y. Li, Y. Gao, Triggering of endoplasmic reticulum stress via ATF4-SPHK1 signaling promotes glioblastoma invasion and chemoresistance, *Cell Death Dis* 15 (2024) 552. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06936-8>.
- [26] P. Pyrko, A.H. Schönthal, F.M. Hofman, T.C. Chen, A.S. Lee, The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas, *Cancer Res* 67 (2007) 9809–9816. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0625>.
- [27] D. Pelizzari-Raymundo, D. Doultinos, R. Pineau, C. Sauzay, T. Koutsandreas, T. Langlais, A. Carlesso, E. Gkotsi, L. Negroni, T. Avril, A. Chatziioannou, E. Chevet, L.A. Eriksson, X. Guillory, A novel IRE1 kinase inhibitor for adjuvant glioblastoma treatment, *IScience* 26 (2023) 106687. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106687>.
- [28] K.M.-Y. Kiang, W. Tang, Q. Song, J. Liu, N. Li, T.-L. Lam, H.C. Shum, Z. Zhu, G.K.-K. Leung, Targeting unfolded protein response using albumin-encapsulated nanoparticles attenuates temozolomide resistance in glioblastoma, *Br J Cancer* 128 (2023) 1955–1963. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02225-x>.

- [29] S. Xu, Y. Liu, K. Yang, H. Wang, A. Shergalis, A. Kyani, A. Bankhead, S. Tamura, S. Yang, X. Wang, C. Wang, A. Rehemtulla, M. Ljungman, N. Neamati, Inhibition of protein disulfide isomerase in glioblastoma causes marked downregulation of DNA repair and DNA damage response genes, *Theranostics* 9 (2019) 2282–2298. <https://doi.org/10.7150/thno.30621>.
- [30] S. Sun, D. Lee, A.S.W. Ho, J.K.S. Pu, X.Q. Zhang, N.P. Lee, P.J.R. Day, W.M. Lui, C.F. Fung, G.K.K. Leung, Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways, *Neuro Oncol* 15 (2013) 562–577. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not005>.
- [31] S. Sun, K. Kiang, G. Leung, Chaperone protein P4HB predicts temozolomide response and prognosis in malignant glioma, *Oncol Lett* 24 (2022) 264. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13385>.
- [32] Y. He, H. Meng, H. Xu, L. Fan, Z. Zhou, B. Xu, L. Sun, Y. Gao, Regulation of Integrated Stress Response Sensitizes U87MG Glioblastoma Cells to Temozolomide Through the Mitochondrial Apoptosis Pathway, *Anat Rec* 301 (2018) 1390–1397. <https://doi.org/10.1002/ar.23839>.
- [33] X. Chen, J. Shen, R. Prywes, The Luminal Domain of ATF6 Senses Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Causes Translocation of ATF6 from the ER to the Golgi, *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 13045–13052. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110636200>.
- [34] A. Nougarede, C. Tesniere, J. Ylanko, R. Rimokh, G. Gillet, D.W. Andrews, Improved IRE1 and PERK Pathway Sensors for Multiplex Endoplasmic Reticulum Stress Assay Reveal Stress Response to Nuclear Dyes Used for Image Segmentation, *Assay Drug Dev Technol* 16 (2018) 350–360. <https://doi.org/10.1089/adt.2018.862>.
- [35] K.S. Yang, R.H. Kohler, M. Landon, R. Giedt, R. Weissleder, Single cell resolution in vivo imaging of DNA damage following PARP inhibition, *Sci Rep* 5 (2015) 10129. <https://doi.org/10.1038/srep10129>.
- [36] E.C. Filippi-Chiela, M.M. Oliveira, B. Jurkovski, S.M. Callegari-Jacques, V.D. da Silva, G. Lenz, Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities, *PLoS One* 7 (2012) e42522. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042522>.
- [37] C.M. Gallagher, P. Walter, Ceapins inhibit ATF6 $\alpha$  signaling by selectively preventing transport of ATF6 $\alpha$  to the Golgi apparatus during ER stress, *Elife* 5 (2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.11880>.
- [38] M. Brada, I. Judson, P. Beale, S. Moore, P. Reidenberg, P. Statkevich, M. Dugan, V. Batra, D. Cutler, Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of

- temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies, *Br J Cancer* 81 (1999) 1022–1030. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690802>.
- [39] I. Heckenbach, G. V. Mkrtchyan, M. Ben Ezra, D. Bakula, J.S. Madsen, M.H. Nielsen, D. Oró, B. Osborne, A.J. Covarrubias, M.L. Idda, M. Gorospe, L. Mortensen, E. Verdin, R. Westendorp, M. Scheibye-Knudsen, Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence, *Nat Aging* 2 (2022) 742–755. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00263-3>.
- [40] J. Belhadj, S. Surina, M. Hengstschläger, A.J. Lomakin, Form follows function: Nuclear morphology as a quantifiable predictor of cellular senescence, *Aging Cell* 22 (2023). <https://doi.org/10.1111/accel.14012>.
- [41] J. Cormenier, N. Martin, J. Deslé, C. Salazar-Cardozo, A. Pourtier, C. Abbadie, O. Pluquet, The ATF6 $\alpha$  arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E 2 intracrine pathway, *Mech Ageing Dev* 170 (2018) 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.08.003>.
- [42] L.Z. Simbilyabo, L. Yang, J. Wen, Z. Liu, The unfolded protein response machinery in glioblastoma genesis, chemoresistance and as a druggable target., *CNS Neurosci Ther* 30 (2024) e14839. <https://doi.org/10.1111/cns.14839>.
- [43] D. Ganini, F. Leinisch, A. Kumar, J. Jiang, E.J. Tokar, C.C. Malone, R.M. Petrovich, R.P. Mason, Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells, *Redox Biol* 12 (2017) 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.002>.
- [44] F. Walter, J. Schmid, H. Düssmann, C.G. Concannon, J.H.M. Prehn, Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival, *Cell Death Differ* 22 (2015) 1502–1516. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.241>.
- [45] L. Matos, A.M. Gouveia, H. Almeida, ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 70 (2015) 924–935. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu129>.
- [46] N. Blazanin, J. Son, A.B. Craig-Lucas, C.L. John, K.J. Breech, M.A. Podolsky, A.B. Glick, ER stress and distinct outputs of the IRE1 $\alpha$  RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (2017) 9900–9905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701757114>.
- [47] F. Cabral-Miranda, G. Tamburini, G. Martinez, A.O. Ardiles, D.B. Medinas, Y. Gerakis, M.D. Hung, R. Vidal, M. Fuentealba, T. Miedema, C. Duran-Aniotz, J. Diaz, C. Ibaceta-Gonzalez, C.M. Sabusap, F. Bermedo-Garcia, P. Mujica, S. Adamson, K. Vitangcol, H. Huerta, X. Zhang, T. Nakamura, S.P. Sardi, S.A. Lipton, B.K. Kennedy, J.P. Henriquez, J.C. Cárdenas, L. Plate, A.G. Palacios, C. Hetz, Unfolded protein

response IRE1/XBP1 signaling is required for healthy mammalian brain aging, *EMBO J* 41 (2022). <https://doi.org/10.15252/embj.2022111952>.

- [48] R. Wallis, D. Milligan, B. Hughes, H. Mizen, J.A. López-Domínguez, U. Eduputa, E.J. Tyler, M. Serrano, C.L. Bishop, Senescence-associated morphological profiles (SAMPs): an image-based phenotypic profiling method for evaluating the inter and intra model heterogeneity of senescence, *Aging* 14 (2022) 4220–4246. <https://doi.org/10.18632/aging.204072>.
- [49] T.C. Bitencourt, J.E. Vargas, A.O. Silva, L.R. Fraga, E. Filippi-Chiela, Subcellular structure, heterogeneity, and plasticity of senescent cells, *Aging Cell* 23 (2024). <https://doi.org/10.1111/accel.14154>.
- [50] P. Kamat, N. Macaluso, C. Min, Y. Li, A. Agrawal, A. Winston, L. Pan, B. Starich, T. Stewart, P.-H. Wu, J. Fan, J. Walston, J.M. Phillip, Single-cell morphology encodes functional subtypes of senescence in aging human dermal fibroblasts., *BioRxiv* (2024). <https://doi.org/10.1101/2024.05.10.593637>.
- [51] N. Sabath, F. Levy-Adam, A. Younis, K. Rozales, A. Meller, S. Hadar, S. Soueid-Baumgarten, R. Shalgi, Cellular proteostasis decline in human senescence, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (2020) 31902–31913. <https://doi.org/10.1073/pnas.2018138117>.

