

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

Dinâmica fenotípica em tumores e o papel das mitocôndrias na resposta à
quimioterapia

Luana Suéling Lenz
Orientador: Guido Lenz

PORTO ALEGRE
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
TESE DE DOUTORADO

Dinâmica fenotípica em tumores e o papel das mitocôndrias na resposta à
quimioterapia

Luana Suéling Lenz

Tese submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do título
de Doutora em Ciências

Orientador: Guido Lenz

PORTO ALEGRE
junho de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Lenz, Luana Suéling
Dinâmica fenotípica em tumores e o papel das
mitocôndrias na resposta à quimioterapia / Luana
Suéling Lenz. -- 2021.
131 f.
Orientador: Guido Lenz.

Tese (Doutorado) -- 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,
2021.

1. Câncer. 2. Tolerância. 3. Dinâmica fenotípica.
4. Mitocôndrias. 5. Mitose assimétrica. I. Lenz,
Guido, orient. II. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho 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 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu agradeço às agências de financiamento e à UFRGS por terem possibilitado o desenvolvimento deste trabalho. Aos servidores públicos que se dedicam a manter a universidade, aos contribuintes brasileiros e todos aqueles que lutam por educação pública de qualidade.

Em especial, agradeço ao professor Guido que confiou no meu trabalho e me possibilitou um grande aprendizado. Esses anos de doutorado sob sua orientação me fizeram crescer pessoal e profissionalmente, és um exemplo de profissional e de ser humano, e tenho muito orgulho de ter feito parte do time Labsinal.

Ao meu companheiro e amigo, Luis Felipe, que sempre me apoiou e incentivou, e que me escuta nas horas mais difíceis e é capaz de me fazer rir mesmo quando só quero chorar. Aos meus pais, Tarcísio e Lizete, e ao meu Irmão, que sempre me incentivaram a estudar e a buscar meus sonhos, e que apesar das nossas diferenças sempre estão ao meu lado.

Aos colegas do Labsinal, obrigada por todas as discussões, risadas e parceria. Em especial agradeço à Luiza e a Daphne que confiaram em mim como co-orientadora de TCC, e à Daphne pela ajuda como aluna de iniciação científica durante os quatro anos de doutorado.

Às gurias do Logemann, obrigada por manterem a amizade mesmo de longe e me darem tantos motivos de rir. Às gurias do ap 13 obrigada por todas risadas, conversas, piñas coladas, e especialmente a Jana pela paciência, por tantas vezes que escutou meus desabafos e pelo companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
1. Câncer e seus aspectos gerais	12
1.1 Gliomas e glioblastoma.....	14
2. Heterogenidade Tumoral	17
2.1 Mitose assimétrica como fonte de heterogenidade intratumoral	20
3. Resistência e tolerância.....	21
3.1. Mecanismos de resistência e tolerância	23
4. Dinâmica fenotípica e o estudos em células únicas	26
4.1 Análises de células únicas e dinâmica através de proteínas fluorescentes ..	29
5. Metabolismo e Mitocôndrias	33
5.1 Respiração mitocondrial e metabolismo	34
5.2 Controle da apoptose.....	39
5.3 Dinâmica mitocondrial.....	41
5.4 Heterogenidade mitocondrial	43
6. Hipóteses de trabalho.....	45
OBJETIVOS	46
OBJETIVO GERAL.....	46
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
CAPITULO I	47
CAPITULO II	76
CAPITULO III	81
DISCUSSÕES INTEGRADAS.....	102
CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS.....	111
APÊNDICE	127
CURRÍCULO VITAE	128

ABREVIATURAS E SIGLAS

53BP1 - proteína 1 de ligação a p53 supressora de tumor

ADP – difosfato de adenosine (*adenosine diphosphate*)

APAF1 - Fator de ativação da peptidase apoptótica (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*)

ATP – trifosfato de adenosine (*adenosine triphosphate*)

inibidor de ciclina dependente que quinase 1A cyclin dependent kinase inhibitor 1A

CDKN1A - inibidor de ciclina dependente que quinase 1A (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*)

CRISPR - Repetições palíndromicas curtas agrupadas regularmente espaçadas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

crRNA – CRISPR RNA

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal humano (*Human epidermal growth factor receptor*)

GFAP - Proteína fibrilar ácida glial (*Glial fibrillary acidic protein*)

HDR - Reparo direcionado por homologia (*Homology-directed repair*)

HER2 - Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*)

HR - Receptor de hormônio (*Hormone Receptor*)

HSC - Célula tronco hematopoiética (*Hematopoetic Stem Cell*)

IDH1 - Isocitrato desidrogenase dependente de NADP + (*NADP+-dependent Isocitrate Dehydrogenase*)

ITH - Heterogenidade intratumoral (*Intratumor Heterogeneity*)

Ki67 - marcador de proliferação Ki67 (proliferation marker *Ki67*)

MAPK - proteína quinase ativada por mitogênio (*mitogen-activated protein kinase*)

MFN1 e 2 - Mitofusina 1 e 2 (*Mitofusin 1 and 2*)

MGMT: O-6-metilguanine-DNA metiltransferase

MOMP - Permeabilização da membrana mitocondrial externa (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*)

mtDNA - DNA mitocondrial (*mitochondrial DNA*)

NCI - Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute*)

NHEJ - União de extremidades não homólogas (*Nonhomologous end joining*)

NHGRI - Instituto Nacional de Pesquisa sobre o Genoma Humano (*National Human Genome Research Institute*)

NIH - Instituto Nacional de Saúde (*National Institute of Health*)

OPA1 - Dinamina mitocondrial tipo GTPase (*Mitochondrial Dynamin Like GTPase*)

OXPHOS - Fosforilação oxidativa (*Oxidative phosphorylation*)

p75NTR - receptor de neurtrofina P75 (*Neurotrophin receptor P75*)

PGC-1 α - Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)

PGC-1 β - Coativador 1-beta do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta*)

PML - Proteína de leucemia promielocítica (*Promyelocytic Leukemia protein*)

PPRC - Proteína 1 relacionada ao coativador de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1*)

RB – corepressor transcricional 1 RB (*RB transcriptional corepressor 1*)

ROS - Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

rRNA - RNA ribossomal (*ribosomal RNA*)

RTK - Receptor tirosina quinase (*Receptor Tyrosine Kinase*)

sgRNA - RNA guia único (*single-guide RNA*)

SMARCA4 - SWI/SNF relacionado, matriz associado, regulador de cromatina dependente de actina, subfamília a, membro 4 (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*)

TALENs - Nucleases efetoras do tipo ativador (*Transcription Activator-Like*)

TCA - Ciclo do ácido tricarbóxico ou ciclo de krebs (*Tricarboxylic acid cycle*)

TCGA - Atlas do genoma do cancer (*The Cancer Genome Atlas*)

TMZ - Temozolomida (*temozolomide*)

TP53 - proteína tumoral p53 (*Tumoral Protein 53*)

tracrRNA – transactivador de crRNA (*transactivator of crRNA*)

tRNA - RNA transportador (*transporter RNA*)

ZFPs - proteínas dedos de zinc (*Zinc Finger Protein*)

2-HG - 2-hydroxyglutarato (*2-hydroxyglutarate*)

α -KG - α -cetoglutarato (*α -ketoglutarate*)

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública que leva milhares de pessoas à óbito todo ano. O maior desafio para a terapia é a evolução tumoral, e embora a seleção de células resistentes tenha um importante papel nesse processo, está cada vez mais claro que outros mecanismos estão envolvidos. Entre esses mecanismos, características celulares que mudam ao longo do tempo (dinâmicas fenotípicas) devem contribuir para a tolerância de células tumorais, que eventualmente podem se tornar resistentes. Nesse sentido, esta tese tem como principal objetivo identificar características que contribuam para o desenvolvimento da tolerância através de flutuações que geram diferenças entre células clonais (geneticamente idênticas). Os resultados alcançados mostram que a capacidade de deixar descendentes (*fitness*) varia entre células clonais, em situação controle e após tratamento com temozolomida (TMZ). Esses achados são de extrema relevância para a biologia tumoral já que o *fitness* é a característica que vai determinar se a doença irá progredir ou não, e foram possíveis através da formulação de uma nova metodologia para avaliar dinâmica fenotípica chamada de Dynafit (análise da dinâmica de fitness – *Dynamic Analysis of Fitness*). Alguns fenótipos que contribuem para essa instabilidade foram identificados: atividade de ERK, dessincronização do ciclo celular, dano ao DNA e indução de senescência. Ainda, a modulação epigenética reduziu a instabilidade fenotípica e a morte fractional em colônias. Por fim, foi demonstrado a ocorrência de partição assimétrica mitocôndrial, que contribui para a geração de heterogenidade, que por sua vez é um dos principais obstáculos no tratamento de glioblastomas. Uma vez que a massa mitocôndrial tem um impacto sobre o *fitness*, como sugerido por outros e confirmado na presente tese, a ocorrência de partição assimétricas dessa organela gera células irmãs com diferentes níveis de sensibilidade. Também, foi demonstrado que a massa e a rede mitocôndrial são alteradas em resposta à TMZ. As conclusões deixam claro que para o aumento da eficácia do tratamento de tumores a instabilidade fenotípica deve ser levada em consideração, uma vez que a tolerância gerada por essa instabilidade contribui para o desenvolvimento da resistência e recidiva da doença.

ABSTRACT

Cancer is a public health problem that kills thousands of people every year. The major challenge to therapy is the tumor evolution, and even though the selection of resistant clones has an important role in this process, it is clear now that other processes are involved. Among them, cellular characteristics that change over time (phenotypic dynamics) must contribute to the tolerance of tumoral cells, that eventually can become resistant. In that regard, this thesis has as a major aim to identify characteristics that contribute to the development of tolerance through fluctuations that generate differences in clonal cells (genetically identical). The results show that the capacity to leave descendants (fitness) varies between clones, both in control and after treatment with temozolomide (TMZ). These findings are relevant to tumoral biology once the fitness is the characteristic that will determine if the disease progresses or not, and were achieved through the formulation of a new methodological approach to evaluate the phenotypic dynamic named Dynafit (Dynamic Analysis of Fitness). Some phenotypes that contribute to the instability of fitness were identified: ERK activity, cell cycle desynchronization, DNA damage and induction of senescence. Yet, the epigenetic modulation reduced the phenotypic instability and the fractional killing inside colonies. Finally, it was demonstrated the occurrence of asymmetric partition of mitochondria, that contributes to the generation of heterogeneity, that in turn is one of the main obstacles in the treatment of glioblastomas. Once the mitochondrial mass has an impact on fitness, as suggested by others and confirmed in this thesis, the occurrence of asymmetric partition of mitochondria generates sister cells with differences in sensitivity. Additionally, it was demonstrated that the mitochondrial mass and network are modified in response to TMZ. The conclusions clarify that to increase the effectiveness of tumor treatment, the phenotypic instability must be considered, once the tolerance generated through phenotypic instability contributes to the development of resistance and relapse of the disease.

INTRODUÇÃO

1. Câncer e seus aspectos gerais

O termo câncer se refere ao conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento anormal de células, e com capacidade de invasão de tecidos. Em geral esse crescimento é provocado pelo acúmulo de alterações no DNA, o que explica porque o câncer é considerado uma doença genética. Só no Sistema Nervoso Central, era estimado para o ano de 2020 o diagnóstico 11 mil casos para cada 100 mil habitantes no Brasil (disponível em www.inca.com.br, acessado 05/05/21).

Os tumores são conhecidos por terem diversas características em comum. Entre elas, são destacadas 10 características que sustentam o desenvolvimento tumoral, conhecidas como *Hallmarks of cancer*, e representados na Figura 1 (HANAHAN & WEINBERG 2000, 2011). Apesar dessas semelhanças, tumores são bastante heterogêneos, como descrito abaixo.

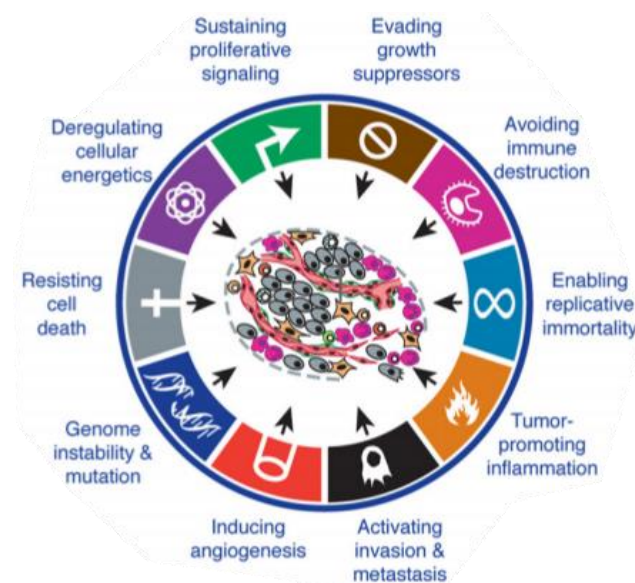


Figura 1. Hallmarks of cancer. Tumores apresentam diversas características em comuns que são essenciais para o desenvolvimento e progressão da doença.

De maneira geral, o curso da doença consiste no período de tumorigênese, com acúmulo de mutações e expansões clonais, um período de diversificação, podendo evoluir para a invasão e metástases, e finalmente podem ocorrer a resistência, que leva a falhas na intervenção terapêutica, e a reincidência. Segundo o modelo de evolução clonal (NOWEL 1976), tumores são gerados pela expansão de um clone, cuja modificação genética gerou vantagem adaptativa, e se torna heterogêneo ao longo do tempo, devido à expansões subclonais. Nesse cenário, a instabilidade genética, característica dos tumores, funciona como uma fonte de diversificação e combustível para a evolução. Por outro lado, no modelo do *Big Bang* (SOTTORIVA *et al* 2015), é sugerido que o crescimento da massa tumoral ocorre de maneira neutra, sem pressão positiva. Assim as características do tumor, bem como a sua heterogenidade, são definidas muito cedo durante a tumorigênese, portanto os tumores “nascem para ser maus”, uma vez que as características necessárias para a metástase estariam presentes já após a transformação.

As modificações genéticas no câncer são divididas em dois grandes grupos: *drivers* e *passangers*. A primeira se refere àquelas modificações que provocam uma alteração positiva sobre o fitness celular e está associada com a iniciação ou progressão da doença, enquanto a segunda são modificações sem essa característica mas que podem aparecer na massa tumoral por “ter pego carona” com as mutações *drivers*. As alterações genéticas apresentam ainda epistasia, as quais dependem do contexto, e pode ser na forma de co-ocorrência ou exclusividade mútua (PARK & LEHNER 2015). A vantagem adaptativa de alterações *drivers* pode ser vista como um alvo para o tratamento de tumores, nas chamadas terapias alvo, cujo caso de maior sucesso é a implementação do imatinibe em pacientes com leucemia mielóide crônica (DRUKER *et al* 2001). A falha dessas terapias alvo se dá principalmente devido à alta heterogeneidade tumoral e pela plasticidade e capacidade adaptativa. Ainda sobre as modificações genéticas, elas podem ocorrer em proto-oncogenes, onde se encontram mutações de ativação ou amplificações, como é o caso das vias dos receptores de tirosina quinase (RTK); ou em genes supressores tumorais, onde se encontram as

mutações de perda de função ou deleções, como é o caso dos genes codificantes da proteína tumoral p53 (*TP53*) e do corepressor transcricional 1 RB (*RB*).

Além das alterações genéticas, tem sido demonstrado que alterações epigenéticas também têm um papel importante no desenvolvimento e na progressão tumoral. Esse termo faz referência a informação que pode ser passada para células filhas mas que não é codificada na sequência de nucleotídeos e pode ser tanto na forma de modificação de histonas, metilação do DNA ou mecanismos que sustentam vias de sinalização, tais como mecanismos de retroalimentação - contanto que uma resposta é sustentada depois que o estímulo original cesse, podemos falar de epigenética (BONASIO 2010). Em eucariotos multicelulares a epigenética é tão importante que pode gerar os mais diversos tipos celulares a partir de um único genoma, ou ser responsável pelo desenvolvimento de fenótipos distintos, como é o caso do desenvolvimento de abelhas operárias ou rainha (FORET *et al* 2012).

Nesse sentido, o primeiro passo em direção a tumorigênese causada por fumaça de cigarro são as alterações epigenéticas (VAZ *et al* 2017). Em gliomas, a mutação mais frequente é no gene isocitrato desidrogenase 1 dependente de NADP + (*IDH1*), alcançando 35% (disponível em <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>, acessado em 10/08/20). Essa mutação provoca uma alteração no perfil epigenético, isso porque a mutação altera a função da enzima que originalmente deveria converter isocitrato a α -cetoglutarado (α -KG), para uma nova função que converte α -KG a 2-hidroxioglutarato (2-HG). Essa molécula é considerada um oncometabólito e age por ação inibitória sobre enzimas que utilizam α -KG como co-fator, incluindo histonas demetilases (PRENSNER & CHINNAIYAN 2011, PHILLIPS *et al* 2020). A mutação de substituição do resíduo de lisina 27 da histona H3 (cuja metilação leva à inibição da transcrição) para um resíduo de metionina (PHILLIPS *et al* 2020), e mutações de inativação no gene de SWI/SNF relacionado, matriz associado, regulador de cromatina dependente de actina, subfamília a, membro 4 (*SMARCA4*) (cuja proteína é uma remodeladora de cromatina) também têm sido associadas com a tumorigênese (RAMOS *et al* 2014).

1.1 Gliomas e glioblastoma

Os gliomas são tumores do sistema nervoso central que se dividem entre diversos subtipos, incluindo tumores não difusos, menos frequentes, e difusos. Entre os tumores difusos, existem os astrocitomas, os oligodendrogliomas e os oligoastrocitomas (este último tem caído em desuso devido aos marcadores moleculares), com diferentes graus de malignidade, entre II a IV (WESSELING & CAPPER 2018). O glioblastoma é o subtipo mais comum e o mais agressivo (grau IV) (OSTROM *et al* 2017). Mesmo pacientes submetidos ao tratamento padrão, composto por ressecção cirúrgica acompanhada por terapia adjuvante com radioterapia e temozolomida (TMZ), apresentam sobrevida mediana de apenas 1 ano (STUPP *et al* 2005). Algumas das suas características são a alta invasibilidade e áreas centrais necróticas. Ele pode, ainda, ser classificado entre primário ou secundário, conforme a ocorrência ou não de diagnóstico prévio de glioma de menor grau.

O fracasso no tratamento do glioblastoma é decorrência de diversos fatores, entre eles a alta capacidade invasiva das células tumorais, que impossibilita a ressecção cirúrgica completa e ocasiona a recidiva; e a heterogeneidade tumoral, que inclui além da diversidade genotípica e fenotípica, fatores ambientais como áreas de hipóxia (OSUKA & VAN MEIR, 2017). A heterogeneidade tumoral ainda é amplificada pela capacidade das células únicas de conversão entre fenótipos (NEFTEL *et al* 2019). Essa plasticidade pode ser dirigida por certos fatores genéticos e manter uma distribuição estável de subtipos na massa tumoral (NEFTEL *et al* 2019). A plasticidade da massa tumoral pode ser observada também na alteração do subtipo tumoral da recidiva comparada ao tumor primário (WANG *et al* 2017).

Outro fator decisivo para a resposta ao TMZ é o estado epigenético do promotor de O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (*MGMT*): esse fenótipo está relacionado às mutações em *IDH*, consideradas um fator prognóstico positivo (PARSONS *et al* 2008) e estão presentes na maioria dos pacientes com glioblastoma secundário (YAN *et al* 2009) (ver seção 'Mecanismos de resistência e tolerância'). Outro fator genético importante é a perda simultânea do braço curto do cromossomo 1 (1p) e do braço

longo do cromossomo 19 (19q). Essa co-deleção é observada na maioria dos oligodendrogliomas e é um fator prognóstico positivo (JENKINS *et al* 2006).

O grande estudo desenvolvido pelo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), coordenado pelo *National Institute of Health* (NIH) em parceria com o *National Cancer Institute* (NCI) e com o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI), indicou que as principais vias mutadas em glioblastomas primários são as vias de receptor tirosina quinase (RTK), de p53 e de RB. Em relação à alterações de número de cópias, foram encontradas respectivamente as frequências 59%, 70% e 66%, enquanto à alterações somáticas foram encontradas respectivamente as frequências 88%, 87% e 78% (CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, 2008). Alterações concomitantes nas três vias ocorrem em 74% dos tumores, porém dentro de cada via foi observada uma tendência de exclusividade mútua. Abaixo essas vias são abordadas:

- via dos RTKs: esses receptores de membrana respondem a diversos fatores de crescimento, hormônios e citocinas e desencadeiam vias de sinalização que levam ao crescimento celular, incluindo a via das MAPKs e PI3k/AKT/mTOR. As alterações mais comuns são encontradas no receptor EGFR (45%, ampliações e mutações de ativação) e em PTEN, regulador negativo de PI3K (36%, deleções e mutações de inativação).