## DISCUSSÃO

A UPR e a senescência celular desempenham papéis fundamentais tanto na progressão tumoral quanto na resposta às terapias anticancerígenas (SCHMITT; WANG; DEMARIA, 2022; ZHANG *et al.*, 2024). A UPR é um conjunto de vias de sinalização ativadas pelo estresse do ER, e suas funções adaptativas são exploradas pelas células tumorais para garantir a sobrevivência em condições adversas. Já a senescência, um estado de parada permanente do ciclo celular, é frequentemente induzida por quimioterápicos que causam danos ao DNA. As células senescentes no tumor possuem um papel paradoxal: inicialmente, agem como supressoras tumorais, mas seu fenótipo secretor modula o microambiente tumoral, promovendo a progressão do tumor e a resistência à terapia. A relação entre a UPR e a senescência ainda não foi completamente elucidada, especialmente no contexto do câncer, mas estudos com diferentes modelos de senescência sugerem que a UPR é um mecanismo importante para o estabelecimento e a manutenção do fenótipo senescente (ABBADIE; PLUQUET, 2020). Portanto, investigar o papel da UPR na TIS é crucial para entender como esses processos interagem e contribuem para a resposta aos tratamentos e, em última instância, como essa relação pode ser explorada para otimizar as terapias existentes.

No caso do GBM, cujo tratamento quimioterápico padrão é a TMZ, a eficácia terapêutica limitada e o desenvolvimento de resistência são comuns (LEE, S. Y., 2016). A senescência é o principal desfecho celular induzido pela TMZ e contribui para a recorrência do tumor (BELTZIG *et al.*, 2022; FLETCHER-SANANIKONE *et al.*, 2021; SALAM *et al.*, 2023). Embora a UPR tenha sido associada à resistência ao tratamento com TMZ em modelos *in vitro* (PEÑARANDA FAJARDO; MEIJER; KRUYT, 2016; SIMBILYABO *et al.*, 2024), pouco se sabe sobre a ativação da UPR em resposta a esse quimioterápico e como ela influencia a TIS. Neste trabalho, investigamos o *crosstalk* entre UPR e TIS em GBM. Avaliamos a dinâmica de ativação de duas importantes vias adaptativas da UPR, IRE1-XBP1 e ATF6, em células tratadas com TMZ, fornecendo novos dados sobre a regulação dessas vias em resposta ao tratamento e sua relevância na TIS.

Para avaliar a ativação das vias da UPR, utilizamos repórteres baseados em proteínas fluorescentes. Essa abordagem possibilita o monitoramento da resposta celular ao longo do tempo, permitindo a análise da dinâmica de ativação em células vivas de GBM tratadas com TMZ. Além disso, foi possível investigar a variabilidade de resposta entre células individuais, que é mascarada em métodos populacionais convencionais, como Western blot ou qPCR. No contexto do tratamento quimioterápico de células tumorais, é essencial capturar a heterogeneidade da resposta dentro da população, pois isso permite identificar diferentes subpopulações com fenótipos e desfechos celulares distintos (ALIEVA *et al.*, 2023). Essa metodologia também nos permitiu acompanhar o estabelecimento e manutenção do fenótipo senescente induzido por TMZ ao longo do tempo, fornecendo uma visão mais precisa da relação temporal entre a ativação das vias da UPR e a TIS.

Para monitorar a ativação da via IRE1-XBP1, utilizamos um repórter fluorescente que detecta o *splicing* do mRNA de XBP1. O *splicing* no repórter altera sua fase de leitura, permitindo a tradução da proteína fluorescente mNeonGreen e resultando no aumento da fluorescência (NOUGARÈDE *et al.*, 2018). No entanto, ao transduzirmos a linhagem A172 com este repórter, observamos uma grande heterogeneidade nos níveis de fluorescência basal e uma resposta limitada a indutores clássicos de estresse do ER (APÊNDICE A). A principal hipótese levantada para explicar a alta variabilidade e baixa sensibilidade do repórter foi que há variação no número de cópias integradas no genoma na população, e células com múltiplas integrações acabam tendo uma sobrecarga na expressão proteica e, portanto, alto estresse do ER basal. Trabalhos anteriores já detectaram indução de estresse pela transdução lentiviral (GOTO *et al.*, 2003; HA *et al.*, 2022). Para resolver essa questão, isolamos linhagens monoclonais, selecionando uma população com baixa fluorescência basal e maior sensibilidade, que foi utilizada no restante do trabalho. Mesmo após várias divisões celulares, a população se manteve homogênea e com baixa fluorescência, sugerindo que a fonte da heterogeneidade na população inicial era de fato genética. O uso da linhagem monoclonal permitiu uma análise mais precisa e sensível da dinâmica de ativação do repórter sob as diferentes condições.

Primeiramente, avaliamos a dinâmica de ativação da via IRE1-XBP1 em resposta aos indutores clássicos de estresse do ER DTT, TM e TG. Os indutores ativaram significativamente o repórter, com o DTT sendo o mais potente. Curiosamente, as cinéticas observadas foram distintas: a TG induziu uma resposta mais rápida, com o pico de ativação ocorrendo horas antes do DTT, enquanto a TM gerou uma resposta ainda mais lenta e gradual. Embora tenhamos testado aqui apenas uma dose de cada indutor, as diferentes cinéticas provavelmente refletem os mecanismos de ação específicos, visto que estudos anteriores também relataram uma ativação mais rápida de IRE1 pela TG em comparação à TM com diferentes dosagens (WALTER *et al.*, 2015). Além disso, a indução de estresse aumentou a variabilidade intercelular em relação aos níveis de ativação do repórter, mesmo em uma população monoclonal. Isso sugere que a heterogeneidade não-genética entre células individuais resulta em respostas distintas ao estresse do ER, apesar de apresentarem níveis basais similares de *splicing* de XBP1. Esses resultados ressaltam a importância das análises de célula única e do acompanhamento dinâmico dos fenótipos.

Além do repórter de *splicing* de XBP1, também utilizamos neste trabalho um repórter para a via da ATF6, que consiste na proteína fluorescente verde EGFP fusionada à ATF6, permitindo o monitoramento da translocação dessa proteína do citoplasma para o núcleo em condições de estresse (CHEN; SHEN; PRYWES, 2002; GALLAGHER; WALTER, 2016). Após a construção do vetor e a transdução lentiviral em células U87, observamos novamente baixa sensibilidade aos indutores clássicos de estresse do ER. Um aumento significativo na porcentagem de células positivas para o repórter foi observado apenas no tratamento com DTT. Como este repórter indica a mudança da localização subcelular da proteína, sua ativação é mais rápida em comparação ao repórter de *splicing* de XBP1, atingindo sua ativação máxima entre duas e três horas após o tratamento. Com base na análise das imagens de microscopia, levantamos a seguinte hipótese para a sensibilidade baixa do repórter: células com expressão elevada da proteína de fusão, apesar de responderem ao estresse e ativarem ATF6, não são capazes de realizar o transporte eficiente do repórter do complexo de Golgi para o núcleo, levando à formação de agregados proteicos no citoplasma, o que dificulta a avaliação dos

níveis de ativação pela translocação nuclear (APÊNDICE B). As estruturas observadas são semelhantes às formadas quando a translocação nuclear de ATF6 é bloqueada e há um acúmulo de marcadores de ATF6 no citoplasma (CHEN; SHEN; PRYWES, 2002; GALLAGHER; WALTER, 2016).

Ambas as linhagens repórteres apresentaram níveis basais elevados de marcadores de estresse do ER em comparação com as linhagens parentais. É possível que isso se deva à expressão constitutiva das proteínas fluorescentes verdes, que são conhecidas por induzir estresse oxidativo ao gerar peróxido de hidrogênio e radicais livres de oxigênio, o que, por sua vez, pode induzir estresse do ER (GANINI *et al.*, 2017; GOTO *et al.*, 2003). Foi recentemente observado que a integração de vetores lentivirais pode ativar a resposta integrada ao estresse, incluindo a via da PERK (HA *et al.*, 2022). Além disso, no caso do repórter de ATF6, há a superexpressão da proteína completa, o que pode interferir nos mecanismos endógenos de detecção e transdução de sinal relacionados ao estresse do ER (CHEN; SHEN; PRYWES, 2002). Apesar disso, as duas linhagens repórteres responderam aos indutores de estresse do ER, com aumento na expressão dos alvos BiP e CHOP. Ainda que a interferência dos repórteres na sinalização endógena de estresse do ER seja uma limitação dos modelos, eles permanecem ferramentas poderosas e relevantes para a investigação da dinâmica de ativação da UPR em células vivas.

O desenho experimental utilizado neste trabalho para o tratamento com TMZ consiste em 5 dias de exposição a 50  $\mu$ M de TMZ seguido por 7 dias de acompanhamento das células em meio livre de droga, de modo a mimetizar o tratamento clínico padrão para pacientes com GBM (SILVA *et al.*, 2016; STUPP, ROGER *et al.*, 2005). A dosagem de TMZ escolhida é menor do que a frequentemente utilizada em estudos *in vitro*, pois consideramos as concentrações plasmáticas observadas em pacientes (BRADA *et al.*, 1999). Além disso, o acompanhamento mais prolongado das células permite observar a indução de senescência (SILVA *et al.*, 2016). Até o momento, os dados disponíveis sobre a resposta da UPR ao TMZ utilizam tratamentos agudos e com doses elevadas, que não refletem a realidade clínica (HE *et al.*, 2018; LAN *et al.*, 2024; PYRKO *et al.*,

2007). Portanto, esse estudo buscou avaliar a ativação da UPR em resposta a doses terapêuticamente relevantes de TMZ e durante a indução de senescência.

Ao contrário de estudos anteriores que sugeriram uma ativação aguda da UPR em resposta ao tratamento com TMZ (HE *et al.*, 2018; LAN *et al.*, 2024; PYRKO *et al.*, 2007), não observamos uma ativação significativa da sinalização de IRE1-XBP1 nos primeiros dias de tratamento. No entanto, após a retirada da droga, essa via foi altamente ativada, e a dinâmica de ativação coincidiu com o aumento do tamanho celular e nuclear, marcadores fenotípicos de senescência (BELHADJ *et al.*, 2023; HECKENBACH *et al.*, 2022; HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018). Observamos uma forte correlação entre esses marcadores e a ativação do repórter, sugerindo que o aumento na atividade de IRE1-XBP1 não é uma resposta direta e aguda aos danos induzidos pela TMZ, mas está associada à aquisição do fenótipo de senescência celular. Corroborando nossos resultados, o tratamento com o quimioterápico doxorrubicina, que também gera danos ao DNA, induziu a ativação de IRE1-XBP1 apenas em células de linfoma capazes de entrar em senescência (DÖRR *et al.*, 2013). Além disso, não há relatos na literatura sobre o aumento de marcadores específicos da via de IRE1 sob tratamento com TMZ, embora a ativação dessa via tenha sido observada durante a RS em fibroblastos e queratinócitos (DRUELLE *et al.*, 2016; DRULLION *et al.*, 2018; MATOS; GOUVEIA; ALMEIDA, 2015). Apesar de esses dados indicarem um aumento do *splicing* de XBP1 na TIS, a sinalização de IRE1-XBP1 tem sido associada ao retardo da senescência em outros modelos (BLAZANIN *et al.*, 2017; CABRAL-MIRANDA *et al.*, 2022). A modulação dessa via em modelos de TIS ainda não foi explorada, sendo uma estratégia interessante para investigar o papel dessa via da UPR nesse contexto.

Analisando a dinâmica de células individuais, observamos que essas células apresentaram um aumento concomitante da atividade da sinalização de IRE1-XBP1 e de marcadores fenotípicos de senescência, corroborando os resultados populacionais. Aproximadamente 75% das células ativaram o repórter de XBP1 e aumentaram a área nuclear simultaneamente nos primeiros dias após a retirada da TMZ. Esse aumento concomitante foi seguido por um padrão menos definido nos dias finais do experimento. Curiosamente, houve uma tendência de as células

ativarem mais expressivamente o repórter antes de aumentarem a área nuclear. Embora esse esclarecimento da sequência temporal dos eventos em células únicas seja extremamente interessante e possa ajudar a elucidar a relação causa-efeito desses eventos celulares, o número de células que conseguimos acompanhar foi pequeno, impedindo a obtenção de conclusões mais precisas.

Semelhante ao que foi observado com os indutores de estresse do ER, o tratamento com TMZ resultou em um aumento na variabilidade celular em relação à atividade da via IRE1-XBP1, o que também foi observado nas características morfológicas, como a área celular e nuclear. Essa variabilidade foi mais evidente nos dias finais do experimento, quando praticamente toda a população celular apresentava marcadores fenotípicos de senescência, sugerindo que as células senescentes possuem alta heterogeneidade fenotípica. De fato, estudos recentes apontam para uma alta heterogeneidade morfológica em populações senescentes (BITENCOURT *et al.*, 2024; KAMAT *et al.*, 2024; WALLIS *et al.*, 2022). Para investigar melhor os fenótipos por trás dessa variabilidade, utilizamos uma abordagem desenvolvida pelo grupo, que se baseia em medidas de área e irregularidade para distinguir diferentes fenótipos morfológicos (FILIPPI-CHIELA, EDUARDO C. *et al.*, 2012). Observamos que, embora os núcleos das células tratadas com TMZ tenham aumentado expressivamente de tamanho, característica típica do fenótipo senescente, não foi possível identificar uma divisão clara de subpopulações morfológicas nucleares. Em contrapartida, a análise da morfologia celular revelou subpopulações com características morfológicas bem definidas e distintas.

Consistente com nossas observações *in vitro*, identificamos o enriquecimento de pelo menos duas subpopulações de células senescentes com morfologias distintas. Um dos fenótipos era composto por células grandes e achatadas, com baixa irregularidade, enquanto o segundo consistia em células com área aumentada, porém com maior irregularidade devido à presença de prolongamentos de membrana. O monitoramento de células individuais ao longo do tempo revelou que elas podem alternar entre esses dois fenótipos senescentes. A atividade da via IRE1-XBP1 estava aumentada em ambas as subpopulações senescentes em comparação às células não senescentes. No entanto, a ativação

foi significativamente maior nas células grandes e achatadas, com 68% delas apresentando altos níveis da sinalização de IRE1-XBP1, em contraste com 37% das células com extensões. Um artigo recente, que utilizou a morfologia celular para agrupar subtipos de fibroblastos senescentes, demonstrou que esses subtipos apresentam diferenças funcionais, incluindo a resposta a tratamentos (KAMAT *et al.*, 2024). Nossos dados, embora representem uma caracterização preliminar, sugerem que as células senescentes induzidas pela TMZ apresentam diferentes fenótipos morfológicos com ativação diferencial da sinalização IRE1-XBP1. Investigações futuras, utilizando marcadores moleculares de senescência, serão necessárias para confirmar se essas subpopulações representam realmente diferentes estados senescentes, além da validação desses resultados com outros marcadores da via IRE1-XBP1.

Uma das limitações deste estudo é o uso exclusivo de marcadores fenotípicos de senescência, como a área celular e nuclear. Embora esses marcadores permitam a análise de células únicas em tempo real e sejam bem estabelecidos na literatura, o limiar que define uma célula senescente não é claro, e o debate sobre quais marcadores ou combinações são mais adequados continua em aberto (GORGOULIS *et al.*, 2019; HERNANDEZ-SEGURA; NEHME; DEMARIA, 2018). A inclusão de marcadores moleculares, como a expressão de p16, é crucial para aumentar a confiabilidade dos resultados e permitir análises mais precisas. Além disso, a ativação do repórter de XBP1 é medida pela intensidade de fluorescência nuclear, e as células senescentes apresentam alterações significativas na área nuclear. Na análise de imagens biológicas, discute-se se é mais apropriado usar a intensidade média de fluorescência ou a soma das intensidades dos pixels, que representa a quantidade total de um marcador em um objeto. Neste estudo, optamos por utilizar a soma, considerando-a mais adequada e realista, visto que normaliza pela área. Contudo, não sabemos se as características de expressão e degradação do marcador se mantêm constantes entre células normais e senescentes. Portanto, embora o marcador de XBP1 seja uma ferramenta útil, interessante e sensível, é importante considerar essas questões ao analisarmos os resultados e tirarmos conclusões.

Como já mencionado anteriormente, a análise da dinâmica fenotípica e da variabilidade entre células únicas foram centrais para os resultados até aqui discutidos. Esse nível de detalhe foi especialmente relevante para capturar as diferenças fenotípicas entre as subpopulações de células senescentes e a sequência temporal entre a ativação de IRE1-XBP1 e o aumento da área nuclear em células individuais. No entanto, embora todos os experimentos tenham sido conduzidos com três replicatas técnicas por condição, isto é, três poços da placa de cultura, uma limitação importante do nosso trabalho foi a ausência de replicatas independentes. A reprodução dos experimentos de forma independente será essencial para garantir maior robustez aos resultados e podermos comentar sobre a reprodutibilidade e generalização dos resultados (LAZIC; CLARKE-WILLIAMS; MUNAFÒ, 2018). Mesmo com essa limitação, a variabilidade célula a célula observada é fundamental para compreender as respostas heterogêneas ao tratamento.

Diferentemente do observado para o repórter da via IRE1-XBP1, a sinalização de ATF6 não foi ativada pelo tratamento com TMZ, nem de forma aguda, nem dias após o tratamento, quando a senescência foi induzida. Esse resultado foi inesperado, considerando que estudos anteriores relataram aumento da expressão de BiP, o principal alvo transcricional de ATF6, após tratamento agudo com TMZ (HE *et al.*, 2018; LAN *et al.*, 2024; PYRKO *et al.*, 2007). Também já foi observado aumento da atividade transcricional de ATF6 em células senescentes (DRUELLE *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2019). No entanto, como discutido anteriormente, as doses de TMZ utilizadas nesses trabalhos foram significativamente maiores, e os estudos em células senescentes não incluíam modelos de TIS. Além disso, foi relatado que fibroblastos ativam a via de ATF6 quando submetidos à senescência replicativa, mas não quando induzidos à senescência por estresse oxidativo, sugerindo que a regulação das vias da UPR pode depender do modelo e do indutor de senescência (MATOS; GOUVEIA; ALMEIDA, 2015). De qualquer forma, não descartamos a hipótese de que a ativação dessa via não tenha sido detectada devido à baixa sensibilidade do nosso marcador. Novas investigações, utilizando marcadores baseados em anticorpos contra ATF6 ou em sua atividade transcricional, como repórteres com luciferase (WANG, Y. *et al.*, 2000), além da realização dos

experimentos com ambos os repórteres nas duas linhagens de GBM, serão necessárias para elucidar essas questões.