- via de p53: essa via tem importante papel na proteção do genoma, induzindo a célula à parada no ciclo, à apoptose ou à senescência quando ocorrem danos no DNA. As alterações mais comuns em glioblastomas primários ocorrem em *CDKN2A-Arf* (49%, deleções e mutações de inativação), seguido por *TP53* (35%, deleções e mutações de inativação).

- via da Rb: essa via tem como função controlar a proliferação, bloqueando a progressão pelo ciclo celular enquanto a célula não estiver pronta para dividir. As alterações mais comuns ocorrem em *CDKN2A-p16* (52%, deleções e mutações de inativação) e em *CDKN2B* (47% deleções).

Embora muitos esforços são empregados em estudos com glioblastoma, pouco foi avançado em relação à terapia disponível. De fato o último progresso significativo foi a demonstração de eficácia da combinação entre TMZ e radioterapia, o qual ocorreu

em 2005 (STUPP *et al* 2005). Além disso, existem questões em aberto, como a célula de origem e o porque do grande fracasso da terapia. Embora a presente tese tenha como foco a biologia de glioblastomas, as descobertas aqui descritas, em especial às do capítulo I (Dynafit), se aplicam a diversos tipos tumorais.

2. Heterogenidade Tumoral

É conhecido que a diversidade biológica é a matéria prima para a evolução, o mesmo ocorre com a diversidade de células tumorais, sendo ela a responsável por prover características que levam a evolução tumoral. Embora a heterogenidade não seja uma característica descrita nos *Hallmarks of cancer*, ela está bastante disseminada entre tumores e existe em vários níveis:

- Heterogenidade temporal: com o passar do tempo a massa tumoral será alterada. Além disso uma mesma célula apresenta alterações nas suas características, o que constitui a flutuação ou dinâmica fenotípica (abordada na seção 'Dinâmica fenotípica e o estudos em células únicas').
- Heterogenidade entre tumores: cânceres derivados de diferentes tecidos têm diferentes características (MCGRANAHAN & SWATON 2017).
- Heterogenidade tumoral: tumores de um mesmo tecido podem apresentar grandes diferenças, dando origem aos diferentes subtipos tumorais, os quais podem receber terapias específicas. No caso de glioblastomas, foram propostas 4 subclassificações baseadas em dados moleculares: clássico, neural, proneural e mesenquimal (VERHAAK *et al* 2010). Outro exemplo é o câncer de mama, que pode ser classificado quanto a receptores de hormônios e ao receptor tirosina quinase HER2. Assim, os casos de câncer de mama são classificados em três categorias – HR⁺/HER2⁻, HR⁻/HER2⁺ e triplo negativo – e cada categoria apresenta diferente prognóstico e diferente tratamento (WAKS & WINER 2019).
- Heterogenidade intratumoral (ITH): por fim, dentro de uma mesma massa tumoral as células também apresentam características diferentes, e é graças a essa diversidade que fenômenos como a resistência ocorrem. Células de um único glioma podem

apresentar características do que até então eram considerados diferentes subtipos tumorais (PATEL *et al* 2014), reforçando a alta heterogeneidade e a importância das técnicas que avaliam células únicas. No mesmo estudo os autores ainda encontraram células que não se encaixavam em nenhuma das categorias pré-estabelecidas. Resultados similares foram encontrados para linhagem de câncer de mama em análise de RNA-seq (GAO *et al* 2017).

Não apenas as células tumorais são heterogêneas, mas diferentes áreas do tumor podem apresentar diferentes características que se alteram ao longo do tempo e portanto são dinâmicas, tais como o nível de oxigênio (GILLIES *et al* 1999, HARDEE *et al* 2009, HENSLEY *et al* 2016). Da mesma forma, tumores secundários derivados de metástases também vão apresentar diferentes características (BRASTIANOS *et al* 2015).

Mesmo em linhagens celulares consideradas isogênicas, e submetidas as mesmas condições ambientais, existe heterogeneidade populacional. Em estudo com células irmãs, isto é, células que apresentam conteúdo genético idêntico, a correlação na expressão de genes varia conforme o gene avaliado, sendo que o tempo para a memória ser perdida variou entre 8 a 17 gerações (PHILLIPS *et al* 2019). Os autores também demonstraram que quanto maior a variabilidade populacional na expressão de algum gene, maior a correlação entre as irmãs, e vice-versa. Adicionalmente, SHAFFER *et al* 2020 identificaram que alguns genes têm memória transcricional mais estável ao longo de gerações que outros, e MEIR *et al* 2020 demonstraram que diferentes regiões do genoma têm diferentes níveis de herdabilidade da metilação do DNA.

Outro exemplo é o fenômeno de morte fracional, que está intimamente relacionado ao fenótipo de tolerância, discutido na sessão seguinte. Em cultura celular isogênica apenas 6% das células apresentam morte concomitante (INDE *et al* 2020). Adicionalmente, populações celulares tratadas com inibidores mitóticos apresentam múltiplos destinos, e mesmo células irmãs apresentam destinos independentes (GASCOIGNE & TAYLOR 2008).

Outra característica variável em células em cultura é o tempo de ciclo celular. Em células clonais, existe correlação de tempo de ciclo entre células irmãs, porém em primas ela já é reduzida, assim como a correlação entre mães e filhas também é mais fraca (KUCHEN *et al* 2020). O que define o tempo de ciclo são diversos fatores, tais como o tamanho celular (KUCHEN *et al* 2020) e a ocorrência de estresse replicativo na célula mãe (ARORA *et al* 2017). A combinação desses fatores gera ampla possibilidade de heterogeneidade, e como o tempo de ciclo define a quantidade de células-descendentes deixadas por uma célula original em um determinado tempo (*fitness*), podemos esperar que esses fatores tenham grande impacto sobre a biologia tumoral.

O que faz as células tumorais serem heterogêneas? Em primeiro lugar estão as mutações genéticas, as quais, como já mencionado, tendem a se acumular ao longo do tempo, em especial devido à instabilidade genômica de tumores. KANDOTH *et al* 2013 usaram dados do TCGA para demonstrar que tumores podem ter uma frequência média de mutações entre 0,28 a 8,15 por megabase. Nesse contexto, as diferentes subpopulações clonais estarão sujeitas a seleção e ditarão a evolução tumoral. É graças as diferenças de origem genética que hoje é possível reconstruir a história evolutiva de tumores (MCGRANAHAN & SWANTON 2017).

Em segundo lugar, as células dentro de um tumor podem desenvolver diferenças na regulação epigenética, que tem como consequência diferenças fenotípicas. Nesse sentido, padrões de metilação no DNA geram diferentes subpopulações em relação à expressão da histona H1.0, a qual está envolvida com diferenciação e capacidade de renovação celular (TORRES *et al* 2016). Estudos recentes sugerem que a atividade de enzimas demetilases está relacionada com a heterogeneidade transcricional entre células de câncer de mama, com consequências nos níveis de tolerância à terapia hormonal (HINOHARA *et al* 2018). Outro exemplo da influência da epigenética sobre a progressão tumoral é que a metilação do DNA está envolvida com dinâmica de fenótipo epitelial e mesenquimal em células clonais (MEIR *et al* 2020).

Existem ainda mecanismos pouco explorados mas que devem ter algum impacto sobre a heterogenidade, são exemplos as mutações fenotípicas, causadas principalmente por erros no processo de tradução, e o ruído bioquímico, cuja origem se dá principalmente pela natureza estocástica das reações bioquímicas e podem impactar, por exemplo, a expressão genética (PAYNE & WAGNER 2018). Isso explica por que mesmo células idênticas, no mesmo ambiente e estado celular ainda podem ter comportamentos diferentes. Exemplos da importância biológica desses mecanismos são respectivamente a indução de resistência à rifamicina em *Mycobacterium tuberculosis* (JAVID et al 2014) e a determinação da reativação de HIV (DAR et al 2014). Por fim, outra possível fonte de variabilidade que ainda é pouco explorada é a ocorrência de mitoses assimétricas.

2.1 Mitose assimétrica como fonte de heterogenidade intratumoral

A divisão assimétrica é um fenômeno bastante conhecido em células tronco, no qual a célula tronco mãe origina uma célula filha com a mesma característica tronco e outra que irá se diferenciar. Nesse sentido, mitoses assimétricas estão associadas, por exemplo, à ativação de células tronco hematopoéticas (HSC) (LOEFFLER *et al* 2019). Além dos mecanismos determinísticos que garantem distribuição assimétrica entre células filhas durante o desenvolvimento, a natureza estocástica da bioquímica celular causa partições assimétricas que afastam células irmãs da média populacional e criam heterogenidade (HUH & PAULSSON 2011).

Em bactérias, a partição assimétrica de bomba de efluxo leva a diferentes níveis de sensibilidade (BERGMILLER *et al* 2017). Já em relação a divisão de células de mamíferos, já foi demonstrado que entre células irmãs ocorre a segregação assimétrica de proteínas marcadas para a degradação (FUENTEALBA *et al* 2008), corpos PML (*promyelocytic leukemia protein*) (LÅNG *et al* 2018), lisossomos (LÅNG *et al* 2018, LOEFFLER *et al* 2019) e presença de foci da proteína 1 de ligação a supressora de tumor p53 (53BP1) devido ao estresse replicativo (BARR *et al* 2017).

Ainda, em relação às mitocôndrias, foi demonstrado que elas podem estar envolvidas com uma forma de memória de divisão em células tronco hematopoiéticas: nesse caso a redução da dinâmica mitocôndrial em células com maior histórico de divisões, provoca acúmulo e agregamento de mitocôndrias disfuncionais que são segregadas assimetricamente nas células filhas gerando células com potencial de replicação reduzido (HINGE *et al* 2020). De maneira similar células epiteliais mamárias imortalizadas com características tronco tem partição assimétrica de mitocôndrias antigas, sendo que a célula filha que recebe mitocôndrias velhas em menor quantidade retém características tronco, enquanto a sua irmã não (KATAJISTO *et al* 2015).

Em relação ao câncer, foi sugerido que a mitose assimétrica tem papel na tumorigênese (LIU *et al* 2018, WANG *et al* 2016). Células de glioma tem divisão assimétrica do receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR) e do receptor de neutotrofina P75 (p75NTR), o que provoca diferenças na sensibilidade ao tratamento com erlotinib (HITOMI *et al* 2021), e de proteína fibrilar ácida glial (GFAP) (GUICHET *et al* 2016). Entretanto, a frequência e o impacto desse fenômeno em tumores ainda é pouco conhecida.

3. Resistência e tolerância

A resposta de uma célula individual a quimioterapia vai depender de diversos fatores, entre eles seu genoma, estado de fenótipos dinâmicos em que a célula se encontra no momento do tratamento, o microambiente em que a célula esta inserida, a extensão em que a droga vai agir e a natureza estocástica das reações bioquímicas. A combinação de todos esses fatores, em menor ou maior grau, determinam se uma célula será sensível ou não a um tratamento, e no caso de células com capacidade de sobrevivência, essa capacidade pode ser herdável ou transitória, caracterizando o que chamamos de resistência e tolerância.

A resistência é um processo conhecido há bastante tempo. Ela é o resultado da seleção darwiniana, na qual algumas células tumorais adquirem ao acaso alterações genômicas que favorecem a sobrevivência ao tratamento, aumentando o *fitness*

dessas células e alterando as características da população de células tumorais ao longo do tempo, o que culmina com a progressão tumoral.

Entretanto, essa visão ignora o fato de que fenótipos são o resultado não apenas do genoma, mas também da epigenética e do ambiente. Adicionalmente, esse modelo de resistência herdável não explica porque existem casos em que tumores retratados com a mesma droga permanecem apresentando sensibilidade em ciclos subsequentes de administração (CARA 2001), o que não seria esperado caso as células sobreviventes tivessem modificações genéticas que tivessem sido selecionadas no modelo darwiniano. O mesmo fenômeno é observado quando células resistentes em cultura são mantidas em meio livre da droga (RABÉ *et al* 2020).

Hoje temos evidências de que ao lado da resistência, existem os fenômenos de tolerância e persistência que devem contribuir para a progressão tumoral. Esses termos já estão bem descritos na microbiologia, onde foram inicialmente empregados. A tolerância é a capacidade de uma população, devido a mecanismo reversível e não herdável, de sobreviver à exposições transientes de uma droga, enquanto essa mesma capacidade quando observada em uma subpopulação de células, de origem clonal, é chamada persistência (BALABAN *et al* 2019).

Adicionalmente, um termo que vem sendo amplamente utilizado nos estudos de biologia tumoral é o de morte fracional, que nada mais é do que a observação de tolerância em uma porção de células da população. A morte fracional ocorre em resposta a tratamento com diversas drogas, mas as classes de drogas com diferentes alvos tendem a ter diferentes amplitudes desse fenômeno (INDE *et al* 2020). Adicionalmente, uma mesma droga pode apresentar diferentes dinâmicas de morte fracional quando atuam sobre células com diferentes genomas (INDE *et al* 2020).

Tem sido demonstrado que em várias linhagens celulares, submetidas a diferentes tratamentos, aparece uma pequena proporção de células tolerantes cuja característica é reversível (SHARMA *et al* 2010, FALLAHI-SICHANI *et al* 2017, SHAFFER *et al* 2017). Células com essa capacidade podem persistir ao longo do tempo, levando à um fenótipo mais estável, estando este associado com reprogramação epigenética (SHARMA *et al* 2010, SHAFFER *et al* 2017). É importante

ressaltar que, diferente do que acontece em procariontes, em células tumorais o controle epigenético é bastante relevante.

É possível que a persistência celular observada se tornou fixada devido ao fenômeno de assimilação genética (SALGIA & KULKARNI 2018). Esse termo foi cunhado por Waddington na década de 1950, quando ele observou que um estresse ambiental poderia causar uma mudança fenotípica rápida que pode ser selecionada e que ao longo das gerações se torna herdável mesmo quando o estresse é removido (NISHIKAWA & KINJO 2018). Outro pesquisador que explorou esse fenômeno foi Schmalhausen, que defendia que variações fenotípicas estavam escondidas e eram expostas devido a um estímulo ambiental (PIGLIUSSI *et al* 2006). Adicionalmente, a tolerância e a persistência podem agir em um espaço de tempo longo o suficiente para que mutações genéticas apareçam e sejam selecionadas (HATA *et al* 2016; RAMIREZ *et al* 2016), em especial se as células tiverem em contato com drogas que aumentam ainda mais a instabilidade genômica.

KIM *et al* 2018 demonstraram que células tumorais de pacientes com câncer de mama triplo negativo que sobrevivem ao tratamento passam por seleção clonal e por reprogramação transcricional. Através de experimentação e modelamento matemático, os resultados de SU *et al* 2017 indicam que a resistência ao vemurafenibe é o resultado de indução lamarckista de fenótipos e seleção de características não genéticas, uma vez que células com diferentes fenótipos apresentam diferenças na viabilidade. Portanto, estes novos achados indicam que a definição do destino de células tumorais não é apenas o resultado de seleção darwiniana de variantes genéticas (genótipos), mas uma mistura dessa e da seleção de fenótipos que se alteram ao longo do tempo.

3.1. Mecanismos de resistência e tolerância

Existem diversos mecanismos que podem resultar na sobrevivência das células tumorais quando tratadas, entre eles estão as alterações genômicas. Um exemplo são as mutações nos alvos das drogas. Esse é o caso da mutação T790M em *EGFR*, que

aparece em até 60% dos pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas que apresentam progressão da doença após tratamento com gefitinibe e erlotinibe (YU *et al* 2013). O que acontece nesse caso é que as drogas inibidoras de EGFR agem por competir pelo sítio de ligação da adenosina trifosfato (ATP) no domínio tirosina quinase da proteína, mas tem sua afinidade reduzida pela troca de aminoácido gerada pela mutação (WRIGHT & GOSS 2019). A mutação T315I em *ABL* tem um efeito similar sobre o Imatinibe, que é usado no tratamento de Leucemia mieloide crônica com alteração no cromossomo Philadelphia (GORRE & SAWYERS 2002).

Mutações também podem provocar outras alterações nos alvos de drogas. A terapia hormonal é amplamente utilizada no tratamento de câncer de próstata, a qual provoca redução do crescimento tumoral por redução dos níveis hormonais. A mutação L702H no gene que codifica o receptor de andrógeno o torna passível de ativação por glicocorticóides, o que compensa a ausência dos hormônios (ZHAO *et al* 2000, WATSON *et al* 2015). Outro mecanismo de resistência à terapia hormonal é o aumento da produção de receptores de andrógeno através da amplificação do locus genômico Xq11-q13, onde o gene está inserido (VISAKORPI *et al* 1995).

Tumores que possuem o oncogene *BRAFV600E*, como melanomas, podem ser tratados com vemurafenibe, um inibidor específico da oncoproteína mutada. Além da ocorrência de mutações na via da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), é conhecido que a inibição da oncoproteína causa a redução de mecanismos de retroalimentação negativos da própria via, o que torna ela mais sensível a ativações, podendo provocar a proliferação celular (GEROSA *et al* 2019, LITO *et al* 2012). Outro mecanismo de resistência descrito para essa droga é o processamento alternativo do mRNA de *BRAFV600E*, cujo produto é uma proteína de 61kDa que não possui os exons 4 a 8. Essa variante não possui o domínio de ligação de RAS, seu ativador, e com isso a dimerização de RAF é potencializada, restaurando a via de sinalização que deveria ser inibida pela droga (POULIKAKOS *et al* 2011).

Existem ainda mecanismos de resistência a múltiplas drogas, como é caso do efluxo de drogas, derivado da atividade de proteínas conhecidas como P-glicoproteínas (ROBEY *et al* 2018). Já foi sugerido que o aumento na expressão

dessas proteínas poderiam ser em decorrência de rearranjos cromossômicos (HUFF *et al* 2006), mutações na região promotora (STEIN *et al* 1994) ou mesmo controle epigenético (TADA *et al* 2000). Células de leucemia aguda ativamente aumentam a expressão de MDR1 quando submetidas a vincristina (PISCO *et al* 2013), gerando o fenótipo de tolerância. Outra maneira pela qual o fenótipo positivo para bombas de efluxo pode ser adquirido é pelo recebimento, pelas células sensíveis, de microvesículas originadas em células resistentes (ÁLVAREZ-ARENAS *et al* 2019, BEBAWY *et al* 2009).

Outro fator que pode levar a tolerância é a fase do ciclo celular em que a célula se encontra no momento que recebe a terapia, e uma vez que esta é cíclica, podemos prever que essa tolerância é altamente instável sendo alterada em uma mesma célula ao longo do tempo. Um exemplo de classe de drogas cuja eficiência deve ser afetada por isso são taxanos, que inibem a estabilização de microtúbulos no momento da mitose e como consequência induzem apoptose (SHAH & SCHWARTZ 2001). De maneira inesperada, o ciclo celular não afetou a resposta a cisplatina (GRANADA *et al* 2020), apesar do seu mecanismo de ação ocorrer principalmente na fase S.

Alterações epigenéticas tem seu papel na resistência ou tolerância tumoral, um exemplo é o já mencionado controle epigenético da região promotora do gene *MGMT* em gliomas tratados com TMZ (ESTELLER *et al* 2000), um agente alquilante. Essa droga provoca metilação do DNA, principalmente nas posições do nitrogênio 7 (N⁷) e oxigênio 6 (O⁶) de resíduos de guanina (DENNY *et al* 1994). Embora menos frequente, a modificação em O⁶ é a principal responsável pela citotoxicidade da droga (TISDALE 1986). A enzima *MGMT* tem como função reverter o dano causado nessa posição e assim evitar a morte celular. No promotor do gene da *MGMT* existe uma região CpG cuja metilação inibe a sua transcrição, e portanto esta associada a sensibilidade aos agentes alquilantes. Adicionalmente, rearranjos cromossômicos que levam a superexpressão de *MGMT* também foram recentemente relacionados com a resistência à TMZ (OLDRINI *et al* 2020).

Os exemplos citados acima de mecanismos de resistência deixam claro que as células podem seguir muitos caminhos diferentes entre genéticos e não genéticos para

superar os tratamentos disponíveis, e a busca pela maior eficiência em tratamentos deve considerar todas essas possibilidades. Adicionalmente, múltiplos mecanismos podem emergir em uma população celular, complicando ainda mais o quadro clínico (RAMIREZ *et al* 2016).

4. Dinâmica fenotípica e o estudos em células únicas

Tumores não são estáticos, uma vez que tanto o microambiente (DAVIDSON *et al* 2020) quanto as células tumorais mudam ao longo do tempo, seja por mutações ou mecanismos não genéticos. Nesse cenário tem sido crescente o interesse sobre dinâmicas em células únicas, em especial porque hoje sabemos que ela é decisiva em muitos desfechos celulares, como os exemplificados na Tabela 1.