Embora não tenhamos detectado uma ativação significativa do repórter da via ATF6 nas células senescentes induzidas por TMZ, identificamos um papel importante de ATF6 na modulação do fenótipo senescente em GBM. A superexpressão de ATF6 induziu o aparecimento de marcadores de senescência em células U87, incluindo a diminuição da proliferação, o aumento da atividade de SA- $\beta$ -gal e o aumento do tamanho nuclear. Efeitos semelhantes da superexpressão de ATF6 já haviam sido demonstrados em um estudo com células de câncer de mama, no qual a atividade transcricional de ATF6 foi necessária para a indução de senescência (KIM *et al.*, 2019). Aqui, embora o repórter estivesse majoritariamente localizado no citoplasma, indicando baixa atividade da via, a expressão do alvo BiP estava aumentada, sugerindo que uma parte da ATF6 superexpressa estava atuando como fator de transcrição ativa, potencialmente causando a indução de senescência. Curiosamente, apenas uma fração das células com superexpressão apresentou os marcadores de senescência, e a população continuou proliferando quando mantida em cultura. Como essa população não foi clonada, é possível que isso seja devido aos diferentes níveis de superexpressão e de atividade transcricional de ATF6 dentro da população.

Notavelmente, a superexpressão de ATF6 potencializou o efeito do tratamento com TMZ, acelerando a indução de senescência. Apenas seis dias após o tratamento, as células com superexpressão já apresentavam uma parada estável na proliferação, e cerca de metade da população era positiva para marcadores de senescência, como aumento da atividade de SA- $\beta$ -gal e núcleos significativamente aumentados. Estudos anteriores sugerem um papel fundamental de ATF6 no fenótipo senescente, com sua modulação afetando significativamente as modificações morfológicas associadas à senescência (CORMENIER *et al.*, 2018; DRUELLE *et al.*, 2016; DRULLION *et al.*, 2018). No entanto, a relevância de ATF6 na TIS ainda não havia sido investigada até o momento. Nossos resultados fornecem evidências de que, nesse contexto, ATF6 desempenha um papel importante, abrindo novas perspectivas para o estudo de ATF6 na TIS. A inibição de ATF6 em células senescentes induzidas por TMZ e outros quimioterápicos será

interessante para investigar como ATF6 influencia o fenótipo da TIS. Além disso, inibir ou silenciar ATF6 antes da indução de TIS poderia esclarecer se sua ausência seria capaz de retardar ou até impedir a entrada em senescência.

Em suma, embora nosso trabalho tenha apresentado limitações, como discutido ao longo dessa sessão, ele resultou em descobertas significativas que exploram áreas ainda em aberto. Investigamos pela primeira vez a dinâmica de ativação das vias adaptativas da UPR IRE1-XBP1 e ATF6 em células senescentes induzidas por TMZ. Nossos resultados demonstraram que a sinalização de IRE1-XBP1, em vez de ser uma resposta aguda à TMZ, é significativamente ativada em células senescentes induzidas pelo tratamento, com variações nos níveis de ativação entre diferentes fenótipos morfológicos senescentes. Além disso, ATF6 potencializou a indução de senescência, evidenciando um papel importante desta via na modulação do fenótipo senescente. Esses achados fornecem novas evidências sobre a ativação das vias da UPR em modelos de senescência, e investigações futuras serão importantes para esclarecer o papel específico dessas vias na TIS em GBM e suas potenciais implicações terapêuticas.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerando os dados discutidos nesse trabalho, as principais conclusões da presente dissertação foram as seguintes:

- I. *Ativação diferencial das vias da UPR em resposta à TMZ:* A via IRE1-XBP1, mas não a ATF6, é ativada em resposta ao tratamento com TMZ em células de glioblastoma.
- II. *Ativação de IRE1-XBP1 em células senescentes:* A ativação da sinalização de IRE1-XBP1 sob tratamento com TMZ não é uma resposta aguda ao dano induzido pela droga, mas está associada com a aquisição do fenótipo de senescência celular.
- III. *Heterogeneidade fenotípica na senescência induzida por TMZ:* Células senescentes apresentam uma alta variabilidade fenotípica, com diferentes morfologias e níveis de ativação da via IRE1-XBP1.
- IV. *Contribuição da via ATF6 na indução de senescência:* A superexpressão de ATF6 em células de glioblastoma induz senescência em parte das células e acelera a indução de senescência por TMZ.

Em suma, este estudo fornece novas descobertas sobre a ativação das vias da UPR IRE1-XBP1 e ATF6 em resposta ao tratamento com TMZ em glioblastoma e ressalta sua relevância na senescência induzida pela terapia. Nossos resultados, juntamente de estudos prévios, indicam que a regulação das vias UPR na senescência é complexa, e o papel específico de suas vias no estabelecimento e na manutenção da senescência ainda precisa ser elucidado. Para melhor compreendermos a regulação e a função das vias da UPR IRE1-XBP1 e ATF6 na senescência induzida por TMZ, investigações adicionais são necessárias. Sendo assim, os próximos passos deste estudo envolvem:

- I. *Confirmação dos resultados com outros marcadores:* Realizar análises baseadas em anticorpos para validar os achados observados

com repórteres fluorescentes, utilizando marcadores das vias da UPR, bem como marcadores moleculares de senescência.

- II. *Impacto da indução de estresse do ER na resposta à TMZ*: Investigar se e como a indução de estresse do retículo endoplasmático em diferentes etapas do tratamento com TMZ influencia na resposta ao tratamento, especialmente na indução ou manutenção da senescência.
- III. *Efeito da inibição de IRE1 e ATF6*: Testar como a inibição, por meio de silenciamento genético ou de inibidores farmacológicos específicos, das vias IRE1 ou ATF6 afeta a resposta das células ao TMZ, com foco na indução e manutenção da senescência.
- IV. *Single-cell tracking*: Utilizar abordagens de *single-cell tracking* para investigar se os níveis basais de ativação das vias IRE1-XBP1 ou ATF6 são capazes de influenciar o desfecho celular em resposta ao tratamento, como proliferação, apoptose ou senescência.
- V. *Resposta a outros quimioterápicos*: Avaliar se a resposta das vias da UPR observada ao tratamento com TMZ é específica ou aplicável a outros quimioterápicos que induzem senescência, como a doxorrubicina.

## REFERÊNCIAS

- ABBADIE, C.; PLUQUET, O. Unfolded Protein Response (UPR) Controls Major Senescence Hallmarks. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 45, n. 5, p. 371–374, maio 2020.
- ACOSTA, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, v. 15, n. 8, p. 978–990, 16 ago. 2013.
- ALIEVA, M. *et al.* Bridging live-cell imaging and next-generation cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, v. 23, n. 11, p. 731–745, 13 nov. 2023.
- ALMANZA, A. *et al.* Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, v. 286, n. 2, p. 241–278, 4 jan. 2019.
- ANCRILE, B.; LIM, K.-H.; COUNTER, C. M. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes & Development*, v. 21, n. 14, p. 1714–1719, 15 jul. 2007.
- ANKEN, E. VAN; BRAAKMAN, I. Versatility of the Endoplasmic Reticulum Protein Folding Factory. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 4, p. 191–228, 11 jan. 2005.
- ANTELO-IGLESIAS, L. *et al.* The role of cellular senescence in tissue repair and regeneration. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 198, p. 111528, set. 2021.
- ATKINS, C. *et al.* Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity. *Cancer Research*, v. 73, n. 6, p. 1993–2002, 15 mar. 2013.
- AUF, G. *et al.* Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 35, p. 15553–15558, 31 ago. 2010.
- BEGNINI, K. R. *et al.* Bioimaging approaches for quantification of individual cell behavior during cell fate decisions. *Biochemical Society Transactions*, v. 50, n. 1, p. 513–527, 28 fev. 2022.
- BELHADJ, J. *et al.* Form follows function: Nuclear morphology as a quantifiable predictor of cellular senescence. *Aging Cell*, v. 22, n. 12, 16 dez. 2023.
- BELTZIG, L. *et al.* Senescence Is the Main Trait Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cells. *Cancers*, v. 14, n. 9, p. 2233, 29 abr. 2022.
- BERTOLOTTI, A. *et al.* Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*, v. 2, n. 6, p. 326–332, 8 jun. 2000.

BITENCOURT, T. C. *et al.* Subcellular structure, heterogeneity, and plasticity of senescent cells. *Aging Cell*, v. 23, n. 4, 30 abr. 2024.

BLAZANIN, N. *et al.* ER stress and distinct outputs of the IRE1 $\alpha$  RNase control proliferation and senescence in response to oncogenic Ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 37, p. 9900–9905, 12 set. 2017.

BRAAKMAN, I.; BULLEID, N. J. Protein Folding and Modification in the Mammalian Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, v. 80, n. 1, p. 71–99, 7 jul. 2011.

BRADA, M. *et al.* Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *British Journal of Cancer*, v. 81, n. 6, p. 1022–1030, 29 nov. 1999.

BRAIG, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, v. 436, n. 7051, p. 660–665, ago. 2005.

CABRAL-MIRANDA, F. *et al.* Unfolded protein response IRE1/XBP1 signaling is required for healthy mammalian brain aging. *The EMBO Journal*, v. 41, n. 22, 17 nov. 2022.

CALFON, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, v. 415, n. 6867, p. 92–96, 3 jan. 2002.

CHANG, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, v. 22, n. 1, p. 78–83, 14 jan. 2016.

CHEN, X.; CUBILLOS-RUIZ, J. R. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, v. 21, n. 2, p. 71–88, 19 fev. 2021.

CHEN, X.; SHEN, J.; PRYWES, R. The Luminal Domain of ATF6 Senses Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Causes Translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 15, p. 13045–13052, abr. 2002.

CHOJAK, R. *et al.* Cellular senescence in glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 164, n. 1, p. 11–29, 17 ago. 2023.

COPPÉ, J.-P. *et al.* Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, v. 6, n. 12, p. e301, 2 dez. 2008.

COPPÉ, J.-P. *et al.* The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 5, n. 1, p. 99–118, 1 jan. 2010.

CORMENIER, J. *et al.* The ATF6 $\alpha$  arm of the Unfolded Protein Response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E 2 intracrine pathway. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 170, p. 82–91, mar. 2018.

DEMARIA, M. *et al.* An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, v. 31, n. 6, p. 722–733, dez. 2014.

DENOYELLE, C. *et al.* Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nature Cell Biology*, v. 8, n. 10, p. 1053–1063, 1 out. 2006.

DÖRR, J. R. *et al.* Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*, v. 501, n. 7467, p. 421–425, 19 set. 2013.

DOWDELL, A. *et al.* Targeting XBP1 mRNA splicing sensitizes glioblastoma to chemotherapy. *FASEB BioAdvances*, v. 5, n. 5, p. 211–220, 13 maio 2023.

DROGAT, B. *et al.* IRE1 Signaling Is Essential for Ischemia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression and Contributes to Angiogenesis and Tumor Growth *In vivo*. *Cancer Research*, v. 67, n. 14, p. 6700–6707, 15 jul. 2007.

DRUELLE, C. *et al.* ATF6 $\alpha$  regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget*, v. 7, n. 42, p. 67699–67715, 12 out. 2016.

DRULLION, C. *et al.* Pre-malignant transformation by senescence evasion is prevented by the PERK and ATF6alpha branches of the Unfolded Protein Response. *Cancer Letters*, v. 438, p. 187–196, dez. 2018.

EGGERT, T. *et al.* Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*, v. 30, n. 4, p. 533–547, out. 2016.

EPPLÉ, L. M. *et al.* Induction of the Unfolded Protein Response Drives Enhanced Metabolism and Chemoresistance in Glioma Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e73267, 15 ago. 2013.

FATHALLAH-SHAYKH, H. M. Genomic Discovery Reveals a Molecular System for Resistance to Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in Cultured Glioma. *Archives of Neurology*, v. 62, n. 2, p. 233, 1 fev. 2005.

FELDHEIM, J. *et al.* Changes of O6-Methylguanine DNA Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation in Glioblastoma Relapse—A Meta-Analysis Type Literature Review. *Cancers*, v. 11, n. 12, p. 1837, 21 nov. 2019.

FILIPPI-CHIELA, EDUARDO C. *et al.* Nuclear Morphometric Analysis (NMA): Screening of Senescence, Apoptosis and Nuclear Irregularities. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. e42522, 8 ago. 2012.

FILIPPI-CHIELA, EDUARDO CREMONESE *et al.* Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy*, v. 11, n. 7, p. 1099–1113, 3 jul. 2015.

FLETCHER-SANANIKONE, E. *et al.* Elimination of Radiation-Induced Senescence in the Brain Tumor Microenvironment Attenuates Glioblastoma Recurrence. *Cancer Research*, v. 81, n. 23, p. 5935–5947, 1 dez. 2021.

GALLAGHER, C. M.; WALTER, P. Ceapins inhibit ATF6 $\alpha$  signaling by selectively preventing transport of ATF6 $\alpha$  to the Golgi apparatus during ER stress. *eLife*, v. 5, 20 jul. 2016.

GANINI, D. *et al.* Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biology*, v. 12, p. 462–468, ago. 2017.

GOEL, S. *et al.* CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*, v. 548, n. 7668, p. 471–475, 16 ago. 2017.

GORGOULIS, V. *et al.* Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, v. 179, n. 4, p. 813–827, out. 2019.

GOTO, H. *et al.* Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Molecular cancer therapeutics*, v. 2, n. 9, p. 911–7, set. 2003.

HA, T. *et al.* Antisense transcription from lentiviral gene targeting linked to an integrated stress response in colorectal cancer cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 28, p. 877–891, jun. 2022.

HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, v. 345, n. 6274, p. 458–460, maio 1990.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, v. 25, n. 3, p. 585–621, dez. 1961.

HAZE, K. *et al.* Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular Biology of the Cell*, v. 10, n. 11, p. 3787–3799, nov. 1999.

HE, Y. *et al.* Regulation of Integrated Stress Response Sensitizes U87MG Glioblastoma Cells to Temozolomide Through the Mitochondrial Apoptosis Pathway. *The Anatomical Record*, v. 301, n. 8, p. 1390–1397, 13 ago. 2018.

HECKENBACH, I. *et al.* Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence. *Nature Aging*, v. 2, n. 8, p. 742–755, 15 ago. 2022.

HERNANDEZ-SEGURA, A. *et al.* Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology*, v. 27, n. 17, p. 2652–2660.e4, set. 2017.

HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, v. 28, n. 6, p. 436–453, jun. 2018.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 2, p. 89–102, 18 fev. 2012.

HETZ, C.; PAPA, F. R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Molecular Cell*, v. 69, n. 2, p. 169–181, jan. 2018.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 8, p. 421–438, 26 ago. 2020.

HOU, X. *et al.* PERK silence inhibits glioma cell growth under low glucose stress by blockage of p-AKT and subsequent HK2's mitochondria translocation. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 9065, 12 mar. 2015.

IURLARO, R.; MUÑOZ-PINEDO, C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS Journal*, v. 283, n. 14, p. 2640–2652, 19 jul. 2016.

KAMAT, P. *et al.* Single-cell morphology encodes functional subtypes of senescence in aging human dermal fibroblasts. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 16 maio 2024.

KANG, T.-W. *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, v. 479, n. 7374, p. 547–551, 9 nov. 2011.

KARAGÖZ, G. E.; ACOSTA-ALVEAR, D.; WALTER, P. The Unfolded Protein Response: Detecting and Responding to Fluctuations in the Protein-Folding Capacity of the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 11, n. 9, p. a033886, set. 2019.

KIM, H. S. *et al.* The p38-activated ER stress-ATF6 $\alpha$  axis mediates cellular senescence. *The FASEB Journal*, v. 33, n. 2, p. 2422–2434, 27 fev. 2019.

KRTOLICA, A. *et al.* Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 21, p. 12072–12077, 9 out. 2001.

KUILMAN, T. *et al.* The essence of senescence. *Genes & Development*, v. 24, n. 22, p. 2463–2479, 15 nov. 2010.

LABERGE, R.-M. *et al.* mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, v. 17, n. 8, p. 1049–1061, 6 ago. 2015.

LAN, B. *et al.* Triggering of endoplasmic reticulum stress via ATF4-SPHK1 signaling promotes glioblastoma invasion and chemoresistance. *Cell Death & Disease*, v. 15, n. 8, p. 552, 1 ago. 2024.

LAZIC, S. E.; CLARKE-WILLIAMS, C. J.; MUNAFÒ, M. R. What exactly is 'N' in cell culture and animal experiments? *PLOS Biology*, v. 16, n. 4, p. e2005282, 4 abr. 2018.

LEE, A.-H.; IWAKOSHI, N. N.; GLIMCHER, L. H. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, n. 21, p. 7448–7459, 1 nov. 2003.

LEE, B. Y. *et al.* Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell*, v. 5, n. 2, p. 187–195, 17 abr. 2006.

LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*, v. 3, n. 3, p. 198–210, set. 2016.

LHOMOND, S. *et al.* Dual IRE1 RNase functions dictate glioblastoma development. *EMBO Molecular Medicine*, v. 10, n. 3, 8 mar. 2018.

LIU, Y. *et al.* Activation of the Unfolded Protein Response via Inhibition of Protein Disulfide Isomerase Decreases the Capacity for DNA Repair to Sensitize Glioblastoma to Radiotherapy. *Cancer Research*, v. 79, n. 11, p. 2923–2932, 1 jun. 2019.

LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, v. 186, n. 2, p. 243–278, jan. 2023.

MADDEN, E. *et al.* The role of the unfolded protein response in cancer progression: From oncogenesis to chemoresistance. *Biology of the Cell*, v. 111, n. 1, p. 1–17, 29 jan. 2019.

MARKOULI, M. *et al.* Targeting of endoplasmic reticulum (ER) stress in gliomas. *Pharmacological Research*, v. 157, p. 104823, jul. 2020.