Por que células mudam ao longo do tempo? Uma das respostas é que vários processos em organismos vivos são cíclicos, tais como o ciclo circadiano (BASS & LAZAR 2016) e o ciclo celular. Embora o primeiro seja menos compreendido, se sabe que variações em atividade de proteínas em diferentes fases do ciclo celular ocorrem, como por exemplo degradação proteossomal de p21 (HSU *et al* 2019), atividade de *dynamin-related protein 1* (DRP1), que provoca fissão mitocondrial (TAGUCHI *et al* 2007) e mesmo na expressão gênica (MEIR *et al* 2020). Essas diferenças entre células individuais causam, portanto, diferenças no ambiente intracelular que desencadeiam diferentes desfechos. Além disso, a natureza das reações bioquímicas envolve estocasticidade, o que resulta em diferenças na expressão genética (ELOWITZ *et al* 2002). Por fim, divisões assimétricas também parecem contribuir para uma manutenção dinâmica de diferentes fenótipos em populações, ou seja, mesmo que a nível populacional os fenótipos permanecem constantes, as células únicas dentro dessa população estão mudando de fenótipo (SRINIVASAN *et al* 2016).

Sendo assim, uma mesma célula pode ser diferente em momentos distintos, como demonstrado em relação à tronquicidade (GUPTA *et al* 2011). Transição de fenótipos também foram identificados em relação à velocidade proliferativa (ROECH *et al* 2013, EBINGER *et al* 2016), expressão de MDR (PISCO *et al* 2013), atividade de

CDK2 pós-mitose (ASGHAR *et al* 2017), além das alterações no nível de expressão gênica ao longo das gerações (SHAFFER *et al* 2020). Outro exemplo de transição fenotípica é a transição epitélio-mesenquimal, que já é bem estabelecida e tem um papel importante na invasão e metastase. Essa transição foi por muito tempo considerada um fenômeno binário, porém atualmente evidências mostram um amplo espectro de células com fenótipos híbridos, que apontam para a alta complexidade da dinâmica celular (PASTUSHENKO & BLANPAIN 2019).

Os fenótipos adotados pelas células humanas fazem parte de um panorama epigenético (*epigenetic landscape*), proposto pela primeira vez por Waddington em 1956, que é constituído por regiões estáveis e cuja manutenção fenotípica se deve à interações complexas de redes regulatórias genéticas. Essas regiões estáveis são chamadas de atratores, por serem cercadas de regiões não estáveis onde a interação das redes regulatórias genéticas não se mantém. Por isso uma célula em uma região vizinha a um atrator será atraída para essa região, da mesma forma que uma bola em cima de um morro será atraída para o vale. Os múltiplos vales existentes correspondem aos múltiplos fenótipos possíveis para determinado genoma, e podem ser observados experimentalmente nas distribuições bimodais para diversos marcadores tais como CD45 (OTERO *et al* 2002). Nesse cenário, a transição de fenótipos envolve as flutuações nos níveis de proteínas (ruído na expressão genética), que quando ocorrem em uma amplitude grande o suficiente pode empurrar a célula para um novo vale (PISCO & HUANG 2015, HUANG 2011). A transição fenotípica pode ser observada experimentalmente quando células com diferentes fenótipos são separadas por *cell sorting*, e cada população recria a distribuição original daquele fenótipo (GUPTA *et al* 2011, NEFTEL *et al* 2019). Esse fenômeno pode ser importante para a resposta a terapia por induzir células a entrarem em fenótipos tolerantes.

Esses fatos nos mostram que dinâmicas moleculares são importantes e podem ajudar a esclarecer questões valiosas, tais como porque células geneticamente idênticas podem ter diferentes respostas aos tratamentos? Quais mecanismos que levam a tolerância são dinâmicos? Quais combinações e cronogramas de tratamentos podem interferir nas dinâmicas e melhorar a resposta?

Tabela 1: elementos celulares e o impacto da sua dinâmica sobre desfechos nas células.

Elemento dinâmico	Desfecho	Contexto	Referência
MCL-1	Morte fracional	Tratamento com inibidores de MAPK	INDE <i>et al</i> 2020
JNK	Morte fracional	Tratamento com UV-C	MIURA <i>et al</i> 2018
Caspases iniciadoras	Morte fracional	Tratamento com TRAIL	ROUX <i>et al</i> 2015
Síntese e ativação de proteínas pró-apoptóticas	Morte fracional e herdabilidade transitória	Tratamento com TRAIL	SPENCER <i>et al</i> 2009
P53	O limiar de indução de apoptose por p53 é tempo-dependente devido ao acúmulo de proteínas IAP	Tratamento com cisplatina	PEAK <i>et al</i> 2016
Pulso de ativação de P53	Decisão entre parada de ciclo ou apoptose	Diferentes danos ao DNA (<i>double strand breaks</i> ou <i>single strand breaks</i>)	BATCHELOR <i>et al</i> 2011
Diferentes alvos de p53	Diferenças na produção e ativação de proteínas	Ativação de p53	HAFNER <i>et al</i> 2017
EGFR e alvos downstream que provocam inibição de caspase 8	Diferenças na eficiência dependendo do momento de adição das drogas	Tratamento sequencial de erlotinib e doxorrubicina	LEE <i>et al</i> 2012
CDK2 e p21	Entrada em quiescência	Erro de replicação na célula mãe herdado pelas filhas	ARORA <i>et al</i> 2017
p21	Entrada em senescência	Tratamento com doxorrubicina	HSU <i>et al</i> 2019

Porém, ainda hoje uma grande parte dos resultados em pesquisa são dados estáticos obtidos de populações celulares. Análises populacionais e pontuais podem esconder fenômenos importantes que ocorrem a nível de células-únicas, ou mesmo levar a conclusões errôneas, como demonstrado em artigo prévido feito no nosso laboratório, em que análises populacionais indicavam a existência de correlação

negativa entre autofagia e senescência, enquanto as análises de células únicas demonstraram que os dois processos ocorriam de maneira independente (CHIELA *et al* 2015). Dados de transcriptômica de rotas metabólicas também não refletem a expressão em células únicas (XIAO *et al* 2019). Além disso, a preocupação com fenômenos diferentes ocorridos em células únicas em relação a população é especialmente importante no estudo da biologia tumoral, uma vez que uma única célula tumoral que tenha um comportamento diferente das demais, e que este confira vantagem adaptativa, pode levar ao fracasso do tratamento e a reincidência. Portanto estudos de dinâmica e de células únicas cada vez ganham mais espaço. Seguindo esse racional, no capítulo I desta tese propomos uma nova metodologia para quantificar a dinâmica de fenótipos celulares.

4.1 Análises de células únicas e dinâmica através de proteínas fluorescentes

A abordagem que mais vem crescendo em relação às análises de células únicas é o sequenciamento de RNA. Porém essa metodologia é cara e apresenta como desvantagem a impossibilidade do acompanhamento de uma mesma célula ao longo do tempo para averiguar dinâmica. Uma alternativa à essa limitação são os ensaios com células apresentando marcações fluorescentes, as quais podem ser transientes, produzidas através de transfecções, ou estáveis, produzidas, por exemplo, através de transduções virais ou transposições. Como toda metodologia, essa abordagem também tem desvantagens, sendo elas a limitação de alvos avaliados, a mutação insercional e o estresse celular.

Recentemente foi descrito uma metodologia inovadora que utiliza CRISPR (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) para marcar o locus endógeno de genes de interesse. Embora isso já fosse possível com nucleases efetoras do tipo ativador (TALENs) e proteínas dedos de zinco (ZFPs) (HSU & ZHANG 2012), com o CRISPR a possibilidade de marcação é quase infinita, pois podemos desenhar um RNA guia para praticamente qualquer região do genoma, limitado apenas pela exigência de uma trinca de bases nitrogenadas chamada de sequência PAM,

enquanto com TALENs e ZFNs as inserções eram limitadas a regiões de repetições nucleotídicas específicas. Abaixo essa nova tecnologia é abordada.

4.1.1 Marcação de locus endógeno por CRISPR

As primeiras observações de sequências repetidas pertencentes ao locus que hoje chamamos de CRISPR se deram na década de 90, já o termo CRISPR foi empregado a primeira vez no início dos anos 2000 (JASEN *et al* 2002). Essa descoberta e suas aplicações possibilitaram grandes avanços para a biotecnologia, uma vez que com essa metodologia podemos provocar quebras de dupla fita precisas em quase qualquer região do genoma de uma maneira fácil, eficaz e barata. A função original do sistema é a proteção de bactérias contra bacteriófagos, de forma que após a infecção inicial por uma espécie de fago, a imunidade adquirida se torna herdável (BARRANGOU *et al* 2007). O locus genômico consiste de sequências repetitivas idênticas separadas por espaçadores únicos (*spacers*), que por sua vez são idênticos a fragmentos de material genético viral e provenientes de infecções prévias. Ainda, a região é flanqueada por genes associados ao CRISPR (*CRISPR-associated* - Cas) (JASEN *et al* 2002).

O sistema tem diversas variações entre as espécies de arqueas e bactérias, sendo dividido em duas classes, chamadas de classe 1 e 2 com diferenças quanto ao complexo de interferência (terceira etapa do sistema) e aos genes Cas, com diversos tipos. Basicamente ele funciona em três etapas: adaptação, biogênese de CRISPR RNA (crRNA) e interferência. Na primeira fase complexos enzimáticos de Cas1-Cas2 selecionam o material genético estranho, processam e o incorporam ao locus genômico entre as regiões repetitivas, dessa forma garantindo a memória da infecção e herdabilidade da imunidade (HILLE *et al* 2018). A seguir o locus CRISPR é transcrito em um longo RNA (pré-crRNA) e processado (por Cas5 ou 6, ou ainda outras RNases, dependendo da classe ou tipo do sistema) para dar origem ao crRNA maduro, constituído de uma segmento repetitivo, para reconhecimento, e uma sequência que funciona como guia para o alvo (HILLE *et al* 2018). Por fim, a interferência acontece

quando um fago infecta a bactéria já imunizada, nesse caso Cas nucleases (Cas3, Cas10, Cas9, Cas12 ou Cas13, dependendo da classe e tipo) irão clivar o material genético viral na sequência específica complementar ao crRNA, chamada de protoespaçador (*protospacer*) (HILLE *et al* 2018). Adicionalmente, a Cas 9 precisa de um crRNA transativador (tracrRNA), que apresenta uma pequena sequência complementar ao crRNA (HILLE *et al* 2018). Essa necessidade foi suprida pela engenharia de um RNA guia-único (sgRNA) para as aplicações biotecnológicas (JINEK *et al* 2012).

As aplicações do CRISPR tem crescido e mostram grande potencial para a saúde, agricultura e biotecnologia. Em 02/09/2020, 40 estudos com CRISPR estavam registrados na plataforma de ensaios clínicos clinicaltrials.gov. Alguns exemplos de aplicabilidade são descritos na Tabela 2.

Outra aplicação é a incorporação de fragmentos de DNA em um locus genômico específico. Essa aplicabilidade foi utilizada no capítulo I dessa tese para medir a expressão de marcador de proliferação Ki67 (*Ki67*) e progressão no ciclo celular. STEWART-ORNSTEIN & LAHAV 2016 produziram marcação do locus endógeno com a inserção de um gene que codifica uma proteína fluorescente no final de três genes codificantes de proteínas importantes na biologia tumoral: *TP53*, inibidor de ciclina dependente que quinase 1A (*CDKN1A*) e *Ki67*. Para isso, a atividade de endonuclease da Cas9 foi direcionada para sítios próximos ao STOP códon dos genes alvos por um sgRNA, e adicionalmente as células foram transfectadas com uma molécula de DNA dupla fita doadora que continha a sequência codificante para a proteína fluorescente (mais uma sequência de auto-clivagem e de um marcador seletivo) entre braços de homologia (40bps cada) da região que flanqueia o sítio de clivagem. Com esse arranjo, após a clivagem do DNA endógeno, a célula usa o doador como molde para reparar a quebra por homologia (*HDR - homology directed repair*), dessa forma resultando na inserção da sequência para a proteína fluorescente na extremidade 3' do gene de interesse, e com subsequente produção da proteína alvo quimérica com marca fluorescente na extremidade carboxila.

Tabela 2: aplicabilidades do CRISPR

Aplicação	Racional	Referência
Indução de mutações	A cas9 é direcionada para um sítio de clivagem pelo sgRNA onde provoca a quebra dupla do DNA. A célula pode reparar esse dano por reparo direcionado por homologia (HDR) ou por junção de extremidades não-homólogas (NHEJ), nesse último caso inserções ou deleções de bases ao acaso podem ocorrer resultando em mutação.	CHO <i>et al</i> 2013
Visualização de locus endógeno	Uma Cas9 sem atividade catalítica (<i>dead Cas9</i> - dCas9) é fusionada a um EGFP e direcionada a um locus genômico através de sgRNA.	CHEN <i>et al</i> 2013
Controle da expressão genética	Uma dCas9 é fusionada a repressor ou a ativador e direcionada para um locus genômico específico através de sgRNA para reprimir ou induzir a expressão genética.	GUILBERT <i>et al</i> 2013
Triagem	Diversos sgRNAs são desenhados e aleatoriamente entregues em células junto com a Cas9 a fim de descobrir possíveis genes alvos para a terapia ou interações genéticas importantes.	WONG <i>et al</i> 2016; NAJM <i>et al</i> 2017.
Edição de base	Uma dCas9 é fusionada a uma citidina deaminase (APOBEC1 de rato), e através do direcionamento por sgRNA será feita a conversão de uma citosina a uracila (equivalente a timina) em uma posição específica	KOMOR <i>et al</i> 2016
REPAIR (<i>Editing for Programmable A to I Replacement</i>): Edição de base em RNA	Uma Cas13 sem atividade catalítica (dCas13) é fusionada a uma adenosina deaminase (ADAR2), que faz a conversão de adenosina a inosina (equivalente a guanosina) por deaminação hidrolítica em transcritos de RNA em sítio alvo do gRNA	GOOTENBERG & ABUDAYYEH <i>et al</i> 2017
SHERLOCK (<i>Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing</i>): Diagnóstico por reconhecimento de ácidos nucleicos	A Cas13a quando ativada pela ligação do crRNA ao alvo, provoca a clivagem do alvo, e como efeito colateral a clivagem também de outros RNAs não-alvos. Por isso a ativação de Cas13a por material genético específico, provenientes por exemplo de vírus, provoca a clivagem não específica de RNA sonda cuja clivagem libera fluorescência.	GOOTENBERG & ABUDAYYEH <i>et al</i> 2017

A principal vantagem dessa metodologia é a possibilidade de analisar a dinâmica protéica da expressão endógena, sem artefatos devido a diferença na taxa transcricional por regiões promotoras não endógenas. Além disso, a possibilidade de mutação é muito menor, uma vez que a ocorrência de alvos não desejados (*off-targets*) é baixa, diferente das mutações insercionais que podem ser provocadas por transduções virais. Ainda, esse sistema não precisa de ambientes de biosegurança maiores, como é o caso de lentivírus e retrovírus. Mesmo assim, essa é uma modificação genética, e ensaios que confirmem a ausência de artefatos, como a alteração da função ou localização da proteína quimérica, devem ser feitos.

5. Metabolismo e Mitocôndrias

Até aqui, foram abordadas as características de células tumorais, sua heterogeneidade, mecanismos utilizados pelas células para resistir ou tolerar tratamentos, dinâmica de células individuais e a importância de estudos de células únicas. A partir dessa seção, irei abordar o metabolismo e mitocôndrias, uma vez que eles também são dinâmicos e podem participar dos processos tumorigênicos.

As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis principalmente, embora não exclusivamente, pelo fornecimento de energia para a célula. Entre as organelas conhecidas, essa foi a primeira a surgir, gerada a partir da endossimbiose entre duas células procarióticas, cuja origem dirigiu a evolução de células eucarióticas (LYNN 1967, LANE 2020). Sua estrutura é composta por duas bicamadas lipídicas com estruturas e funcionalidade específicas, sendo que a interna apresenta cristas que aumentam a eficiência na produção de energia. Além disso, essas organelas formam uma rede altamente dinâmica, passando por constantes ciclos de fusão e fissão (GIACOMELLO *et al* 2020).

Diferente das demais organelas eucarióticas (exceto cloroplastos) ela apresenta DNA próprio circular com capacidade de autoreplicação, localizado na matriz. A molécula de DNA mitocondrial (mtDNA) foi reduzida ao longo da evolução e nos humanos mantém apenas 16.6kbp que codificam 13 proteínas, todas envolvidas

com a fosforilação oxidativa, 22 RNAs transportadores (tRNA) e 2 RNAs ribossomais (rRNA) (ANDERSON *et al* 1981). No mtDNA existe apenas uma região não-codificante, na qual está contida dois promotores, um para cada fita, e a origem de replicação da fita pesada, enquanto a origem de replicação da fita leve fica a aproximadamente 12kbp (NICHOLLS, GUSTAFSSON 2018). Embora a replicação do mtDNA seja independente do DNA nuclear, existe um aumento na taxa de replicação durante a fase S do ciclo celular (SASAKI *et al* 2017).

Muitas das proteínas que agem na mitocôndria são codificadas pelo DNA genômico, incluindo as proteínas da maquinaria de replicação do mtDNA, de transcrição e alguns genes da fosforilação oxidativa (BERG, KURLAND 2000). Isso contribui para a alta complexidade genética das desordens mitocondriais, as quais podem ter origem tanto no DNA nuclear quanto no mtDNA, nesse último caso de herdabilidade exclusiva materna. Adicionalmente, as desordens mitocondriais podem se apresentar em diferentes níveis devido ao fenômeno de heteroplasmia (explicado no item 5.4) (KANUNGO *et al* 2018).

As sessões abaixo exploram o funcionamento das mitocôndrias bem como seu papel no cancer.

5.1 Respiração mitocondrial e metabolismo

De maneira simplificada e com excessão dos tecidos glicolíticos (TESLAA *et al* 2021), os tecidos obtém energia principalmente pela respiração mitocôndrial (fosforilação oxidativa, OXPHOS), um processo que gera ATP através de uma reação acoplada na qual a energia mecânica da rotação da subunidade F_1F_0 da ATP sintetase é utilizada para a ligação de um fosfato à molécula de ADP. Essa rotação é causada pela passagem para a matriz de prótons acumulados no espaço intermembranas mitocondrial, que geram uma energia potencial. Esses, por sua vez, se encontram acumulados nesse compartimento devido à cadeia transportadora de elétrons, composta por várias proteínas que em conjunto transferem elétrons do NADH e $FADH_2$ para oxigênio molecular, o acceptor final, produzindo água. Nesse processo de

transferência, os prótons liberados junto com os elétrons das moléculas de NADH e FADH₂ são bombeados para o espaço intermembranas, onde acumulam e geram o potencial de membrana. O NADH e FADH₂ são provenientes principalmente do ciclo de Krebs (TCA), etapa do metabolismo que também ocorre dentro da mitocôndria e oxida completamente o piruvato, proveniente da glicólise, à CO₂. Adicionalmente, o TCA pode ser alimentado por acetil-CoA proveniente da oxidação de ácidos graxos, e de α -KG proveniente da oxidação de glutamina.

Células tumorais, por outro lado, apresentam modificações no funcionamento das principais vias metabólicas, de forma a suportar o crescimento descontrolado. De fato, um dos *hallmarks of cancer* é a reprogramação metabólica. A primeira evidência de tal fenômeno foi descoberta na década de 1920 quando Otto Heinrich Warburg observou que células de carcinoma optavam preferencialmente por fazer glicólise ao invés da OXPHOS mesmo em condições aeróbicas, diferente dos demais tecidos que, como descrito acima, nessas condições destinam o piruvato da via glicolítica para ser totalmente oxidado nas mitocôndrias. Essa descoberta gerou o questionamento se células tumorais poderiam viver sem as mitocôndrias. Porém células depletadas de mtDNA só recuperam sua capacidade de tumorigênese após recupera-lo, e essa recuperação se dá através da transferência de mitocôndrias inteiras a partir de células doadoras (DONG *et al* 2017). Além disso, foi demonstrado que a transferência de mtDNA por vesículas a partir de CAFs tem papel na recorrência e resistência em câncer de mama (SANSONE *et al* 2017), e a importância da função mitocondrial também é evidenciada pela seleção negativa de mutações truncadas nos 13 genes mitocondriais na maioria dos tipos tumorais (YUAN *et al* 2020).

Hoje sabemos que nem todos os tumores adotam o fenótipo descrito por Warburg. Nesse sentido, COURTNEY *et al* 2018 demonstraram que carcinoma renal de células claras adota o efeito Warburg, enquanto câncer de pulmão e cerebrais não. Também foi descrito o fenômeno conhecido como efeito Warburg reverso. Nesse caso fibroblastos associados ao tumor adotam a glicólise aeróbica e liberam no meio extracelular lactato, o qual é internalizado pelas células tumorais que o direcionam para o TCA e mantêm a OXPHOS (PAVLIDES *et al* 2009). De maneira similar, células

de câncer de ovário usam como fonte de energia lipídios provenientes de adipócitos (NIEMAN *et al* 2011).