MATOS, L.; GOUVEIA, A. M.; ALMEIDA, H. ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 70, n. 8, p. 924–935, ago. 2015.

MAUREL, M. *et al.* Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 39, n. 5, p. 245–254, maio 2014.

MICHALOGLOU, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, v. 436, n. 7051, p. 720–724, ago. 2005.

MILANO, L. *et al.* A DNA repair-independent role for alkyladenine DNA glycosylase in alkylation-induced unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 119, n. 9, 23 mar. 2022.

MIMURA, N. *et al.* Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 $\alpha$  is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood*, v. 119, n. 24, p. 5772–5781, 14 jun. 2012.

MOISEEVA, O. *et al.* Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- $\kappa$ B activation. *Aging Cell*, v. 12, n. 3, p. 489–498, 23 jun. 2013.

MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 7, p. 482–496, 23 jul. 2014.

NISHIO, K.; INOUE, A. Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 123, n. 3, p. 263–273, 2 mar. 2005.

NOUGARÈDE, A. *et al.* Improved IRE1 and PERK Pathway Sensors for Multiplex Endoplasmic Reticulum Stress Assay Reveal Stress Response to Nuclear Dyes Used for Image Segmentation. *ASSAY and Drug Development Technologies*, v. 16, n. 6, p. 350–360, ago. 2018.

OHTA, Y. *et al.* Cell–matrix interface regulates dormancy in human colon cancer stem cells. *Nature*, v. 608, n. 7924, p. 784–794, 25 ago. 2022.

OLIVEIRA, F. D. *et al.* Expression of key unfolded protein response genes predicts patient survival and an immunosuppressive microenvironment in glioblastoma. *Translational Medicine Communications*, v. 9, n. 1, p. 5, 23 fev. 2024.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncology*, v. 21, n. Supplement\_5, p. v1–v100, 1 nov. 2019.

PATEL, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, v. 344, n. 6190, p. 1396–1401, 20 jun. 2014.

PEÑARANDA FAJARDO, N. M.; MEIJER, C.; KRUYT, F. A. E. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochemical Pharmacology*, v. 118, p. 1–8, out. 2016.

PONSIOEN, B. *et al.* Quantifying single-cell ERK dynamics in colorectal cancer organoids reveals EGFR as an amplifier of oncogenic MAPK pathway signalling. *Nature Cell Biology*, v. 23, n. 4, p. 377–390, 1 abr. 2021.

POON, M. T. C. *et al.* Longer-term ( $\geq 2$  years) survival in patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 11622, 15 jul. 2020.

PYRKO, P. *et al.* The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Research*, v. 67, n. 20, p. 9809–9816, 15 out. 2007.

READ, A.; SCHRÖDER, M. The Unfolded Protein Response: An Overview. *Biology*, v. 10, n. 5, p. 384, 29 abr. 2021.

RIMAWI, M. F. *et al.* Early efficacy evaluation of ORIN1001, a first in class IRE1 alpha inhibitor, in advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 41, n. 16\_suppl, p. 1092–1092, 1 jun. 2023.

SADAIE, M. *et al.* Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes & Development*, v. 27, n. 16, p. 1800–1808, 15 ago. 2013.

SALAM, R. *et al.* Cellular senescence in malignant cells promotes tumor progression in mouse and patient Glioblastoma. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 441, 27 jan. 2023.

SALEH, T. *et al.* Clearance of therapy-induced senescent tumor cells by the senolytic ABT-263 via interference with BCL-X<sub>L</sub>–BAX interaction. *Molecular Oncology*, v. 14, n. 10, p. 2504–2519, 5 out. 2020.

SCHMITT, C. A.; WANG, B.; DEMARIA, M. Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 19, n. 10, p. 619–636, 31 out. 2022.

SHOULDERS, M. D. *et al.* Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. *Cell Reports*, v. 3, n. 4, p. 1279–1292, abr. 2013.

SILVA, A. O. *et al.* The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Experimental Cell Research*, v. 348, n. 2, p. 177–183, nov. 2016.

SIMBILYABO, L. Z. *et al.* The unfolded protein response machinery in glioblastoma genesis, chemoresistance and as a druggable target. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 30, n. 7, 17 jul. 2024.

SINGH, N. *et al.* Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance*, 2020.

SMITH, M. H.; PLOEGH, H. L.; WEISSMAN, J. S. Road to Ruin: Targeting Proteins for Degradation in the Endoplasmic Reticulum. *Science*, v. 334, n. 6059, p. 1086–1090, 25 nov. 2011.

STUPP, R. *et al.* High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, v. 25, p. iii93–iii101, set. 2014.

STUPP, ROGER *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 10, p. 987–996, 10 mar. 2005.

SUN, S. *et al.* Inhibition of prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide (P4HB) attenuates temozolomide resistance in malignant glioma via the endoplasmic reticulum stress response (ERSR) pathways. *Neuro-Oncology*, v. 15, n. 5, p. 562–577, maio 2013.

SUN, S.; KIANG, K.; LEUNG, G. Chaperone protein P4HB predicts temozolomide response and prognosis in malignant glioma. *Oncology Letters*, v. 24, n. 2, p. 264, 16 jun. 2022.

TIROSH, I. *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*, v. 352, n. 6282, p. 189–196, 8 abr. 2016.

URANO, F. *et al.* Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, v. 287, n. 5453, p. 664–666, 28 jan. 2000.

WALLIS, R. *et al.* Senescence-associated morphological profiles (SAMPs): an image-based phenotypic profiling method for evaluating the inter and intra model heterogeneity of senescence. *Aging*, v. 14, n. 10, p. 4220–4246, 31 maio 2022.

WALTER, F. *et al.* Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. *Cell Death & Differentiation*, v. 22, n. 9, p. 1502–1516, 30 set. 2015.

WANG, B.; KOHLI, J.; DEMARIA, M. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*, v. 6, n. 10, p. 838–857, out. 2020.

WANG, Y. *et al.* Activation of ATF6 and an ATF6 DNA Binding Site by the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 35, p. 27013–27020, set. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World Cancer Report 2014*. . [S.l.: s.n.], 2014.

WU, J. *et al.* ATF6 $\alpha$  Optimizes Long-Term Endoplasmic Reticulum Function to Protect Cells from Chronic Stress. *Developmental Cell*, v. 13, n. 3, p. 351–364, set. 2007.

XU, S. *et al.* Inhibition of protein disulfide isomerase in glioblastoma causes marked downregulation of DNA repair and DNA damage response genes. *Theranostics*, v. 9, n. 8, p. 2282–2298, 2019.

YAMAMOTO, K. *et al.* Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. *Developmental Cell*, v. 13, n. 3, p. 365–376, set. 2007.

YOSEF, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 11190, 6 abr. 2016.

ZHANG, W. *et al.* Endoplasmic reticulum stress—a key guardian in cancer. *Cell Death Discovery*, v. 10, n. 1, p. 343, 30 jul. 2024.

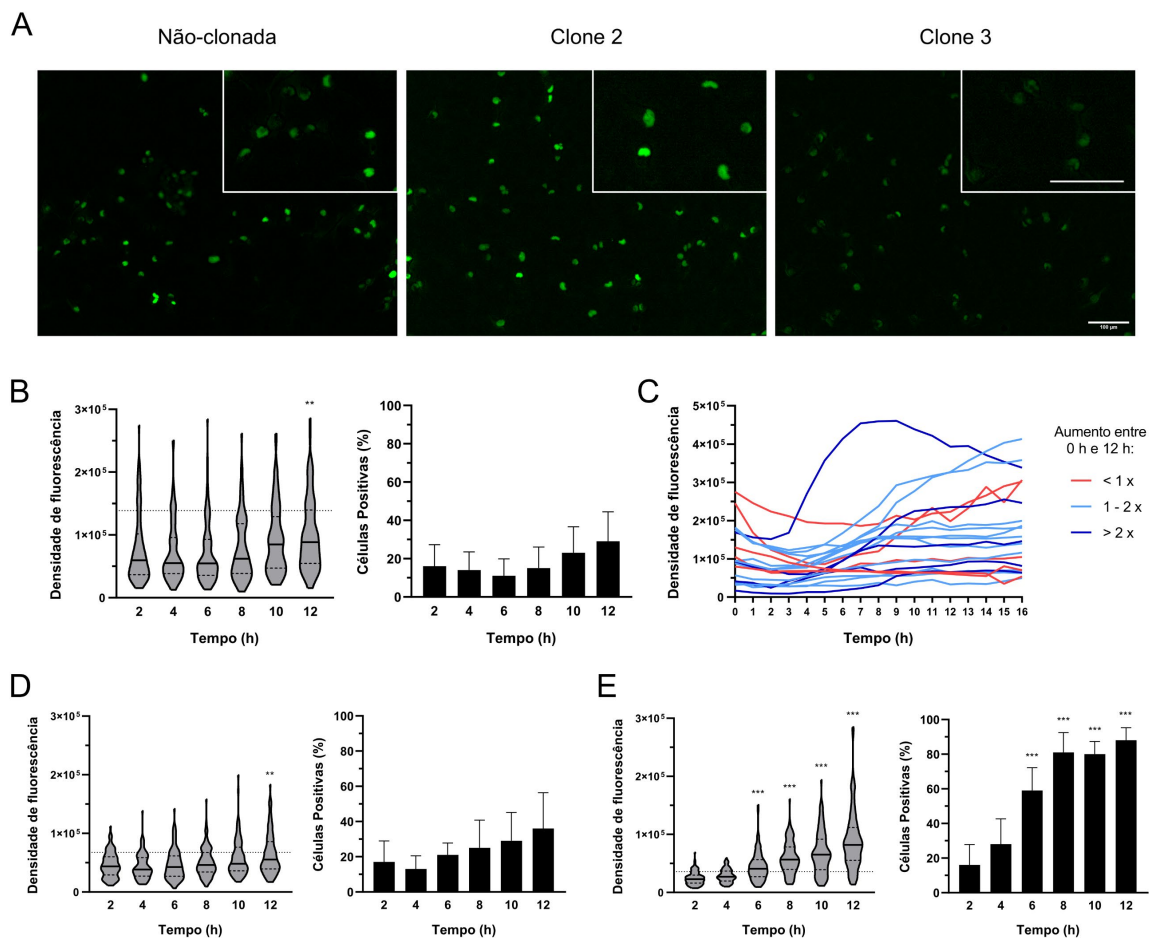
## APÊNDICE A – ISOLAMENTO DE CLONES DA LINHAGEM A172-53BP1-XBP1

A linhagem celular A172 expressando os repórteres Apple-53BP1 e XBP1-mNeonGreen utilizada nesse trabalho foi construída por meio da transdução concomitante desses dois construtos. Ambos foram obtidos da Addgene já inseridos em vetores lentivirais. O construto do repórter XBP1 consiste na sequência de uma região do gene de XBP1 seguido pela sequência da proteína fluorescente verde mNeonGreen. Sob condição de estresse do ER, a proteína IRE1 é ativada e realiza o *splicing* do mRNA de XBP1, retirando um pequeno íntron, que está contido no repórter. Dessa forma, na ausência do íntron, ocorre uma troca na fase de leitura do repórter, permitindo a tradução completa da proteína fluorescente verde. Assim, é possível quantificar os níveis de *splicing* do mRNA de XBP1 e, portanto, a ativação da via da UPR IRE1-XBP1 através do aumento da intensidade de fluorescência verde.

Inicialmente, ao realizarmos a transdução da linhagem A172 com o repórter XBP1, percebemos que havia uma heterogeneidade de intensidade de fluorescência bastante grande, e mesmo sem tratamento já havia células com fluorescência basal elevada (Figura 1A). Também observamos uma ativação pouco significativa do repórter em resposta a indutores clássicos de estresse como o DTT (Figura 1B). Acompanhando células únicas ao longo do tempo, encontramos que células com fluorescência basal elevada eram menos sensíveis à indução de estresse do ER (Figura 1C). Pensamos em duas hipóteses que possivelmente explicam o porquê de haver uma heterogeneidade tão grande antes mesmo da indução de estresse do ER e o motivo de as células não estarem respondendo como esperado ao tratamento. A primeira é que as células receberam quantidades diferentes de insertos dos repórteres no genoma, sendo que células com muitos insertos podem estar sofrendo estresse pela alta produção de proteínas exógenas e, conseqüentemente, ativando a via IRE1-XBP1 mesmo sem indução de estresse externa. A segunda hipótese é que, ao transfectarmos as células HEK produtoras de vírus, essas células sofreram estresse do ER devido aos processos de transfecção e produção viral. Sendo assim, essas células podem ter realizado o *splicing* dos construtos que foram empacotados nos vírus, visto que os lentivírus

produzidos possuem material genético de RNA. Se isso ocorreu, uma porção dos vírus que foram produzidos e posteriormente utilizados para transduzir a linhagem A172 já continham o repórter na sua forma ativa, resultando em altos níveis basais de fluorescência.

Independente do motivo causando a não responsividade da linhagem repórter, considerando os dados da dinâmica de células únicas, achávamos que uma linhagem clonal com fluorescência basal baixa e homogênea seria mais sensível em termos de ativação do repórter. Dessa forma, isolamos linhagens monoclonais a partir da linhagem repórter inicial. Obtivemos linhagens muito mais homogêneas, com diferentes níveis de fluorescência basal (Figura 1A, D e E). Conforme esperado, o clone com menor fluorescência basal foi o que melhor respondeu à indução de estresse do ER e, portanto, foi o escolhido para ser utilizado no restante do trabalho (clone 3, Figura E).



**Figura 1. Isolamento de linhagem monoclonal expressando estavelmente os repórteres 53BP1 e XBP1. (A)** Imagem representativa de células da linhagem A172 expressando estavelmente os repórteres 53BP1 e XBP1. Na esquerda, a linhagem transduzida não-clonada, e, à direita, exemplo de dois clones isolados a partir dela. Barra de escala = 100  $\mu$ m. **(B)** A densidade de fluorescência verde por célula e a porcentagem de células positivas para o repórter XBP1 ao longo do tempo na linhagem não-clonada tratada com DTT 5 mM. A linha pontilhada representa o limiar acima do qual as células foram consideradas positivas para o repórter XBP1 (a média mais um desvio padrão do tempo inicial). Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ( $n = 100$  células) e ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $n = 4$  poços) foram utilizados, respectivamente. **(C)** A densidade de fluorescência verde em células únicas ao longo do tempo após o tratamento com DTT 5 mM. Cada linha representa uma célula ( $n = 21$  células). As cores representam o aumento na densidade de fluorescência entre o tempo 0 h e 12 h, como indicado. **(D e E)** A densidade de fluorescência verde por célula e a porcentagem de células positivas para o repórter XBP1 ao longo do tempo no clone 2 **(D)** e no clone 3 **(E)** tratados com DTT 5 mM. As linhas pontilhadas representam os limiares acima dos quais as células foram consideradas positivas para o repórter XBP1 (a média mais um desvio padrão do tempo inicial). Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ( $n = 100$  células) e ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $n = 4$  poços) foram utilizados, respectivamente. As imagens foram capturadas com a objetiva de 20 x no equipamento Incucyte (Sartorius) e as análises foram feitas no software ImageJ. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.2. \*\* indica  $p \leq 0.01$ , e \*\*\* indica  $p \leq 0.001$ .

## APÊNDICE B – AGREGADOS PROTEICOS NA LINHAGEM U87-53BP1-ATF6

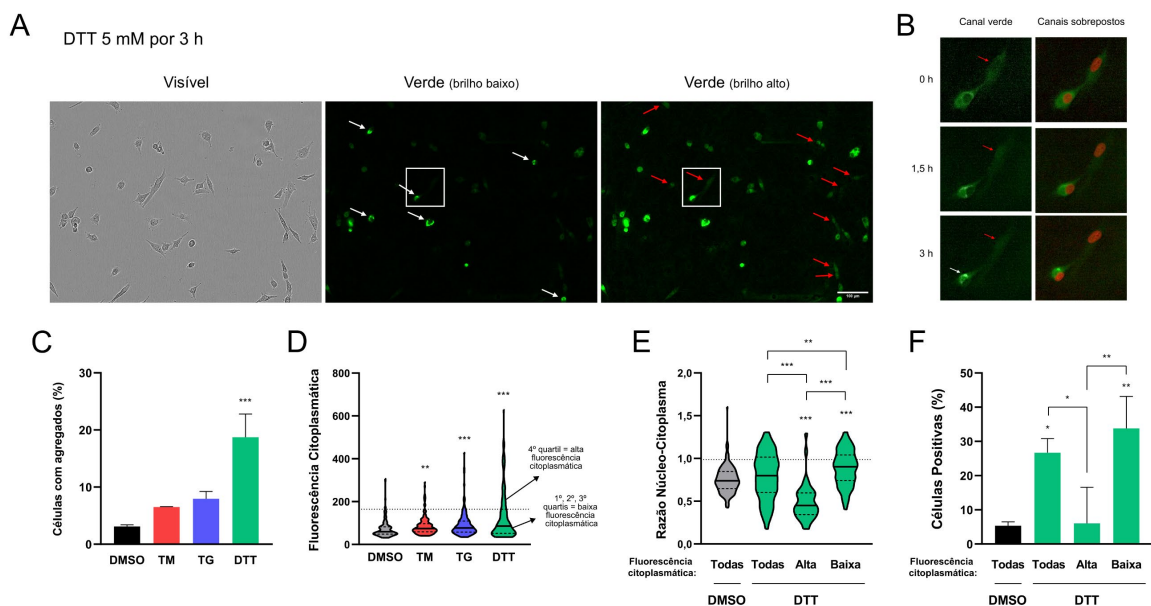
Um dos modelos celulares utilizados neste trabalho foi a linhagem de glioblastoma U87 expressando estavelmente os repórteres fluorescentes EGFP-ATF6 e Apple-53BP1. O repórter ATF6 consiste na proteína fluorescente verde EGFP fusionada à proteína ATF6. Em resposta a condições de estresse do ER, a proteína ATF6 é transportada para o complexo de Golgi, onde é clivada por proteases. Sua porção N-terminal citoplasmática é liberada e atua como fator de transcrição no núcleo. Dessa forma, é possível medir os níveis de ativação da via ATF6 através da razão entre a intensidade de fluorescência verde no núcleo e no citoplasma. Para construir essa linhagem, o construto EGFP-ATF6 sob controle do promotor constitutivo CMV foi amplificado e clonado no *backbone* de um vetor lentiviral. Assim, as células U87 já expressando estavelmente o repórter de dano ao DNA Apple-53BP1 foram transduzidas com o repórter EGFP-ATF6. Ao ser exposta aos indutores clássicos de estresse do ER, a linhagem U87-53BP1-ATF6 não se mostrou muito sensível em relação à ativação do repórter ATF6, que teve uma resposta significativa somente no tratamento com DTT.