As alterações metabólicas em tumores incluem também o aumento na captação de glicose – fenômeno que permite a visualização do tumor através da tomografia de emissão de pósitrons (PET), um exame muito fácil, rápido e seguro. Essa captação aumentada é decorrente do aumento da expressão de GLUT (MACHEDA *et al* 2005) e possivelmente ajuda a suprir a demanda energética daqueles tumores que adotam o efeito Warburg, uma vez que a via glicolítica é 18 vezes menos eficiente na produção de ATP que a OXPHOS. Muito já foi questionado sobre qual vantagem adaptativa poderiam ter esses tumores, uma das hipóteses é que metabólitos intermediários podem ser direcionados para a síntese de macromoléculas (HEIDEN *et al* 2009). Nesse caso, a via glicolítica fornece de forma rápida o saldo líquido de 2 ATPs e a conversão de piruvato a lactato permite a reciclagem de NADH a NAD⁺ para dar continuidade a via glicolítica, que também fornece glicose-6-fosfato para a via das pentoses-fosfato produzir nucleotídeos e coenzimas. De fato, células que apresentam deficiências na cadeia transportadora de elétrons podem crescer e formar colônias por adotar a glicólise aeróbica e usar a glutamina como fonte de carbono para suprir a deficiência de intermediários produzidos durante o TCA (MULLEN *et al* 2011).

Então, de forma resumida, os tumores podem adotar dois fenótipos metabólicos: o oxidativo ou o glicolítico aeróbico. Recentemente foi sugerido um terceiro fenótipo metabólico tumoral, o estado híbrido, que consiste da adoção simultânea da glicólise aeróbica e da OXPHOS (YU *et al* 2017). Células com esse fenótipo poderiam ter uma vantagem adaptativa por ter maior plasticidade e poder se adaptar a diferentes ambientes, além de maior produção de energia e de metabólitos para síntese de macromoléculas (YU *et al* 2017). Adicionalmente, a existência de correlação entre expressão de genes da via glicolítica e da fosforilação oxidativa em dados de células únicas reforça que os dois metabolismos não são excludentes (XIAO *et al* 2019).

Tumores ainda podem apresentar diferentes subpopulações celulares com metabolismo distintos, contribuindo para a heterogeneidade tumoral (HENSLEY *et al*

2016). Esse fenômeno pode ser reforçado pela diferença de disponibilidade de nutrientes entre diferentes áreas do tumor (HENSLEY *et al* 2016). Xiao *et al* 2019 viram que entre as rotas metabólicas as que mais contribuem para a heterogeneidade intratumoral são a OXPHOS e o TCA. Além disso, os mesmos autores observaram que células do microambiente tumoral têm características metabólicas que são compartilhadas entre diferentes pacientes, enquanto que as células tumorais não, indicando maior plasticidade. HALBROOK *et al* 2020 identificaram que clones provenientes do mesmo tumor pancreático se dividiam em dois grupos com características metabólicas distintas, e que a asparagina liberada por um grupo de células pode favorecer a tolerância no outro grupo. ROECH *et al* 2013 mostraram que existe uma subpopulação de células de proliferação lenta que apresenta metabolismo oxidativo e está associada com a resistência. Sub-populações de proliferação rápida e lenta com diferenças no metabolismo também foram identificadas em glioblastoma (HOANG-MINH *et al* 2018). Ainda, SANCHO *et al* 2015 demonstraram que células tumorais pancreáticas com características tronco apresentavam metabolismo oxidativo enquanto as células diferenciadas apresentavam o fenótipo Warburg.

Outra característica importante é que as células tumorais podem apresentar plasticidade metabólica, a qual parece ser importante para a progressão tumoral. Nesse sentido, células tumorais circulantes, responsáveis pelo estabelecimento de metástases, favorecem a respiração mitocondrial e tem aumento no Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α , *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) (LEBLEU *et al* 2014), responsável por induzir biogênese mitocondrial, e o aumento nesta proteína esta relacionada com a migração e invasão. Por outro lado as metástases estabelecidas tiveram esse fenótipo parcialmente revertido.

A respiração mitocondrial tem ainda um impacto importante na instabilidade genômica: a cadeia transportadora de elétrons é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ao ser incompletamente reduzido, o oxigênio molecular se torna o radical superóxido (O₂⁻), que pode reagir com macromoléculas. A enzima superóxido dismutase que tem como papel converter essa molécula altamente reativa em peróxido

de hidrogênio (H_2O_2). Este por sua vez pode ser convertido a água pela ação das enzimas catalase, glutathione peroxidase ou peroxiredoxina, ou pode sofrer reação de Fenton e formar o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que assim como o O_2^- pode reagir e danificar macromoléculas celulares. Assim, as ROS são responsáveis por danificar DNA, lipídios e proteínas, e, somada a MOMP minoritária (descrito abaixo), podem provocar mutações.

Por fim, o remodelamento metabólico também possibilita a formação dos chamados oncometabólitos. Um exemplo é o já citado 2-HG, produzido quando ocorre mutação de ganho de função na enzima IDH, que originalmente atua no TCA. Outros exemplos são o acúmulo de fumarato e succinato, causados respectivamente pela mutação de perda de função da enzima fumarato hidratase e succinato desidrogenase, também originalmente envolvidas com o TCA (CAMPBELL & WELLEN 2018). O acúmulo desses metabólitos leva a alterações epigenéticas devido à inibição de enzimas demetilases (SCIACOVELLI *et al* 2016) e como consequência o aumento da expressão de HIF-1 α (O'FLAHERTY *et al* 2010), contribuindo para a progressão tumoral.

Todas essas observações levantaram a possibilidade de usar o metabolismo como alvo para terapias, conforme abordado na seção abaixo.

5.1.1 Inibição da fosforilação oxidativa como estratégia terapêutica

As alterações metabólicas tumorais têm sido vistas há bastante tempo como possíveis alvos de terapia. Já foi sugerido que marcadores metabólicos podem prever a sensibilidade ao tratamento (CHENG *et al* 2019), e vários estudos mostram que metabolismo adotado por uma célula pode ser uma estratégia de tolerância (ROECH *et al* 2013, SORIANO *et al* 2016, RUPRECHT *et al* 2017). Porém, inibidores das vias metabólicas falharam, e a plasticidade e capacidade de adaptação a pressões ambientais podem ser fatores limitantes (MCGUIRK *et al* 2020). Portanto a combinação de drogas que afetam mais de um ponto do metabolismo, como a via glicolítica e mitocondrial (CHEONG *et al* 2011), a inibição de enzimas reguladoras da

plasticidade metabólica (PUSAPATI *et al* 2016) ou mesmo a combinação entre quimioterápicos, que criam uma vulnerabilidade metabólica, com inibidores podem ser alternativas mais eficientes.

Em estudo prévio feito no nosso laboratório, células de glioma tratadas com TMZ apresentaram uma alteração metabólica com aumento da respiração mitocondrial (BUENO E SILVA 2016). Esse efeito possivelmente causa uma vulnerabilidade metabólica, e a administração de drogas supressoras do metabolismo mitocondrial pode ser uma alternativa para prevenir o desenvolvimento da tolerância e resistência tumoral (BUENO E SILVA 2016). Estudos anteriores também mostram que células resistentes à TMZ apresentam alterações na atividade mitocondrial (OLIVA *et al* 2010, OLIVA *et al* 2011). Adicionalmente células intermediárias entre resistente e sensível apresentam aumento na respiração mitocondrial, e também, em relação ao aumento da expressão, as vias metabólicas são as mais alteradas nos dias 4 a 12 após o tratamento com TMZ (RABÉ *et al* 2020). O capítulo III desta tese teve como objetivo ampliar a compreensão do papel da mitocôndria na resposta ao tratamento com a TMZ, com especial atenção a dinâmica da quantidade mitocondrial em células únicas com a finalidade de apontar para a possibilidade de novas estratégias terapêuticas.

5.2 Controle da apoptose

As mitocôndrias têm um papel central no controle da apoptose. A apoptose é essencial para a manutenção da homeostase e para o desenvolvimento dos organismos, prevenindo a tumorigênese e contribuindo, por exemplo, para a formação dos dígitos (JACOBSON *et al* 1997). Essa via é subdividida em apoptose extrínseca, quando o sinal para a morte celular provém da membrana celular através da ativação dos receptores de morte, e intrínseca, quando o sinal provém de eventos intracelulares, tais como os desencadeados pelo dano ao DNA, e ambas convergem para a ativação das caspases efetoras 3 e 7. Nesse cenário, as mitocôndrias estão envolvidas com a liberação de proteínas que ficam no seu espaço intermembranas quando acontece a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), que

por sua vez é regulado pelas proteínas da família BCL-2. Essas proteínas se dividem em três grupos: as anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-W, BCL-X L , A1 e MCL1), as pró-apoptóticas efetoras (BAX, BAK e BOK) e as pró-apoptóticas BH3-apeenas (BID, BIM, BAD, BIK, BMF, HRK, NOXA e PUMA). Após um estímulo estressor, as proteínas BH3-apeenas têm aumento na expressão ou são ativadas pós-transcricionalmente e ativam BAX e BAK, que se oligomerizam e formam poros na membrana mitocondrial causando o MOMP. Por outro lado, as proteínas anti-apoptóticas BCL-2 inibem a ativação de BAX e BAK por competir com as proteínas BH3-apeenas e/ou por se ligar à BAX e BAK, inativando-as (BOCK & TAIT 2019).

Sendo assim, o estado de equilíbrio de ativação dessas proteínas determina o destino da célula. A existência de células que sobrevivem baseadas na expressão das proteínas BCL-2 antiapoptóticas levou à hipótese de células preparadas para morte (*primed cells*), às quais são mais sensíveis a indução de apoptose (CERTO *et al* 2006). Essas células se diferenciam das demais por que nelas a simples inibição das proteínas BCL-2 antiapoptóticas desencadeia apoptose. Essa característica influencia a eficiência de tratamentos e portanto tem valor preditivo (MONTERO *et al* 2015). Adicionalmente, foi demonstrado que fibroblastos podem modular a sensibilidade de células tumorais a diversas classes de drogas quimioterápicas por alterar o estado de preparação para a apoptose (LANDRY *et al* 2018).

Após a formação dos poros na membrana, o citocromo c liberado no citoplasma se liga ao APAF1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*), formando o apoptosomo, que irá clivar e ativar a caspase iniciadora 9, que por sua vez cliva e ativa as caspases executoras. A MOMP também libera as proteínas SMAC e OMI que inibem proteínas inibidoras de caspase da família IAP, como XIAP (BOCK & TAIT 2019). Por muito tempo, a MOMP foi considerada o ponto sem volta para a morte celular. Entretanto, hoje sabemos que o fenômeno de MOMP minoritário pode acontecer (ICHIM *et al* 2015). Nesse caso, a indução de MOMP ocorre em uma minoria de mitocôndrias, não tendo força o suficiente para induzir a morte, porém levando à ativação de caspases que provocam quebras no DNA e levam à instabilidade genômica, podendo inclusive desempenhar um papel pró-tumoral.

A massa mitocondrial pode ser um fator preditivo para a indução de morte após tratamento por ela se correlacionar com a expressão de BAX e BAK (MÁRQUEZ-JURADO *et al* 2018) de uma maneira dependente da linhagem (SANTOS *et al* 2019). Portanto, as mitocôndrias tem um papel central na definição do destino entre vida ou morte de células.

5.3 Dinâmica mitocondrial

Mitocôndrias passam por remodelamento contínuo, com ciclos de fusão e fissão conforme a necessidade celular momentânea, além dos processos de biogênese e degradação que levam à renovação (*turnover*). Com esses mecanismos as células garantem proteção para momentos de estresse (GOMES *et al* 2011), destruição de mitocôndrias danificadas (Onishi *et al* 2021) e aumento na produção de ATP (LIESA & SHIRIHA 2013). De fato, a dinâmica mitocondrial está associadas com importantes processos como a neurogênese (IWATA *et al* 2020) e falhas nesse processo estão relacionadas com a doença de Parkinson (PICKRELL & YOULE 2015). Essa dinâmica também é importante em tumores, como evidenciado pelas amplificações gênicas observadas em vários tipos tumorais (ANDERSON *et al* 2018), e podem ser alvo para a terapia (ANDERSON *et al* 2018).

Dependendo dessa dinâmica a morfologia mitocondrial pode estar organizada em rede ou isoladas. A fusão depende inicialmente da aproximação de mitocôndrias isoladas, processo que envolve o citoesqueleto (MATTENBERGER *et al* 2003), e para ocorrer exige que as mitocôndrias tenham potencial de membrana (MATTENBERGER *et al* 2003), assim a célula garante que apenas mitocôndrias saudáveis passem por fusão, as quais mantêm homogeneidade genética e bioquímica devido ao compartilhamento de seus componentes, enquanto as mitocôndrias velhas permanecem isoladas e podem ser direcionadas para a degradação. Adicionalmente, a fissão pode gerar mitocôndrias desiguais em relação ao potencial de membrana para que a mitocôndria danificada seja direcionadas à degradação (TWIG *et al* 2008). De

fato, os ciclos de fusão e fissão são essenciais para a saúde mitocondrial ser mantida e portanto a manutenção celular (MISHRA & CHAN 2014).

A fusão das membranas mitocôndrias externas depende da formação de complexos entre as proteínas mitofusina 1 e 2 (MFN1 e 2), enquanto a fusão das membranas mitocôndrias internas dependem de *Mitochondrial Dynamin Like GTPase* (OPA1) (PERNAS & SCORRANO 2016). Por outro lado a fissão depende da translocação do citoplasma para a mitocôndria e oligomerização da proteína DRP1, a qual provoca a constrição ao redor dos pontos de fissão pela hidrólise de GTP (PERNAS & SCORRANO 2016).

Outro processo essencial para a manutenção de mitocôndrias saudáveis é a eliminação de mitocôndrias danificadas pela mitofagia. O processo inicia pela estabilização da proteína PINK na membrana mitocondrial externa após a despolarização da membrana. PINK provoca a ativação de PARKIN, que então passa a se localizar na membrana mitocondrial externa das organelas danificadas, onde provoca a ubiquitinação de alvos ali localizados, gerando um sinal para a degradação com consequente engolfamento da mitocôndria por autofagossomos. Alternativamente, existem receptores que também medeiam a mitofagia (ONISHI *et al* 2021).

Já a biogênese mitocondrial ocorre por adição de componentes novos à rede mitocondrial existente. A taxa de renovação varia entre tecidos, sendo de 2 dias no fígado até 14 dias no coração, com isso estima-se que em cardiomiócitos, que tem cerca de 10000 mitocôndrias por célula, uma unidade mitocondrial seja substituída a cada 4 minutos (GOTTLIEB & STOTLAND 2015). Existem diversos fatores envolvidos na biogênese, uma das proteínas centrais e que coordenam a ação das demais proteínas é a PGC-1 α , que pode interagir com diversas moléculas e coativar a transcrição de múltiplos alvos. Outros membros dessa mesma família de coativadores são o Coativador 1-beta do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 β , *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta*) e Proteína 1 relacionada ao coativador de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPRC, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1*) (KELLY & SCARPULLA 2004). A transcrição dos genes presentes no

DNA mitocondrial ocorre com a ação das proteínas TFAM, POLRMT, TFB1M e TFB2M (FALKENBERG *et al* 2002), que geram transcrito poligênico que é posteriormente processado. Essa maquinaria de transcrição também é importante para a replicação do mtDNA, isso porque o primer necessário para o início da síntese de DNA é formado pelo processo de transcrição, que é terminado prematuramente e substituído DNA polymerase γ (WANROOIJ *et al* 2018). Por outro lado, os genes com função mitocondrial localizados no núcleo tem sua transcrição controlada por outros fatores, como NRF1 (KELLY & SCARPULLA 2004). Os lipídeos que compõem as duas membranas mitocondrias são formados no citoplasma e dentro da própria organela (HORVATH & DAUM 2013).

Assim, quando existem demandas energéticas, as vias de sinalização levam a ativação da transcrição de PGC-1 α , ou dos outros fatores transcripcionais acima descritos, de uma maneira tecido-dependente. Por exemplo, exposição ao frio leva ao aumento na expressão de PGC-1 α no tecido adiposo, enquanto que no músculo esquelético PGC-1 α é estimulado em resposta à exercícios. O PGC-1 α por sua vez promove a transcrição de alvos como por exemplo TFAM e NRF1, além de estimular outras vias metabólicas.

A dinâmica mitocôndrial também é importante para a partição simétrica durante a divisão celular, uma vez que a fragmentação na mitose favorece a adequada partição do conteúdo mitocondrial (TAGUCHI *et al* 2007, MISHRA & CHAN 2014). Como já mencionado, a partição assimétrica de mitocôndrias estão relacionadas à manutenção do fenótipo tronco (HINGE *et al* 2020, KATAJISTO *et al* 2015). Embora a fissão mitocondrial provocada por DRP1 seja importante para a partição da organela (KATAJISTO *et al* 2015), estudos sobre o controle desse fenômeno apresentaram resultados contraditórios (CARLTON *et al* 2020, CHUNG *et al* 2016) e devem ser temas de estudos futuro.

5.4 Heterogenidade mitocondrial

Mitocôndrias são organelas que apresentam alta variabilidade, em parte por apresentar DNA próprio, sendo que uma única mitocôndria pode apresentar diferentes variantes de mtDNA (MORRIS *et al* 2017). A presença de mais de uma variante de mtDNA em uma célula é chamada de heteroplasmia e está envolvida com distúrbios mitocondrias, a frequência de tais variantes estão sujeitas tanto à seleção quanto à deriva genética (ARYAMAN *et al* 2019, STEWART & CHINNERY 2015). Como já dito, o mtDNA é importante para a tumorigênese (DONG *et al* 2017) e progressão tumoral (SANSONE *et al* 2017). Diferentes *backgrounds* genéticos mitocondriais produzem diferenças na progressão tumoral (BRINKER *et al* 2017). Mesmo que a maioria dos tumores sofram seleção negativa para as mutações truncadas no DNA mitocondrial, alguns tumores apresentam a tendência contrária (YUAN *et al* 2020).

As mitocôndrias são heterogêneas também quanto a sua composição entre diferentes tecidos, compartilhando apenas 57% do conteúdo (WOODS 2017). Isso pode ser o reflexo das diferentes funções que são adotadas pela organela em cada tecido, que incluem, além das funções citadas nas seções anteriores, a regulação do Ca^{2+} intracelular, a produção de ROS, termogênese e síntese de esteróides (WOODS 2017).

Outra camada de heterogenidade é a quantidade de mitocôndrias em cada célula, definida pelas taxas de biogênese e mitofagia. Os níveis mitocondriais influenciam a síntese proteica (MIETTINEN & BJORKLUND, 2016, NEVES *et al* 2010), a taxa de crescimento (NEVES *et al* 2010), transcrição (GUANTES *et al* 2015) e a probabilidade de morte (JURADO *et al* 2018, SANTOS *et al* 2019). A massa mitocondrial também é correlacionada com o tamanho celular, embora sua funcionalidade não apresente uma relação linear com o tamanho (MIETTINEN & BJORKLUND, 2016). Possivelmente outros aspectos ainda pouco explorados adicionam heterogenidade quanto a funcionalidade e morfologia das mitocôndrias, incluindo a dinâmica mitocondrial, mitoses assimétricas e a herdabilidade, a localização subcelular, o nível de interação com o retículo endoplasmático, a composição e topologia das membranas. É esperado que a massa mitocondrial tenha influência sobre a progressão tumoral e a resposta à terapia.

6. Hipóteses de trabalho

As terapias atuais para tumores, em especial glioblastoma, têm como grande desafio atingir todas as células de um tumor, que são altamente heterogêneas, para evitar a resistência e recidiva. Cada vez mais aparecem evidências que apontam para a instabilidade e baixa herdabilidade de alguns fenótipos tumorais, e esse fenômeno acrescenta ainda mais complexidade nos quadros clínicos. A hipótese de trabalho desta tese é que células clonais apresentam divergências no *fitness* devido a sua baixa herdabilidade, a qual é provocada pela dinâmica e herdabilidade de outros fenótipos isolados, tal como a quantidade de mitocôndrias.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a dinâmica de fenótipos em células de glioblastoma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a dinâmica do *fitness* celular entre gerações celulares;
- II. Avaliar a sincronia do ciclo celular entre células clonais;
- III. Identificar se existem mitoses assimétricas em células de glioma e seu impacto sobre o *fitness*;
- IV. Identificar a resposta da massa mitocôndrial ao tratamento com TMZ e o sua influência no *fitness*.

CAPITULO I

APRESENTAÇÃO

Que os tumores são doenças muito heterogêneas já sabemos, porém o paradigma atual considera as células individuais nos tumores como estruturas estáticas, e nesse caso a variabilidade é acrescentada principalmente por eventos genéticos estáveis, como mutação. O artigo “*Cancer cell fitness is dynamic*”, publicado na revista *Cancer Research*, foi um esforço coletivo do nosso grupo de pesquisa para comprovarmos a natureza dinâmica do *fitness* celular. Além disso, nesse trabalho nós propomos uma metodologia para medir o quanto uma característica, no caso o *fitness*, das células são conservadas entre as células de uma colônia.

Minha participação no artigo foi fundamental, o que se reflete na primeira autoria compartilhada com meus colegas Juliano L. Faccioni, Paula A. Bracco e Jephesson A. F. Santos. Os experimentos desenvolvidos por mim foram os que geraram dados da dessincronização do ciclo celular, através do FUCCI e Ki67 e clonogênicos com cisplatina, A172 selvagem e MCF7. Além disso, contribui para a obtenção de dados e análises dos demais clonogênicos, diferença no *fitness* entre células irmãs e contribuição da morte na variância. Esse trabalho teve um grande impacto na minha formação como doutora, em especial porque, com ele, eu implementei a técnica de CRISPR no laboratório.

Cancer Cell Fitness Is Dynamic

Luana S. Lenz^{1,2}, Juliano L. Faccioni^{1,2}, Paula A. Bracco³, Jephesson A.F. Santos^{1,2}, Luiza C. Pereira^{1,2}, Julieti H. Buss^{1,2}, Mauricio T. Tamborindeguy^{1,2}, Daphne Torgo^{1,2}, Thayana Monteiro^{1,2}, Giovana B. Mantovani^{1,2}, Carolina N. Santo^{1,2}, Julia C. Marcolin^{1,2}, Eloisa Dalsin^{1,2}, Alvaro Vigo^{3,4}, Sidia M. Callegari-Jacques⁴, Andrew O. Silva^{1,2}, Giovana R. Onzi^{1,2}, Karine R. Begnini^{1,2}, and Guido Lenz^{1,2}



ABSTRACT

Several phenotypes that impact the capacity of cancer cells to survive and proliferate are dynamic. Here we used the number of cells in colonies as an assessment of fitness and devised a novel method called Dynamic Fitness Analysis (DynaFit) to measure the dynamics in fitness over the course of colony formation. DynaFit is based on the variance in growth rate of a population of founder cells compared with the variance in growth rate of colonies with different sizes. DynaFit revealed that cell fitness in cancer cell lines, primary cancer cells, and fibroblasts under unhindered growth conditions is dynamic. Key cellular mechanisms such as ERK signaling and cell-cycle synchronization differed significantly among cells in colonies after 2 to 4 generations and became indistinguishable from randomly sampled cells regarding these features. In the presence of cytotoxic agents, colonies reduced their variance in growth rate when compared

with their founder cell, indicating a dynamic nature in the capacity to survive and proliferate in the presence of a drug. This finding was supported by measurable differences in DNA damage and induction of senescence among cells of colonies. The presence of epigenetic modulators during the formation of colonies stabilized their fitness for at least four generations. Collectively, these results support the understanding that cancer cell fitness is dynamic and its modulation is a fundamental aspect to be considered in comprehending cancer cell biology and its response to therapeutic interventions.

Significance: Cancer cell fitness is dynamic over the course of the formation of colonies. This dynamic behavior is mediated by asymmetric mitosis, ERK activity, cell-cycle duration, and DNA repair capacity in the absence or presence of a drug.

Introduction

Cancer cell heterogeneity has historically been credited to genetic variations produced by a long and intricate evolutionary process that occurs during tumorigenesis and response to therapy. This genetic heterogeneity, as documented by single-cell genomics, revealed a complexity far beyond that inferred from bulk tumor sequencing (1). Notwithstanding, cells constantly change their phenotypic state, altering the level of proteins, the activation state of signaling pathways, and modulation of complex processes (2–4). Asymmetric mitosis may also contribute for phenotypic heterogeneity, as it can impact the amount of organelles, such as mitochondria, that each cell receives after division, and contribute to the increase in variability among genetically identical cells (5–7).

Most assessments of genotypic or phenotypic intratumoral heterogeneity were performed using analyses at discrete time points, with little information about their dynamics. When dynamic behaviors were measured, they were restricted to the localization of single proteins (3), activation of signaling pathways (8), or the interplay of processes such as autophagy and senescence (2). These studies revealed that the behavior of individual cancer cells is very dynamic, with a stochastic component that is completely overlooked with the traditional assessment of cancer biology based on the average behavior of a large number of cells at a defined time point. While it is challenging to assess the relative contribution of genetic versus nongenetic causes of intratumoral cellular heterogeneity, recent studies of single-cell RNA sequencing demonstrated considerable variation in the transcriptomic profile of cells organized in colonies. Part of this nongenetic heterogeneity stems from DNA methylation hotspots with high variability among cells in the same colony (9, 10).

A key phenotype of a cancer cell is its fitness, measured by the number of descendants it generates in a given time frame, both under unhindered growth condition or in the presence of challenges, such as a cytotoxic or cytostatic drug. In cancer, cell fitness can be considered as an integrative phenotype, as it represents the most important trait of a cancer cell, being alive and leaving descendants (11, 12). Although measuring fitness is commonly performed by counting the number of descendants of a given cell, interpreting its fluctuations with regards to time or cell division is more complex, because measuring fitness requires at least one complete cell cycle. In addition, if fitness is below the cell's survival threshold, the cell will die and thus no further information can be collected from this specific cell or its descendants, impeding the assessment of the dynamics in fitness. To overcome these limitations, we developed the Dynamic Fitness Analysis (DynaFit) method for quantification of fitness dynamics, and applied it to a variety of cell culture scenarios. We found that after a few generations, colonies became more similar to each other when compared with their

¹Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ²Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ³Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ⁴Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

L.S. Lenz, J.L. Faccioni, P.A. Bracco, and J.A.F. Santos contributed equally to this article.

Corresponding Author: Guido Lenz, UFRGS, Av Bento Gonçalves, 9500, Predio 43431, sala 107, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970, Brazil. Phone: 5551-3308-7620; Fax: 5551-3308-7003; E-mail: lenz@ufrgs.br

Cancer Res 2021;81:1040–51

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2488

©2020 American Association for Cancer Research.

founder cells in relation to fitness. Analysis of ERK signaling, cell-cycle synchrony, DNA damage, and senescent phenotypes indicated that the low variance among colonies is due to a gradual increase in heterogeneity of the cells composing these colonies regarding the above-mentioned phenotypes.

Materials and Methods

Fitness of colonies

Cells were plated at a density of 32 cells per cm^2 , the number of cells per colony was counted manually at three different time points and the identity of the colony was determined by its location. Colonies of the same or similar size were grouped and the variance of these colonies was calculated. A minimum of 20 colonies was used per group when calculating variance (Supplementary Fig. S1A–S1C). The value 0.5 was used to denote total elimination of a colony to avoid undefined log values. Cell lines used were A172, U251, MCF7 from the ATCC. U251 was STR validated in October 2018 by the Banco de Células do Rio de Janeiro. Primary cells were obtained as described previously (13, 14). All cells were routinely tested for *Mycoplasma* using the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

DynaFit Implementations

We implemented DynaFit using two different analytic strategies: an application that estimates the growth rate (GR) variance by bootstrapping each colony size (CS) group (Supplementary Fig. S2A–S2C), and a web application that selects a generalized additive model for location, scale, and shape (GAMLSS; ref. 15) that best fits the data for predicting the GR variance (Supplementary Fig. S2D and S2E). The statistical bootstrap is performed through a desktop interface written in Python (<http://www.ufrgs.br/labsinal/dynafit/>). The code is made freely available at <https://github.com/jfaccioni/dynafit>. The predictive modeling is performed through an R Shiny web application (<https://paulabracco.shinyapps.io/Rapp/>). A detailed description of their functionality and use is given in the Supplementary Material and Methods file. The rationale is also explained in Supplementary Video S1 and the implementation of DynaFit is shown in Supplementary Video S2.

Fitness of sister cells

To perform the fitness analysis, cells were plated at low density at day 0 and at day 1. If applicable, temozolomide (Sigma-Aldrich) was added after 24 hours at 6.25 $\mu\text{mol/L}$, for 3 hours. Cells were imaged every 12 hours for 8 days and the number of descendants alive for each sister cell was counted and plotted on the y -axis in base \log_2 scale. The area between curves (ABC) was used to measure the difference in fitness of sister cells. ABC between sister cells was compared with H_0 (cells with the same fitness) and with H_1 , in which the nonrelated cells were randomly paired.

Live-cell tracking

Live cell measurement of ERK activity was performed using A172 glioma cells stably expressing ERK-KTR fluorescent reporter (16) and the nuclear marker Apple-53BP1trunc (17) via lentiviral transduction (18). DNA damage was measured by counting nuclear foci of Apple-53BP1trunc. Cell-cycle synchronization analysis was performed with FastFUCCI (Supplementary Fig. S3A–S3D) and the tagging of the endogenous locus of Ki67 was done with YFP using Cas9 (Supplementary Fig. S4; ref. 19). Details of these procedures are provided in the Supplementary Materials and Methods file.

DNA damage and nuclear morphometric analysis

Cells expressing 53BP1truncApple were plated at low density, imaged for red fluorescence to assess 53BP1 foci and nuclear morphometry (20) in colonies prior to and after treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide for 3 days.

Results

Variance in colony growth rate indicates that fitness is dynamic

DynaFit is based on the fitness variance of single cells and their descendants organized in colonies. Individual cells originated from a heterogeneous population will have different growth rates (GR) with a given variance σ_0^2 . If the GR of the founder cell is copied to all cells in the colony, then the GR variance across colonies (σ^2) will be equal to σ_0^2 . (Fig. 1A and B). In a colony variance plot (CVP), formed by the \log_2 values of the variance in GR versus the \log_2 of colony size (CS), this will produce a straight line with no inclination at the \log_2 value of σ_0^2 . This scenario of total fitness conservation was named the null hypothesis (H_0 , Fig. 1C, red line).

The alternative hypothesis (H_1) of this rationale is given by the variability among groups of randomly sampled individuals from the same population. In this case, the variance among the groups will have an inclination of minus one and an intercept in the CVP according to Eq. (A) (for more details, refer to the Supplementary Materials and Methods file):

$$\log_2(\sigma^2) = -\log_2(\text{CS}) + \log_2(\sigma_0^2) \quad (\text{A})$$

GR variance from actual colonies will be located between these two lines of the CVP and the distance of this variance to the two hypothetical scenarios will indicate the degree of fitness conservation for a given CS (Fig. 1C, black dot).

To perform DynaFit, cells were plated at low density and allowed to form colonies of different sizes for 3 to 7 days. At this point, colonies were imaged and the number of cells in the colonies was counted producing colony size 1 (CS1). Colonies were grown for another 3 days, imaged to produce CS2 and then grown for a further 3 to 5 days to produce CS3 (Fig. 1D). All colonies were assumed to have started from a single cell (CS0) and the colony identity was obtained from its location. CS1, CS2, and CS3 were used to calculate GR1, GR2, and GR3 according to Eq. B.

$$\text{GR}_i = \frac{\log_2(\text{CS}_i) - \log_2(\text{CS}_{i-1})}{\text{days}} \quad (\text{B})$$

To obtain empirical distributions for the variances in the different CS, GR values in each CS were bootstrapped and the variance was calculated at each repeat. The average variance and its standard deviation for each CS was used to generate the CVP.

For the U251 glioma cell line, the CVP for GR2 produced a gradual reduction in variance, which was positioned between H_0 and H_1 (Fig. 1E). Because the relative distance from these two hypotheses is the key information to be analyzed, a hypothesis plot (HP) was produced, that measures the relative distance of the experimental data to these contrasting scenarios. This can be done either by measuring the vertical distance at a specific CS (end-point HP) or the relative area from CS0 to a specific CS (cumulative; Fig. 1F). The HP of the U251 glioma shows that variance of GR of colonies gradually reduces with the increase in CS, reaching about 40% of the distance between H_0 and H_1 after three generations and thereafter remaining at this level for up to 6 generations (Fig. 1E and F). GR1, GR2, and GR3 of U251 colonies did not correlate, in line with the low conservation of GRs

Lenz et al.

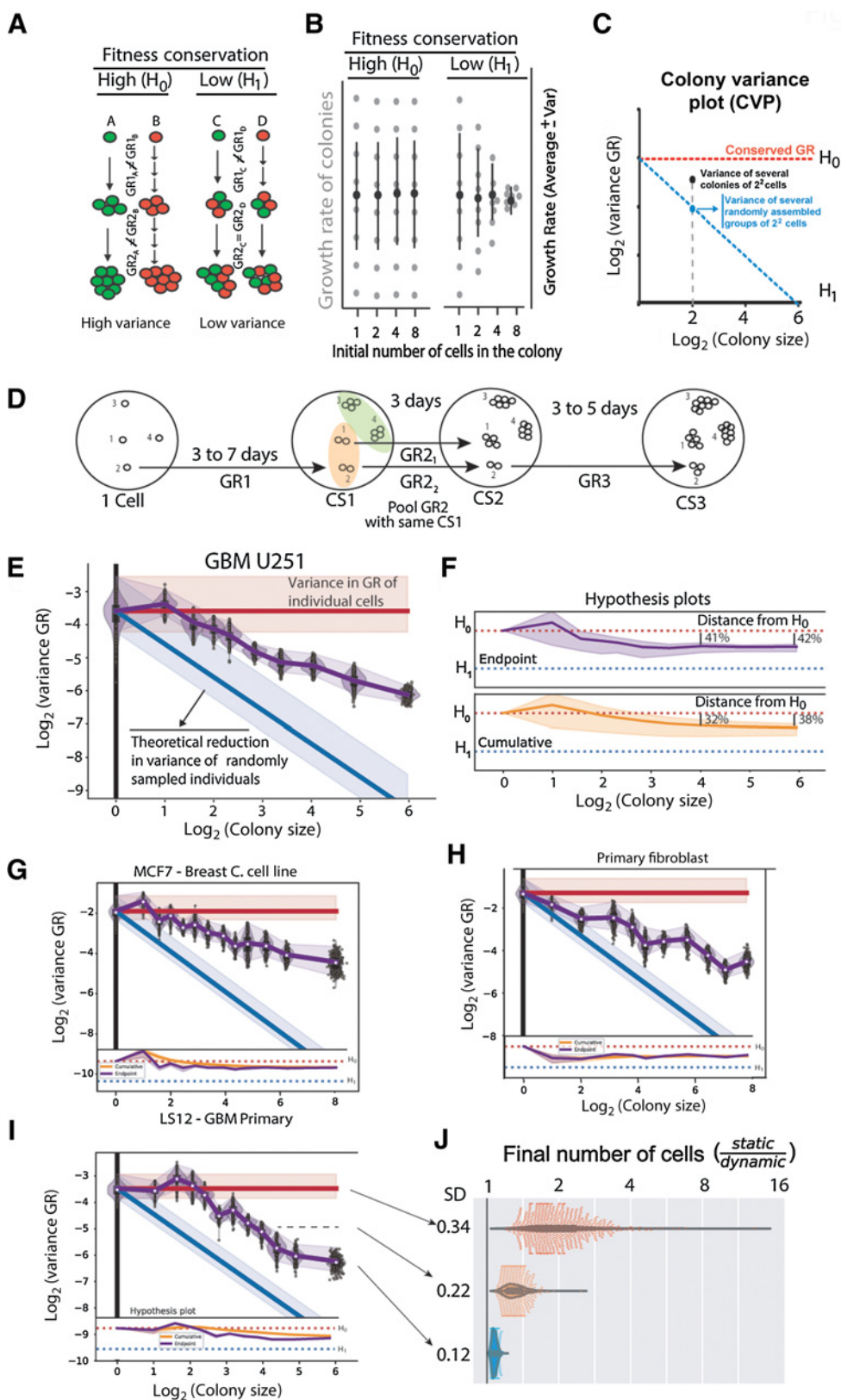


Figure 1. Degree of fitness dynamics. **A**, High conservation of fitness will preserve the differences of the founder cells even among large colonies, whereas a small conservation will turn the growth rate of colonies similar. **B**, Variance in GR will remain high if fitness is conserved with an increase in colony size, whereas variance will reduce with the colony size if fitness is not conserved. **C**, CVP of conserved fitness (red) or randomly grouped cells in different group sizes (blue). Black dot represents the putative GR variance of colonies with initial colony size (CS) of 4. **D**, Cells were plated at low density and imaged at different time points to produce colony size CS1, CS2, and CS3, which were used to determine growth rates GR1, GR2, and GR3. GRs of colonies with the same initial number of cells were grouped to calculate the variance. **E**, CVP produced by bootstrapping the GR of colonies with similar number of cells of the glioma cell line U251 compared with the hypothetical lines of randomly sampled group of cells (blue) and colonies in which all cells retain the GR of their founder cell (red). Shades are the 95% confidence interval. **F**, Hypothesis plot of the relative distance of the data to H_0 at a given point (top) or cumulative (bottom). **G-J**, CVP of a breast cancer cell line (**G**), CVP of a primary fibroblast culture (**H**), CVP of a primary GBM (**I**), and paired final population size of the growth of a population of cells under static versus dynamic fitness for 20 generations (**J**). Simulation parameters were derived from the CVP of the primary GBM cell culture. A detailed description of the simulation is provided in the Supplementary Materials and Methods.

indicated by DynaFit (Supplementary Fig. S5A and S5B). The average GR of colonies followed a straight logarithmic growth and was not dependent on the initial colony size, except for colony size 1 and 2 (Supplementary Fig. S5C and S5D). The Allee effect, in which large populations have a fitness advantage in relation to small populations, is well known in evolutionary biology and was shown to occur also in cancer cells (21). This was not observed in our assay, because our data indicate that the GR of cells at low density used for the DynaFit experiments was larger than at high density (Supplementary Fig. S5E). CVP of GFP-tagged cells in the presence of a 100-fold excess unlabeled cells also indicated no difference in the dynamics of variance reduction, despite a reduced overall variance of the cloned GFP-tagged cells (Supplementary Fig. S5F and S5G).

Fitness was also dynamic in a primary culture of glioblastoma (13), another glioma cell line (A172; Supplementary Fig. S5F), in a breast cancer cell line (MCF7) and in a primary fibroblast culture (Fig. 1G–I; ref. 14). The reduction in GR variance with colony size was quite different among cell types, with no indication that the dynamic in fitness is a cancer-exclusive phenotype.

Evolutionary biologists have long recognized that the fitness of organisms is not static due to the biology of the organisms or fluctuations in the environment. In a classic work, Lewontin and Cohen showed that dynamic fitness leads to a smaller population growth than static fitness with the exact same average fitness (22). We simulated a populational growth model using the average growth rate of the primary GBM cell line with the maximum and minimum variance observed with DynaFit. These data confirmed that a static fitness produced, after only 20 generations, larger population sizes than the dynamic fitness, indicating the impact of the dynamics in fitness in cancer cell populations (Fig. 1J).

Phenotype conservation during mitosis

To determine the origin of the dynamics in fitness, we measured the conservation, in sister cells, of phenotypes that play important roles in cancer cell fitness. For cells, the H_0 represents equal sister cells and H_1 applies to the absence of phenotype conservation, when sister cells are as different as unrelated cells (Fig. 2A).

The above rationale was applied to ERK signaling, as it is an important regulator of cell division and can be used as an indicator

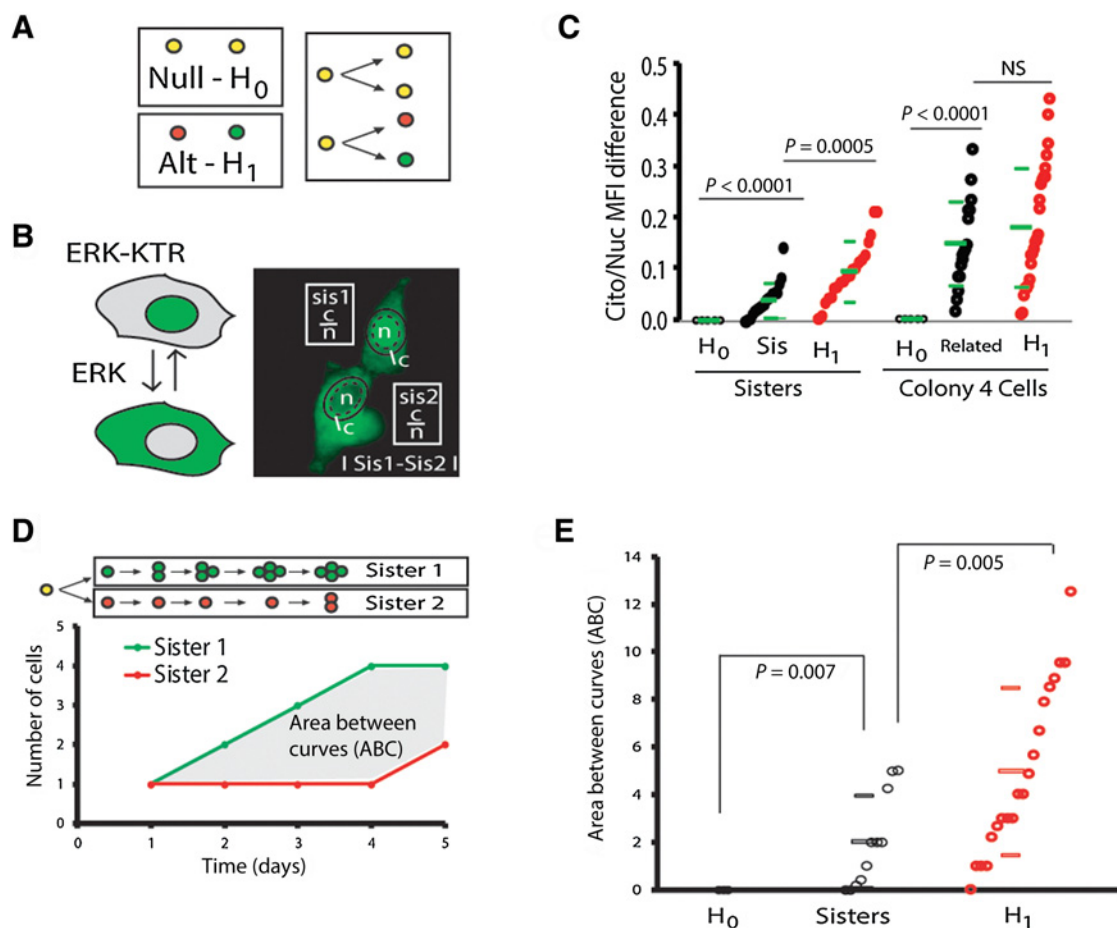


Figure 2.