Apesar de ser possível observar células com fluorescência predominantemente nuclear após um curto período de tratamento com DTT, como era esperado, também notamos o aparecimento de pontos de acúmulo de fluorescência no citoplasma das células, que provavelmente representam agregados de proteínas de fusão EGFP-ATF6 (Figura 1A e B). Observamos que esses agregados podiam aparecer como um ou mais pontos no citoplasma da célula. De fato, três horas após o tratamento com DTT, quase 20% das células possuíam essas estruturas, e a fluorescência citoplasmática também aumentou em comparação ao controle, podendo representar o surgimento de células com esses acúmulos de EGFP-ATF6 (Figura 1C e D). Separamos as células com uma fluorescência citoplasmática muito elevada do restante, na tentativa de retirar essas células com agregados (Figura 1D). Feita essa separação, a razão núcleo-citoplasma do repórter ATF6 aumentou consideravelmente e passou a se tornar significativamente maior do que o controle (Figura 1E). O mesmo padrão foi observado quando analisamos a porcentagem de células positivas (Figura 1F). Isso

indica que essas células com agregados dificultam a medida dos níveis de ativação do repórter através da translocação núcleo-citoplasma.

Considerando que a proteína ATF6 se localiza no complexo de Golgi quando é clivada antes de ser translocada para o núcleo, acompanhamos algumas células com essas estruturas ao longo do tempo para observar se esses pontos de acúmulo poderiam representar essa localização no Golgi. Porém, os agregados continuaram presentes por todo o período de acompanhamento das células, até 24 h após o tratamento. Em alguns casos, os agregados diminuíram e a célula voltou a apresentar uma fluorescência citoplasmática difusa. Nós não fomos capazes de observar células nas quais a fluorescência se tornou predominantemente nuclear após a formação desses pontos de acúmulos. Dessa forma, apesar de não descartarmos que esse acúmulo de EGFP-ATF6 seja localizado no complexo de Golgi, essas estruturas parecem ser anormalidades do repórter, já que não são capazes de ir para o núcleo como o esperado.

Corroborando com essa hipótese, percebemos que os agregados se formavam em células com uma fluorescência citoplasmática basal mais elevada. Como essa linhagem não é clonal, existe uma grande variabilidade de níveis de fluorescência basal. Assim, nossa principal hipótese a respeito dessas estruturas é que células com expressão muito elevada da proteína repórter EGFP-ATF6 respondem ao estresse do ER, mas, devido à alta quantidade dessa proteína de fusão, não conseguem realizar o transporte do repórter do complexo de Golgi para o núcleo. As mesmas estruturas, mas em quantidades menos significativas, também foram observadas nos tratamentos com TG, TM e TMZ, indicando que isso não é um efeito específico do tratamento com DTT. Mais experimentos são necessários para entender o que de fato são essas estruturas, a localização delas e sua função.



**Figura 1. Formação de agregados citoplasmáticos na linhagem U87-53BP1-ATF6. (A)** Imagem representativa de células da linhagem U87 expressando estavelmente os repórteres 53BP1 e ATF6 tratadas com DTT 5 mM por 3 h. A mesma imagem no canal verde é mostrada, à esquerda, com um menor brilho e, à direita, com um maior brilho. Na primeira, as setas brancas indicam células com agregados de EGFP-ATF6 no citoplasma, enquanto as setas vermelhas sinalizam células com fluorescência predominantemente nuclear. O quadrado branco indica a região da imagem que está em destaque em **(B)**. Barra de escala = 100  $\mu$ m. **(B)** Recorte de duas células ao longo do tempo após tratamento com DTT no canal verde e na sobreposição dos canais verde (EGFP-ATF6) e vermelho (Apple-53BP1). A célula da esquerda forma um agregado de EGFP-ATF6 no citoplasma (seta branca), enquanto a célula da direita apresenta translocação da fluorescência do citoplasma para o núcleo (seta vermelha). **(C)** Porcentagem de células com agregados citoplasmáticos de EGFP-ATF6 após tratamento com TM 2  $\mu$ M, TG 200 nM, DTT 5 mM, ou DMSO 0.1% por 3 h. ANOVA seguida pelo teste de Tukey foi utilizada (n = 3 poços). As barras de erro indicam o desvio padrão. **(D)** Fluorescência citoplasmática por célula após tratamento com os indutores de estresse do retículo. A linha pontilhada divide células com “alta” e “baixa” fluorescência citoplasmática após o tratamento com DTT (quarto quartil e primeiro a terceiro quartis, respectivamente). Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi utilizado (n = 150 células). **(E)** A razão entre a fluorescência verde nuclear e citoplasmática nas células tratadas com DTT ou DMSO. As células tratadas com DTT foram separadas entre “alta” e “baixa” fluorescência citoplasmática, conforme ilustrado em **(D)**. A linha pontilhada representa o limiar acima do qual as células foram consideradas positivas para o repórter ATF6 (a média mais meio desvio padrão da condição controle). Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foi utilizado (DMSO: n = 150; DTT “Todas”: n = 150; DTT “Alta”: n = 37; DTT “Baixa”: n = 113). **(F)** Porcentagem de células positivas para o repórter ATF6. ANOVA seguida pelo teste de Tukey foi utilizada (n = 3 poços). Barras de erro indicam o desvio padrão. As imagens foram capturadas com a objetiva de 20 x no equipamento Incucyte (Sartorius) e as análises foram feitas no software ImageJ. As análises estatísticas

foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.2. \* indica  $p \leq 0.05$ , \*\* indica  $p \leq 0.01$ , e \*\*\* indica  $p \leq 0.001$ .

## **CURRICULUM VITAE resumido**

**OLIVEIRA, F. D.**

### **1. DADOS PESSOAIS**

**Nome:** Fernanda Dittrich Pinto Oliveira

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil,  
27/12/2000

**Endereço profissional:** Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica,  
Prédio 43431, Sala 115. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Agronomia,  
Porto Alegre, 91501-970, Brasil

**Telefone:** (51) 998808095

**E-mail:** fefe.doliveira@gmail.com

### **2. FORMAÇÃO**

**2022 - 2024:** Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz. Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**2018 - 2022:** Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### **3. ESTÁGIOS**

**2019 - 2022:** Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Prof. Dr. Guido Lenz. Atividades desenvolvidas: cultura celular, citometria de

fluxo, microscopia de fluorescência, Western blot, ensaios enzimáticos, análise de dados de RNAseq e scRNAseq. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**2021-2021:** Estágio curricular em Controle de Qualidade Microbiológico na empresa Pharmacontrol Laboratório de Controle de Qualidade Ltda. Supervisora: Dra. Giovana Piva Peteffi. Atividades desenvolvidas: preparo de meios de cultivo e reagentes, preparo de amostras, realização de análises físico-químicas e microbiológicas, limpeza e organização do laboratório, registro dos resultados analíticos.

**2018 - 2018:** Bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Neuroproteção e Doenças Metabólicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientadora: Profa. Dra. Angela Wyse. Atividades desenvolvidas: Western blot, ensaios enzimáticos, manuseio de animais, testes comportamentais em animais. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### **4. ARTIGOS PUBLICADOS**

1. GÜNDEL, S. DA S. et al. Nanoencapsulation of etoposide promotes increased long-term DNA damage, greater induction of senescence and reduces population regrowth of lung cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 100, p. 106091, out. 2024.
2. KIRSTEN, L. N. et al. Oriented Cell Dataset: efficient imagery analyses using angular representation. **bioRxiv**, abr. 2024.
3. OLIVEIRA, F. D. et al. Expression of key unfolded protein response genes predicts patient survival and an immunosuppressive microenvironment in glioblastoma. **Translational Medicine Communications**, v. 9, n. 1, p. 5, 23 fev. 2024.

4. VEDOVATTO, S. et al. CD73 mitigates ZEB1 expression in papillary thyroid carcinoma. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 145, 22 fev. 2024.
5. ISER, I. C. et al. The crossroads of adenosinergic pathway and epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, p. 202–213, nov. 2022.

## **5. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

OLIVEIRA, F. D. et al. Dynamics between unfolded protein response and cellular senescence in glioblastoma cell lines. **XXII Congress of Brazilian Society for Cell Biology**, jul. 2024.