Degree of mitotic heritability of key phenotypes. **A**, Null hypothesis (H_0) represents perfectly identical cells in regard to a measurable characteristic, and alternative hypothesis (H_1) are unrelated cells. **B**, ERK activity in live cells was measured using KTR. **C**, Differences in ERK activity of sister cells, colonies of four cells, and unrelated cells of the A172 glioma cell line. Mean \pm SD, Student t test. **D**, For each sister cell, the number of descendant cells was counted each day and the area between the curves (ABC) was used to measure the difference in fitness of sister cells. **E**, Sister cells of the A172 glioma cell line were accompanied for 8 days and the ABCs of sisters and unrelated cells are shown. Mean \pm SD, Student t test.

Lenz et al.

of cell fitness. A significant difference in live ERK activity in sister cells, measured with a kinase translocator reporter (KTR; Fig. 2B; ref. 16), was observed over the first 10 hours after mitosis, therefore rejecting H_0 . However, the difference between randomly assembled pairs from the same population of cells was higher than the difference in sister cells, indicating that some information is carried over from the mother to the two daughter cells regarding ERK activity. When colonies of 4 cells were analyzed, it was not possible to statistically distinguish them from randomly assembled quartets, based on the level of ERK activity alone (Fig. 2C).

To measure whether cell fitness is inherited, we counted the descendants of pairs of sister cells and quantified the ABC of the two family trees (Fig. 2D). The average ABC of sister cells was statistically

different from H_0 , but lower than the ABC of unrelated cells from the same population of cells (H_1 ; Fig. 2E). These data show that sister cells are different from each other in relation to ERK activity and fitness, suggesting that asymmetric mitosis is a key mechanism of the dynamic of fitness observed with DynaFit.

Dynamic of loss of cell-cycle synchronization in colonies

If mitosis is asymmetric, then how many generations would be required for cells in a colony to become as heterogeneous as an unrelated group of cells (Fig. 3A)? To answer this question, we stably transduced U251 glioma cells with the FastFUCCI cell-cycle indicator (23) and imaged colonies of different sizes. The degree of desynchronization was measured as follows: the expected distribution of

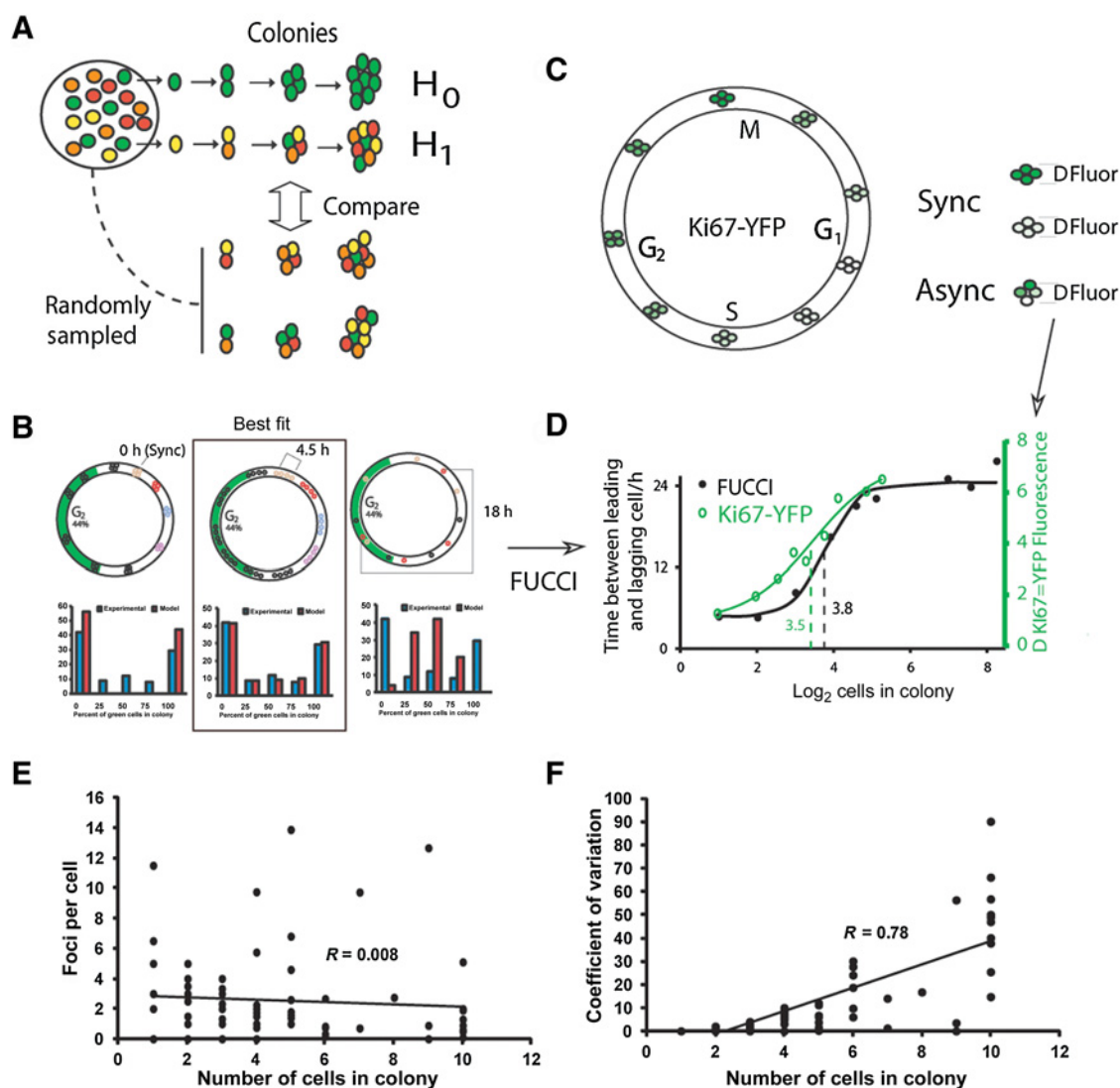


Figure 3.

Dynamic of cell-cycle synchrony in colonies. **A**, H_0 and H_1 applied to cells in colonies – for H_0 , all cells in the colony will be equal to its founder cell and, for H_1 , cells will change with division or time until they are indistinguishable from randomly sampled group of cells. **B**, U251 glioma cells stably expressing the FastFUCCI cell-cycle indicator were grown and photographed in colonies, and the time between the leading and lagging cell of the colonies was estimated on the basis of the distribution of green and nongreen cells in the colonies. **C**, U251 glioma cells in which YFP was inserted in the endogenous loci of *Ki67* using CRISPR-Cas9. Intensity of green fluorescence was used as an indicator of the cell-cycle position. **D**, Time between leading and lagging cell based on the FastFUCCI system (black) and endogenous *Ki67*-YFP fluorescence (green) in relation to the size of the colony. Numbers indicate the colony cell number in \log_2 scale that produced half of the maximal observed desynchronization. **E** and **F**, Number of 53BP1 foci per cell (**E**) and coefficient of variation of foci per cell (**F**) in relation to the number of cells in the colony.

green (G_2 and M) and non-green (G_1 and S) cells was predicted for different desynchronization levels, and the experimental data were then fitted to this distribution (Fig. 3B; Supplementary Fig. S3A–S3D). In addition, we also inserted a fluorescent tag in the endogenous locus of the cell-cycle indicator *Ki67* (19) and measured the fluorescence of cells in colonies of different sizes (Supplementary Materials and Methods). The *Ki67*-induced fluorescence peaks at M phase, reduces gradually to a minimum before S-phase entry and thereafter gradually increasing again (Fig. 3C; ref. 24). The difference in fluorescence between the cell with the lowest and highest fluorescence intensity in a colony also indicates the degree of desynchronization.

Both experimental approaches produced a dose–response–like curve of the desynchronization versus the size of the colony. As expected from the accumulation of asymmetric mitoses, the larger the colony, the farther away a given cell is, on average, from the last common ancestral and therefore the more desynchronized it is. The degree of cell-cycle desynchronization reached half maximum at colony size 3.8 for FastFUCCI and 3.5 for *Ki67*-YFP. Because a \log_2 scale was used, half the maximal desynchronization of cell cycle was observed between 3 to 4 generations (Fig. 3D). This gradual reduction in cell-cycle synchrony agrees with the reduction in GR conservation observed with DynaFit (Fig. 1E and F), in which the maximal distance from H_0 was reached after about three generations.

DNA damage and repair are also key components of cell fitness. To measure DNA damage in live cells, cells were transduced with the DNA damage indicator 53BP1trunc-Apple (17) and cells in colonies were imaged. Untreated A172 glioma cells displayed an average of 1.8 foci of 53BP1 per nucleus, indicating a low basal DNA damage. The number of foci did not correlate with the size of the colony (Fig. 3E). However, when the variation among the cells in colonies was analyzed, cells in larger colonies were more varied than in smaller colonies (Fig. 3F). In line with the DynaFit data and the cell-cycle desynchronization, this result also indicates that with cell division, cells in colonies become gradually more varied also in the basal DNA damage level.

Capacity to survive to a chemotherapeutic agent is dynamic

Fractional killing is a prevalent feature of cancer cells in response to drugs or radiation (3), but little is known about this effect in closely related cells found in colonies. According to the H_0 hypothesis, no fractional killing would be observed in colonies, as conservation of phenotype would lead to a homogeneous response according to the tolerance level of the founding cell. In the H_1 scenario, colonies would gradually undergo more and more fractional killing as colony size increases (Fig. 4A).

Colonies of different size of glioma cells were exposed to temozolomide, the standard therapy for this type of tumor. We previously characterized the response of gliomas over several days to levels of temozolomide found in the plasma of patients, thus more closely mimicking clinically relevant conditions (12). Challenging colonies of U251 glioma cells for 3 days with 50 $\mu\text{mol/L}$ of temozolomide (Fig. 4B) produced a reduction in the average GR during (GR2) and after (GR3) the presence of temozolomide (Fig. 4C; Supplementary Fig. S6A and S6B), as cells have chronic responses to this alkylating agent (2, 12). Interestingly, a low correlation was found between the three measured GRs of individual colonies, indicating that the GR prior to or during temozolomide can not predict the GR in the following period (Fig. 4D). In addition, selection of colonies with specific growth rates during temozolomide did not predict outcome after temozolomide,

and the variance in GR3 of colonies with specific GR2 was very similar, indicating the low conservation of fitness in the colonies (Fig. 4E).

The CVP of cells treated with temozolomide showed a steep reduction in variance with colony size, more than the reduction observed in untreated cells (Fig. 4F). This comparison also evidenced that small colonies were much more diverse in terms of fitness in the presence of temozolomide than in its absence. The presence of cell death amplified the range of GRs observed in the presence of temozolomide, which can be one of the processes responsible for this increase in variance upon treatment when compared with untreated colonies (Supplementary Fig. S6C and S6D). Notwithstanding, increase in colony size made treated colonies as similar to each other as were colonies in the untreated condition. This indicates that the processes activated by temozolomide (2, 12) fluctuate in cells during the formation of colonies and contribute to homogenize the response of larger colonies despite the great variance of the individual cells and small colonies.

As temozolomide activates chronic cellular processes that are different from the acute processes (2, 12), the CVP of GR3, (after temozolomide withdrawal), in relation to CS1 was also analyzed. The reduction in variance in GR3 occurred in larger colonies and was smaller when compared with GR2 or even to the untreated condition (Fig. 4G). While colonies with 4 (2^2) cells had a high variance both in GR2 and GR3, colonies with 16 cells (2^4) had a low variance in GR2 while still having a high variance in GR3. On the other hand, larger colonies presented low variance for both GR2 and GR3 (Fig. 4H), reinforcing that variance reduction occurs at lower colony sizes for GR2 in comparison with GR3.

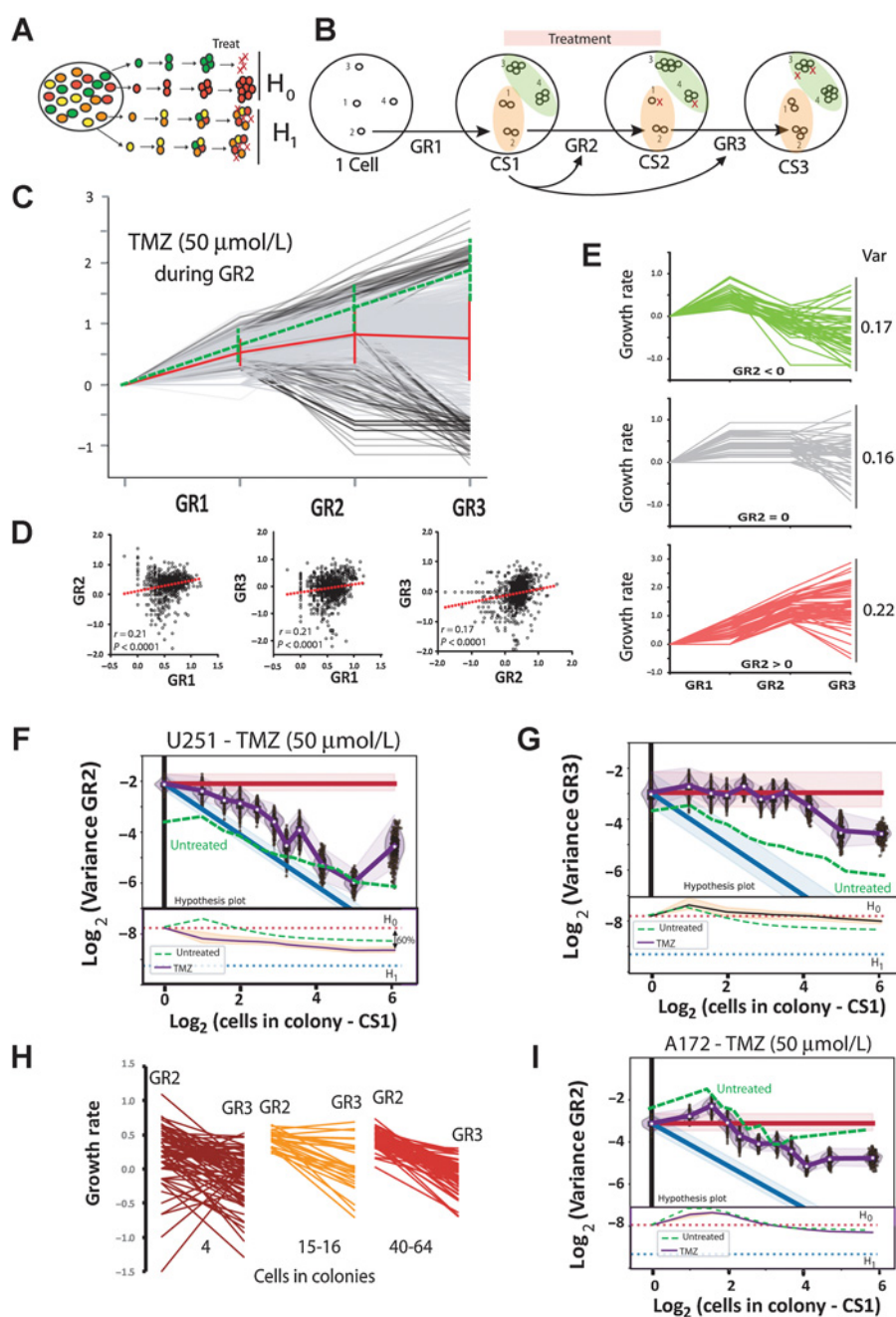
Variance is treatment specific, as the same cell line treated with cisplatin had a much lower reduction in variance when compared with treatment with temozolomide. Higher concentrations of cisplatin eventually lead to CVP without a reduction in variance (Supplementary Fig. S6E–S6G), indicating that extremely high toxicity decreased the variance reduction in colonies. A different glioma cell line (A172) also had a reduction in variance in the presence of temozolomide, but this was smaller when compared with the U251 cell line (Fig. 4I).

Dynamic in the response of cells to temozolomide

In previous reports from our group, we showed that temozolomide induces several effects on cells that can impact their survival, including DNA damage, apoptosis, autophagy, necrosis, cell-cycle arrest, and senescence (2, 12). Noteworthy is the large variability in autophagy and senescence induction in single cells after temozolomide (2). To determine the degree of variance in DNA damage and senescence induction among related cells (Fig. 5A), 53BP1trunc-Apple-transduced cells were treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide and cells in colonies were imaged after treatment. The number of foci observed in treated cells was higher (Fig. 5B, top) when compared with untreated cells (Fig. 3E), but did not vary with respect to colony size. However, the coefficient of variation of foci among cells from colonies of different size increased with the number of cells in the colony, both right after temozolomide (CS2) or 3 days after drug withdrawal (CS3; Fig. 5B, bottom). As the CVP measures dynamics in fitness but not fitness itself, no correlation was observed between the GRs and the reduction in variance for GR2 or GR3 (Supplementary Fig. S7A–S7D).

One important process activated by temozolomide is the induction of senescence (2, 12), that can be accompanied through the increase in nuclear area, which correlates with the β -galactosidase staining and p21 expression (20). A172 and U251 cells showed a gradual increase in nuclear size after treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide, which

Lenz et al.

**Figure 4.**

Dynamics of cell fitness in the presence of a cancer drug. **A**, Colonies may respond homogeneously (H_0) or heterogeneously (H_1) to treatment. **B**, Treatment scheme and indications of the analysis of variance of GR2 or GR3 in relation to CS1. **C**, GR of individual colonies treated during GR2 (red, average \pm SD for TMZ; green, untreated). **D**, Pairwise correlation between GR values in U251 glioma colonies (top) and GR of the individual colonies before (GR1), during (GR2), and after (GR3) the presence of 50 $\mu\text{mol/L}$ of TMZ. **E**, GR of colonies with a negative (upper), neutral (middle), or positive (bottom) GR2 and their variance in GR3. **F** and **G**, CVP of GR2 (**F**) and CVP of GR3 (**G**) in U251 glioma cells in relation to the number of cells in the colony at the beginning of treatment (CS1). Green, CVP of the same cell line without treatment. **H**, GR2 and GR3 of colonies with the indicated number of cells at the beginning of treatment. **I**, CVP of A172 glioma cells during temozolomide (TMZ; GR2) in relation to CS1 in comparison with the CVP of the same cell line without treatment (green).

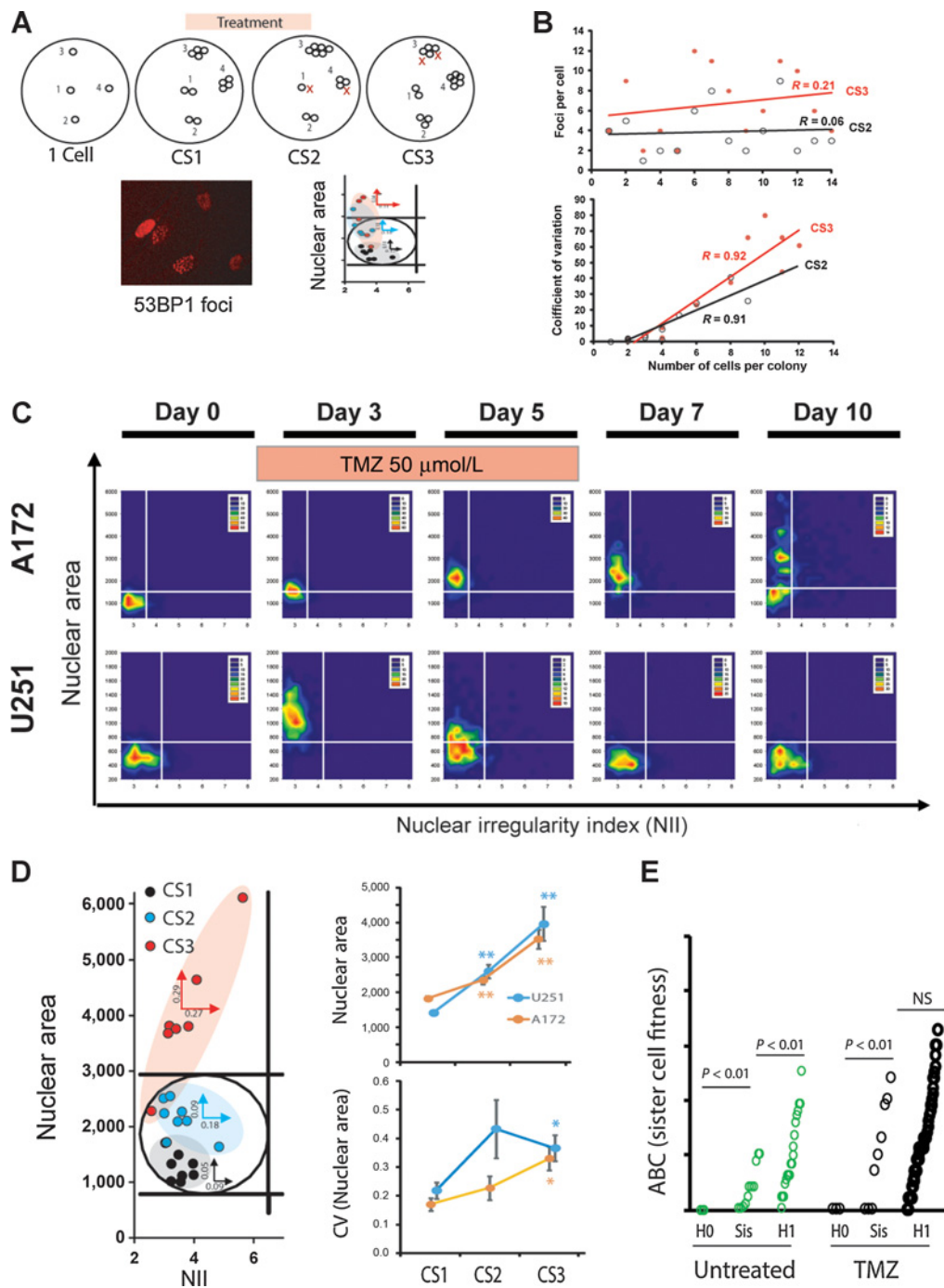
largely returned to normal after 10 days (Fig. 5C). This increase in nuclear size was also observed in colonies during and after the presence of temozolomide (Fig. 5D). Most interestingly, the larger the colony, the bigger was the heterogeneity in nuclear size of the cells in the colony after the presence of temozolomide, indicating that the heterogeneity in cell-cycle synchronization and DNA repair capacity, among other features, led to a heterogeneous senescence induction in colonies (Fig. 5D).

Ultimately, what matters in cancer cell response to therapy is whether cells survive in the presence of a drug. Sister cells were different from each other and they were not different from pair of cells randomly picked from the population regarding to the number of

cells alive (Fig. 5E), supporting the fast change in fitness observed in the DynaFit data.

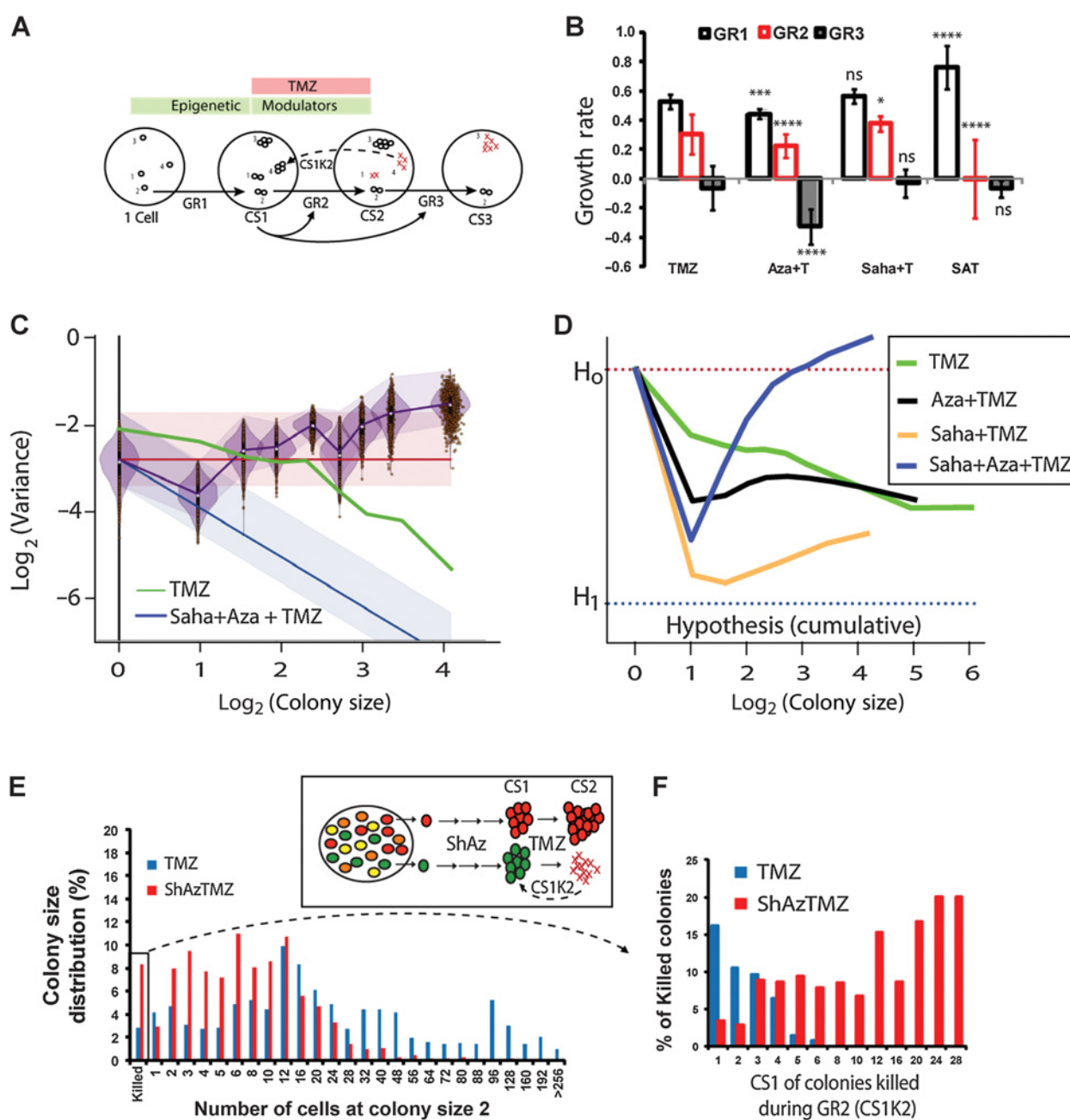
Impact of the dynamics of fitness for cancer biology and therapy

To alter the dynamics uncovered with DynaFit, we tested the impact of the presence of several epigenetic modulators during the formation of the colonies in the dynamic of fitness (Fig. 6A). The histone deacetylase (HDAC) inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (Saha) or the DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor 5-azacytidine (Aza) alone or in combination did not change the GR during the formation of colonies, but increased the toxicity of temozolomide, especially when

**Figure 5.**

Dynamic in cell processes activated by temozolomide. **A**, Heterogeneity in DNA damage and senescence induction was accessed through 53BP1 foci and nuclear area. **B**, Average (top) and coefficient of variation (bottom) in DNA damage of individual cells from colonies at CS2 and CS3 expressed by the number of 53BP1 foci per nuclei. **C**, Dynamic of senescence induction indicated by the increase in nuclear area in glioma cells lines treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ of temozolomide (TMZ) from day 0 to 5 and then maintained in drug-free media. **D**, Left, nuclear area and nuclear irregularity index (NII) of cells from an individual colony of U251 cell prior (CS1), immediately after (CS2), and 3 days after 50 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide (CS3). Numbers indicate the coefficient of variation (CV) of nuclear area and NII. Right, average nuclear area (top) and average CV of nuclear area from cells from colonies at CS1, CS2, and CS3. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ with Student t test. **E**, ABC of the fitness of A172 sister cells treated with 6 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide in comparison with equal (H_0) and unrelated cells (H_1). NS, not significant.

Lenz et al.

**Figure 6.**

Dynamic in cell fitness can be modulated and impact fractional killings. **A**, Treatment schedule and analysis performed. **B**, GR prior, during, and after temozolomide (TMZ; 50 $\mu\text{mol/L}$) addition in the absence or presence of Aza (3 $\mu\text{mol/L}$) and/or Saha (0.5 $\mu\text{mol/L}$). Significance in relation to temozolomide alone: One-way ANOVA with Sidak multiple comparison test. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; ns, not significant. **C** and **D**, CVP of colonies pretreated with Saha + Aza during the formation of the colonies and then treated with temozolomide, compared with temozolomide alone (**C**) and cumulative hypothesis plot of U251 cells (**D**) treated as in with Aza, Saha, or its combination prior to temozolomide. **E**, Distribution of the number of cells in CS 2 when colonies were formed in the presence or not of Saha and Aza and then treated with temozolomide (inset). **F**, CS1 of the colonies completely eliminated during GR2 (CS1K2).

added together (**Fig. 6B**). Colonies formed in the presence of Saha plus Aza responded to temozolomide with a variance that was similar to the variance of individual cells (**Fig. 6C**), indicating that the amplitude of fitness observed in single cells was maintained in colonies up to 20 cells. This was not observed for the single treatment of Aza or Saha (**Fig. 6D**).

Colonies treated only with temozolomide ranged from zero to more than 256 cells, while the largest colony in the ShAz (Saha + Aza) temozolomide group had 56 cells (**Fig. 6E**). Most importantly, the number of cells in the colonies totally killed by temozolomide was 6 cells, whereas in the ShAz temozolomide group, up to 20% of colonies as large as 28 cells were completely eliminated (**Fig. 6F**). This indicates

that epigenetic modulators can alter the dynamics in fitness and reduce fractional killings in response to temozolomide, which means that the temozolomide-sensitive phenotype was copied to all cells in a colony for about five generations.

Discussion

Recent techniques that allow the live tracking of signaling pathways and complex cell processes have revealed the magnitude of single-cell dynamics in almost all processes amenable to live cell tracking. Notwithstanding, populational stability is obtained largely by the average behavior of billions of cells in tissues. If the behavior of the whole tissue is the focus, then measuring the average behavior of cells is acceptable or even desirable. However, when the behavior of single cells is key, as is the case in cancer, then the dynamics of individual cells must be considered, especially in resistance to therapy.

Signaling pathways are intrinsically dynamic due to the half-life in the order of seconds to a few minutes for the posttranslational modifications that control signaling components, such as phosphorylation (25), and of hours for the protein turnover (26). We showed that sister cells are more similar than unrelated cells when considering ERK activity. This similarity, however, is lost after a second division, as cells in colonies of 4 are as different regarding ERK activity as are unrelated cells, in line with the dynamics observed in single cells of signaling pathways such as ERK, Akt, NF κ B, and p53 (3, 16).

The most important aspect of cancer cell therapy is its fitness, given by the number of cells that remain alive after treatment. Therefore, focusing on cell fitness and their dynamics is a central point of the present work. Sister cells have distinct fitness but are still more similar to each other than unrelated cells, as fundamental processes for fitness, such as cell-cycle duration, require between 3 to 4 generations to reach half the maximum variation. Others have shown that the cell-cycle duration is poorly copied from mother to daughter cells (27), but sister cells have some correlation between themselves, which may be explained by the fact that the decision of the duration of G_1 is taken before division and is thus similar in sister cells. However, the level of the proteins responsible for the next decision point changes independently in the sister cells to produce different decisions for the cousin cells (27, 28). Analysis of the expression of a few genes in live cells indicated that sister cells are more similar than nonrelated cells in the levels and dynamics of expression of these genes. Notwithstanding, during the progression of the cell cycle, sister cells gradually lose their similarity depending on the analyzed gene, indicating some gene-specific transcriptional memory with distinct dynamics (29).

Transcriptome and epigenome analysis of colonies with 10 to 16 generations indicated that cells have multigenerational fluctuations in the mRNA levels of most genes, and these fluctuations have a nongenetical origin. A minority of genes have a heritable expression, but these genes are different among cell lines (10). An analysis of the methylation status pointed to the existence of genes with dynamic and others with static methylation, indicating that the control of the DNA methylation machinery can impact the stability of transcription of some, but not all genes (9). Several genes were described that can individually have a large impact on cell fitness (30) and thus the dynamic expression of one or a few genes may suffice to produce variation in the fitness of cells in colonies and thus contribute to fractional killings. In line with these findings, the inhibition of DNMTs and HDACs stabilized the dynamics in fitness for up to five generations, allowing the copy of the temozolomide-sensitive phenotype to all cells in the colony and reducing fractional killing, generally thought

as a process that contributes to cancer drug resistance (31). The combination of Saha and Aza was shown to reduce pancreatic tumor growth in model animals (32); however, the contribution of direct toxicity, alteration in dynamics of fitness and fractional killings is still unknown. It is unlikely however, that DNA methylation and histone acetylation are the only mechanisms affecting the dynamics in fitness, as the integration of internal mechanisms with signals from the tumor microenvironment may produce complex interactions, as has been shown for the dynamics in TNF and the oscillation of NF κ B and the ultimate biological outcome (33).

The most reliable measurement of fitness is the direct counting of the number of descendants of a cell after a time frame that exceeds the duration of one cell cycle. Most importantly, a cell whose fitness is below the survival threshold is killed and therefore no further information can be obtained from this cell or their (nonexisting) descendants. To overcome these constraints, we proposed the DynaFit method that uses the variance of single cells and colonies of different sizes to determine whether this characteristic is copied to all cells homogeneously or heterogeneously. Although the experimental design is based on the classical Luria-Delbrück assay (34), DynaFit has a different statistical rationale and considers that changes are reversible. It is important to bear in mind that DynaFit is based on variance and is therefore particularly sensitive to measurement errors, as a single outlier produces a large increase in variance. To reduce this risk, a filter was added to the bootstrapping app to exclude outliers (35). Careful revision of microscopy images and cell count results is highly recommended. Furthermore, because DynaFit is a statistical method at its core, small sample sizes for CS groups may lead to unreliable results. Notwithstanding, a method for evaluating fitness dynamics in colonies across different conditions, especially in response to drugs, is of great value for cell and cancer biology, and may contribute to better understand the several nongenetic resistance mechanisms proposed in recent years (36).

Applying DynaFit to different cell types showed a reduction of the maximal variance of GR of colonies in around three generations, that is, colonies of 8 cells. This reduction in variance occupied between 19% to 46% of the area formed by the H_0 line and the H_1 line. The observation that untreated normal cells have a behavior similar to cancer cells is an indication that fitness dynamics is a characteristic of cells in general rather than a feature selected by the cancer cells analyzed here, in line with the high dynamics observed in several cellular processes in normal eukaryotic and prokaryotic cells (3, 28, 37). As with several other features, normal tissues, despite formed by dynamic cells, average out these features to produce a population with a stable behavior.

In the presence of clinically relevant concentrations of temozolomide, colonies of glioma cells reduced its GR variation as the colony size increased, and this reduction in variance was lower after drug removal. This indicates that the capacity of surviving in the presence of temozolomide is highly dynamic, but also that the processes activated in the surviving cell and that are responsible for the long-term response to temozolomide are less dynamic. Remarkably, cell dynamics are cell type and treatment specific, indicating that they are governed by the characteristics of the cells and impacted by the different mechanisms induced by diverse treatments.

Among the cell phenotypes activated by temozolomide, DNA damage response and nuclear area increase, a proxy for senescence induction, were different among the cells in colonies, in line with the large heterogeneity in senescence induction by cytotoxic drugs observed in several cancer cell types (38). This finding adds to the fractional killing concept that cells respond differently to

Lenz et al.

chemotherapeutic drugs by indicating that different responses in terms of DNA damage and senescence induction can occur even in closely related cells.

It is difficult to assess how much of the resistance to therapy is due to stable genetic alterations that activate diverse mechanisms of resistance or due to dynamic tolerance mechanisms (39). However, changing the paradigm of the nature of cancer cell tolerance to therapy from static to dynamic will be key in understanding cancer cell tolerance and resistance and to design better drug combinations and treatment schedules (40) to reduce or even eliminate the probability of survival of outlier cells and lead to resistance.

Authors' Disclosures

J.L. Faccioni reports grants from CNPq during the conduct of the study and grants from CNPq outside the submitted work. J.A.F. Santos reports grants from CAPES during the conduct of the study and grants from CAPES outside the submitted work; in addition, J.A.F. Santos has a patent for COMPOSTOS FARMACÊUTICOS ANÁLOGOS DA PIPERINA PARA TRATAMENTO DO CÂNCER pending to INPI - Brazil. J.H. Buss reports grants from CNPq during the conduct of the study and grants from CNPq outside the submitted work; in addition, J.H. Buss has a patent for UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE PIRAZÓIS COMO AGENTES ANTITUMORAIS PARA CÂNCER DE MAMA pending. M.T. Tamborindeguy reports grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES during the conduct of the study. T. Monteiro reports grants from CNPq during the conduct of the study and grants from CNPq outside the submitted work. C.N. Santo reports grants from CAPES during the conduct of the study. J.C. Marcolin reports grants from CNPq during the conduct of the study and grants from CNPq outside the submitted work. S.M. Callegari-Jacques reports submission, with colleagues, a patent about measuring and analyzing nuclear morphology, as described in ref. 20 of the manuscript, to the pertinent Brazilian agency. A.O. Silva reports grants from CAPES and grants from CNPq during the conduct of the study, grants from CAPES, and personal fees from Faculdade Estácio do Rio Grande do Sul outside the submitted work. G.R. Onzi reports grants from CAPES/FAPERGS during the conduct of the study and grants from CAPES/FAPERGS outside the submitted work; in addition, G.R. Onzi has a patent for COMPOSTOS, USO DE COMPOSTOS NA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO 7,11B-DIHYDRO-6H-INDENO[2,1-C]CHROMENE-3,6A,9,10-TETROL, SEUS DERIVADOS OU ANÁLOGOS, NEUTROS OU IONIZADOS, PARA PREVENÇÃO E/OU TERAPIA SENOLÍTICA pending to INPI - Brazil. K.R. Begnini reports grants from CAPES during the conduct of the study and grants from CAPES outside the submitted work; in addition, K.R. Begnini has a patent for Utilização de *Mycobacterium bovis* BCG auxotrófico superexpressando AG85B como agente terapêutico e/ou imunoterapêutico para câncer de bexiga pending to INPI - Brazil, a patent for Sequência de DNA sintético e produção de proteína p53 humana recombinante em cepa auxotrófica de *Mycobacterium bovis* BCG para tratamento de câncer de bexiga pending to INPI - Brazil, a patent for AGENTES ANTITUMORAIS A BASE DE CHALCONAS PARA TERAPÊUTICA DOS CÂNCERES DE MAMA, BEXIGA E DO TRATO URINÁRIO pending to INPI - Brazil, a patent for UTILIZAÇÃO DE 7-CLOROQUINOLINO-1,2,3-TRIAZOIL CARBOXAMIDAS COMO AGENTES TERAPÊUTICOS ANTITUMORAIS pending to INPI - Brazil, a patent for UTILIZAÇÃO DE BCG PASTEUR RECOMBINANTE EXPRESSANDO A PROTEÍNA FOSFOLIPASE D DE CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS COMO AGENTE TERAPÊUTICO E IMUNOTERAPÊUTICO PARA CÂNCER DE BEXIGA pending to INPI - Brazil, a patent for BCG PASTEUR RECOMBINANTE EXPRESSANDO A

PROTEÍNA CP40 DE CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS PARA TERAPÊUTICA E IMUNOTERAPÊUTICA DO CÂNCER DE BEXIGA pending to INPI - Brazil, and a patent for UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE PIRAZÓIS COMO AGENTES ANTITUMORAIS PARA CÂNCER DE MAMA pending to INPI - Brazil. G. Lenz reports grants from FAPERGS, grants from CNPq, grants from CAPES, and grants from ICGEB during the conduct of the study; grants from FAPERGS, CNPq, and grants from CAPES outside the submitted work; in addition, G. Lenz has a patent for Método de análise e mensuração morfológica nuclear e uso do método de análise e mensuração morfológica nuclear pending to INPI - Brazil, a patent for COMPOSTOS, USO DE COMPOSTOS NA PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO 7,11B-DIHYDRO-6H-INDENO[2,1-C]CHROMENE-3,6A,9,10-TETROL, SEUS DERIVADOS OU ANÁLOGOS, NEUTROS OU IONIZADOS, PARA PREVENÇÃO E/OU TERAPIA SENOLÍTICA pending to INPI - Brazil, and a patent for USO DE COMPOSTO DERIVADO DE PIRIMIDOBENZIMIDAZOL pending to INPI - Brazil. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

L.S. Lenz: Data curation, formal analysis, investigation. **J.L. Faccioni:** Data curation, formal analysis, validation. **P.A. Bracco:** Data curation, formal analysis. **J.A.F. Santos:** Data curation, formal analysis, investigation. **L.C. Pereira:** Formal analysis, investigation. **J.H. Buss:** Data curation, validation, investigation. **M.T. Tamborindeguy:** Data curation, formal analysis, investigation. **D. Torgo:** Investigation. **T. Monteiro:** Investigation. **G.B. Mantovani:** Investigation. **C.N. Santo:** Investigation. **J.C. Marcolin:** Investigation. **E. Dalsin:** Formal analysis, investigation. **A. Vigo:** Data curation, formal analysis. **S.M. Callegari-Jacques:** Data curation, formal analysis. **A.O. Silva:** Data curation, formal analysis, investigation. **G.R. Onzi:** Data curation, formal analysis, investigation. **K.R. Begnini:** Data curation, formal analysis, supervision, investigation. **G. Lenz:** Conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, writing-original draft, project administration, writing-review and editing.

Acknowledgments

We wish to thank Fatima Guma, Dinara Moura, Jenifer Saffi, Ana M. Morás, and Marcelo Lamers for helping with reagents and equipment and Alexandre Bruni-Cardoso (USP) for critical reading of the manuscript. The Apple-53BP1trunc was a gift from Ralph Weissleder (Addgene plasmid #69531) and pLentiPGK Puro DEST ERK-KTR-Clover was a gift from Markus Covert (Addgene plasmid #90227) and pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro was a gift from Kevin Brindel and Duncan Jodrell (Addgene Plasmid #86849). We wish to thank Dr. Galit Lahav (Harvard University, Boston, MA) for the plasmid for tagging Ki67. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS (PqG 17/2551-0001, Pronex 16/2551-0000473-0, FAPERGS-FAPESP, 2019/15477-3), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, Universal (475882/2012-1); ICGEB (405231/2015-6); PROBITEC CAPES (907/2012). L.S. Lenz, J.H. Buss, E. Dalsin, J.L. Faccioni, D. Torgo, G.R. Onzi, A. Vigo, and G. Lenz received CNPq fellowships, J.A.F. Santos, M.T. Tamborindeguy, K.R. Begnini received CAPES fellowships and L.C. Pereira and T. Monteiro received FAPERGS fellowships.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received July 23, 2020; revised September 22, 2020; accepted December 18, 2020; published first December 22, 2020.

References

1. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 2011;472:90-4.
2. Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thome MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 2015;11:1099-113.
3. Paek AL, Liu JC, Loewer A, Forrester WC, Lahav G. Cell-to-cell variation in p53 dynamics leads to fractional killing. *Cell* 2016;165:631-42.
4. Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, et al. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* 2011;146:633-44.
5. Katajisto P, Döhla J, Chaffer CL, Pentimikko N, Marjanovic N, Iqbal S, et al. Stem cells. asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* 2015;348:340-3.

6. Dey-Guha I, Alves CP, Yeh AC, Sole X, Darp R, et al. A mechanism for asymmetric cell division resulting in proliferative asynchronicity. *Mol Cancer Res* 2015;13:223–30.
7. Loeffler D, Wehling A, Schneider F, Zhang Y, Müller-Böttcher N, Hoppe PS, et al. Asymmetric lysosome inheritance predicts activation of haematopoietic stem cells. *Nature* 2019;573:426–9.
8. Lane K, Van Valen D, DeFelice MM, Macklin DN, Kudo T, Jaimovich A, et al. Measuring signaling and RNA-seq in the same cell links gene expression to dynamic patterns of NF- κ B Activation. *Cell Syst* 2017;4:458–469.
9. Meir Z, Mukamel Z, Chomsky E, Lifshitz A, Tanay A. Single-cell analysis of clonal maintenance of transcriptional and epigenetic states in cancer cells. *Nat Genet* 2020;52:709–18.
10. Shaffer SM, Emert BL, Reyes Hueros RA, Cote C, Harmange G, Schaff DL, et al. Memory sequencing reveals heritable single-cell gene expression programs associated with distinct cellular behaviors. *Cell*. 2020;182:947–959.
11. Pisco AO, Brock A, Zhou J, Moor A, Mojtahedi M, Jackson D, et al. Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. *Nat Commun* 2013;4:2467.
12. Silva AO, Dalsin E, Onzi GR, Filippi-Chiela EC, Lenz G. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 2016;348:177–83.
13. Kipper FC, Silva AO, Marc AL, Confortin G, Junqueira AV, Neto EP, et al. Vinblastine and antihelminthic mebendazole potentiate temozolomide in resistant gliomas. *Invest New Drugs* 2018;36:323–31.
14. Matte BF, Kumar A, Placone JK, Zanella VG, Martins MD, Engler AJ, et al. Matrix stiffness mechanically conditions EMT and migratory behavior of oral squamous cell carcinoma. *J Cell Sci* 2019;132:132–42.
15. Stasinopoulos MD. Flexible regression and smoothing: using GAMLSS in R. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC; 2017.
16. Regot S, Hughey JJ, Bajar BT, Carrasco S, Covert MW. High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell* 2014;157:1724–34.
17. Yang KS, Kohler RH, Landon M, Giedt R, Weissleder R. Single cell resolution *in vivo* imaging of DNA damage following PARP inhibition. *Sci Rep* 2015;5:10129.
18. Tamajusuku AS, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battasstini AM, Wink MR, et al. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *J Cell Biochem* 2010;109:983–91.
19. Stewart-Ornstein J, Lahav G. Dynamics of CDKN1A in single cells defined by an endogenous fluorescent tagging toolkit. *Cell Rep* 2016;14:1800–11.
20. Filippi-Chiela EC, Oliveira MM, Jurkovski B, Callegari-Jacques SM, da Silva VD, Lenz G. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* 2012;7:e42522.
21. Johnson KE, Howard G, Mo W, Strasser MK, Lima EABF, Huang S, et al. Cancer cell population growth kinetics at low densities deviate from the exponential growth model and suggest an Allee effect. *PLoS Biol* 2019;17:e3000399.
22. Lewontin RC, Cohen D. On population growth in a randomly varying environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:1056–60.
23. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 2008;132:487–98.
24. Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, et al. Ki67 is a Graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Rep* 2018;24:1105–1112.
25. Kleiman LB, Maiwald T, Conzelmann H, Lauffenburger DA, Sorger PK. Rapid phospho-turnover by receptor tyrosine kinases impacts downstream signaling and drug binding. *Mol Cell* 2011;43:723–37.
26. Greig MJ, Niessen S, Weinrich SL, Feng JL, Shi M, Johnson TO. Effects of activating mutations on EGFR cellular protein turnover and amino acid recycling determined using SILAC mass spectrometry. *Int J Cell Biol* 2015;2015:798936.
27. Sandler O, Mizrahi SP, Weiss N, Agam O, Simon I, Balaban NQ. Lineage correlations of single cell division time as a probe of cell-cycle dynamics. *Nature* 2015;519:468–71.
28. Spencer SL, Cappell SD, Tsai F-C, Overton KW, Wang CL, Meyer T. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell* 2013;155:369–83.
29. Phillips NE, Mandic A, Omid S, Naef F, Suter DM. Memory and relatedness of transcriptional activity in mammalian cell lineages. *Nat Commun* 2019;10:1208.
30. Madan E, Pelham CJ, Nagane M, Parker TM, Canas-Marques R, Fazio K, et al. Flower isoforms promote competitive growth in cancer. *Nature* 2019;572:260–4.
31. Ballweg R, Paek AL, Zhang T. A dynamical framework for complex fractional killing. *Sci Rep* 2017;7:8002.
32. Susanto JM, Colvin EK, Pinese M, Chang DK, Pajic M, Mawson A, et al. The epigenetic agents suberoylanilide hydroxamic acid and 5-AZA-2' deoxycytidine decrease cell proliferation, induce cell death and delay the growth of MiaPaCa2 pancreatic cancer cells *in vivo*. *Int J Oncol* 2015;46:2223–30.
33. Kellogg RA, Tay S. Noise facilitates transcriptional control under dynamic inputs. *Cell* 2015;160:381–92.
34. Luria SE, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 1943;28:491–511.
35. Onzi GR, Faccioni JL, Alvarado AG, Bracco PA, Kornblum HI, Lenz G. SCOUT: Single-cell outlier analysis in cancer. *bioRxiv* 2020. DOI: 10.1101/2020.03.25.007518.
36. Bell CC, Gilan O. Principles and mechanisms of non-genetic resistance in cancer. *Br J Cancer* 2020;122:465–72.
37. Govers SK, Adam A, Blockeel H, Aertsen A. Rapid phenotypic individualization of bacterial sister cells. *Sci Rep* 2017;7:1–9.
38. Hsu C-H, Altschuler SJ, Wu LF. Patterns of early p21 dynamics determine proliferation-senescence cell fate after Chemotherapy *Cell* 2019;178:361–373.
39. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 2010;141:69–80.
40. Gatenby RA, Brown JS. Integrating evolutionary dynamics into cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17:675–86.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Cancer Cell Fitness Is Dynamic

Luana S. Lenz, Juliano L. Faccioni, Paula A. Bracco, et al.

Cancer Res 2021;81:1040-1051. Published OnlineFirst December 22, 2020.

Updated version Access the most recent version of this article at:
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-20-2488](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488)

Supplementary Material Access the most recent supplemental material at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2020/12/22/0008-5472.CAN-20-2488.DC1>

Cited articles This article cites 38 articles, 4 of which you can access for free at:
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/81/4/1040.full#ref-list-1>

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/81/4/1040>.
Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Supplementary Material and Methods

Cancer cell fitness is dynamic

by Lenz, Faccioni, Bracco and Santos et al

1. Detailed description of experimental procedures:

a. Live ERK activity

Live-cell measurement of ERK activity was performed using A172 glioma cells stably expressing ERK-KTR fluorescent reporter (1,2) and the nuclear marker Apple-53BP1trunc (3) via lentiviral transduction (4). For live imaging of sister cells, 300 cells were plated on wells of a 96-well plate and imaged every 30 minutes for 24 hours using an InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare). Mitotic events were identified and sister cells were manually tracked for at least 10 hours after mitosis. For the analysis of colonies of 4 cells, cells were seeded at low density on 6-well plates and allowed to grow until 4 cells colonies were formed. The colonies were imaged in a Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope equipped with an AxioCam MRc camera (Carl Zeiss). Image analysis and fluorescence quantification were determined using ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). For each cell, the 53BP1 fluorescence channel was used for nuclear segmentation, and the cytoplasmic ring was determined by increasing the nuclear area in 5 pixels. The ERK signaling activity was quantified through the relative cytoplasmic to nuclear fluorescence (C/N) ratio (1). For sister cell analysis, the activity difference between sister cells 10 hours after mitosis was considered. For colonies, the difference in C/N ratio between all 4 cells was considered and for H_1 , unrelated cells were randomly grouped.

b. DNA damage

U251 cells transduced with lentivirus containing the Apple-53BP1-trunc sequence (Addgene plasmid #69531)(3) were plated at a density of 20 cells per well in a 96-well plate. The images were collected using an InCell Analyzer 2200 (GE Healthcare) at the moment of drug addition, after 3 days in the presence of the drug and 3 days after drug withdrawal. Number of foci for each cell in colonies were manually counted.

c. Cell Cycle Synchronization Assay

Cells were transduced with FastFUCCI (Addgene #86849) (5). After puromycin selection, 300 cells per well of a 6 well plate were plated and grown. The colonies originated from these cells were imaged with SpectraMax i3x (Molecular Devices), and the percentage of green cells in each colony was manually determined.

To estimate the desynchronization among cells in a colony, we compared the distribution of the percentage of green cells in colonies with the distributions generated by a cell cycle simulation written in Python. The simulation works by initializing a colony with a given number of cells, and instructing cells to “walk” a full cycle around the cell cycle (Supplementary Fig. S3a). Cells in the simulation become green in a certain portion of the cell cycle, which mimicks the emission of green fluorescence by cells transduced

with FastFUCCI during G2. By counting the number of green cells at each time step of the simulation, an average frequency distribution of green cells in each colony was obtained. The simulation supports initialization of multiple colonies (Supplementary Fig. S3b), and the addition of a “phase shift” component to each cell in each colony, so that cells in the same colony become increasingly out of synchrony with each other after they walk around the cell cycle (Supplementary Fig. S3c). Simulation parameters include the number of colonies to initialize, the number of cells in each colony, the simulation time step, the phase shift, and duration of the cell cycle (Supplementary Fig. S3d). The initial position of each colony when the simulation starts is random. The code for the simulation can be made available upon request.

In order to generate the green cell distribution in Fig. 1f, the average cell cycle duration of 36 hours for A172 cell line was used. The percentage of green cells for each simulation time step was binned in bins corresponding to $=0\%$, $\leq 25\%$, $\leq 50\%$, $\leq 75\%$ and $\leq 100\%$ green cells. For every cell cycle, cells in each colony were incrementally desynchronized using a phase shift, generating distributions for each phase shift value. The experimental distribution that best matched the simulated distribution was used to infer the distance between the leading and lagging cell of a colony with a given size.

To tag the endogenous locus of Ki67, the plasmids coding Cas9 and gRNA for Ki67 near to stop codon (kindly provided by Dr. Galit Lahav) (6) were co-transfected with the donor DNA segment containing the YFP, a P2A cleavage tag and the antibiotic resistant gene flanked by homology arms of ~ 500 bps generated through four PCR reactions (Supplementary Fig. S4) and assembled through Gibson Assembly Cloning (New England Biolabs). The sequence was amplified by PCR, purified and transfected with Lipofectamine 3000. Two days after transfection, the medium was changed and puromycin ($2 \mu\text{g/ml}$) was added for 48h to select the cells that received the Cas9 plasmid. Surviving cells were kept in medium containing geneticin $400 \mu\text{g/ml}$ for additional two weeks and then cloned. Insertion validation was performed by fluorescence analysis during FBS deprivation. The cell cycle distance was estimated through imaging colonies with different sizes and quantifying the fluorescent intensity of all cells in the colony. The difference between the cell with the highest and lowest fluorescence intensity of each colony was divided by the mean fluorescence of the colony. Data originated from colonies with the same size were grouped and the average of these colonies was used.

To assess the cell cycle duration in single cells (time from birth to division), A172 cells were plated at low density and imaged every two minutes by Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope equipped with an Axiocam MRc camera (Carl Zeiss). The difference in the CC duration (plotted on the y-axis in \log_2 scale) was obtained for sister and cousin cells and then compared to H_0 (cells with the same cell cycle duration) and H_1 (unrelated cells).

Dynamic and static growth rate simulations

The growth rate simulations demonstrated in Fig. 1j were based on the concept of populations with dynamic growth rates, as originally conceptualized by Lewontin and Cohen (7). The simulation consists of two steps: a dynamic simulation, where growth rates are randomly chosen from a gaussian growth rate distribution, and its corresponding static simulation, where a single, average growth rate is continuously applied.

The dynamic simulation starts with a population of a given size (N_0), and is ended once a certain number of generations (g) have passed. On each generation (g_i), a growth rate (r_i) is randomly sampled from a gaussian distribution of growth rates, whose mean and standard deviation are fixed and known. For the simulations shown in Fig. 1j, we estimated the mean and standard deviation from our experimental data of primary glioblastoma (L12 cells) (Fig. 1i). For each generation, the new population size (N_{i+1}) is calculated from the current population size (N_i) using the equation:

$$N_{i+1} = N_i + N_i * r_i$$

The growth rate r_i and population size N_i at each generation g_i are stored and the average growth rate (r_m) is obtained at the end of the run.

A subsequent static simulation is then executed, where the previously obtained average growth rate r_m is continuously applied to the same initial population N_0 for the same number of generations g , while keeping track of the population size N_i at each generation g_i . The population growth on each paired dynamic/static simulations is then compared.

As shown in Fig. 1j, the static growth rate simulations always generates larger final populations than its dynamic counterparts, and the gap between final number of cells in the static/dynamic simulations increases with the standard deviation of the gaussian growth rate distribution. The simulation code is made available upon request.

2. Additional Information about DynaFit:

a. DynaFit implementations

We implemented DynaFit (Dynamic Fitness Analysis), a new methodology to analyze cell fitness dynamics based on the principles discussed in the main article (Supplementary Fig. S1).

As a key feature of this method is the determination of the variance in growth rate of colonies, two different analytical strategies were employed to achieve this goal. In the first strategy, the variance of GR is calculated and its confidence interval estimated in each initial colony size (CS) group using a bootstrap method of resampling. The algorithm was implemented in Python, and is available as a desktop app (Supplementary Fig. S2a-c).

The second strategy tests and selects the best predictive model that estimates GR variance. The corresponding algorithm was implemented in R, and is available online as an R Shiny web app (Supplementary Fig. S2a, S2d-e). Both implementations use experimental data to generate a Colony Variance Plot (CVP) of GR variance (Y axis) versus CS groups (X axis; Supplementary Fig. S2b, S2d). Additionally, both implementations measure the relative distance between the \log_2 (variance of GR) line and the H_0 and H_1 scenarios. This metric is displayed to the user through a Hypothesis Plot HP (Supplementary Fig. S2c, S2e, right panel). The HP plot synthesizes the fitness dynamics in the experimental data: a small distance to H_0 across all evaluated colony sizes indicates colony fitness preservation, as the colonies remain roughly with the same GR variance as they grow in size. On the other hand, a steady increase in the distance to H_0 (and a consequent decrease in the distance to H_1) indicates that colonies are approaching a more dynamic scenario, i.e, the average fitness of the colonies are becoming more similar.

b. DynaFit bootstrapping implementation (desktop app) details

The DynaFit desktop app, written in Python and available here (<http://www.ufrgs.br/labsinal/dynafit/index.html>), bootstraps each CS group in order to estimate a confidence interval for the GR variance of that group. The bootstrapping is performed by resampling (with substitution) the GR of cells in a given CS group, and calculating the GR variance in the resample. This resample variance estimates the true GR variance in the original sample. The procedure is performed multiple times, producing a distribution of GR variances.

For each resampling, the standard error (SE) for the GR variance is given by (8)

$$\sigma_{S^2} = \sigma^2 \sqrt{\frac{2}{n-1}},$$

where σ^2 is the variance of the CS group where the resampling is being performed, and n is the number of cells in the CS group. By measuring the SE for every resampling, a distribution of SEs for the GR variance is obtained. This distribution is used to estimate the confidence interval of the GR variance of the actual CS group, by simply taking the $(\alpha/2)$ nth and $(1 - \alpha/2)$ nth quantiles of the SE distribution as the boundaries of the confidence interval.

Users are able to select the number of resamplings to perform in the user interface. Note that while increasing the number of resamples allows for a better representation of the distribution of GR variances, a large number of bootstrap repeats will not narrow the confidence interval, or produce a “better” estimation, as with any bootstrap procedure it cannot produce new data or estimate values that are not present in the original sample. As such, it is crucial that a minimal number of colonies of each CS are present in the experimental dataset (we empirically determined this minimal number to be 20 colonies). The app warns users when an insufficient number of colonies are present for a given CS. An option to pool colonies of unequal but similar CS is also available, which helps to increase the group sizes while minimizing biases of grouping colonies with very different CS.

For the Hypothesis Plots, the endpoint fitness for a given CS is obtained by calculating the vertical distance of the estimated GR variance to H_0 and H_1 lines, normalized by the distance between the H_0 and H_1 lines themselves. The cumulative fitness for a given CS is obtained by integrating the area between the data curve and normalizing it by the total area between H_0 and H_1 lines up to that CS. This is implemented as a simple trapezoidal integration. Areas are signed, so that areas above H_0 are treated as negative.

c. DynaFit predictive modeling implementation (web app) details

The Dynafit web app, written in R, fits the experimental data into a generalized additive model for location, scale, and shape (**GAMLSS**). GAMLSS is a more flexible general framework for performing regression analysis where the distribution of the response variable is not restricted to the exponential family. In addition, it allows modeling not only the mean μ (parameter of location) of the response variable but also other parameters, such as the standard deviation σ (scale) (9,10).

Considering that the response variable Y (colony growth rate) belongs to a family of probability distribution D and that x is the explanation variable (colony initial size) we are interested in modeling the relationship of both parameter (μ and σ) of Y with x . In this context, the GAMLSS model specifies that:

$$Y \stackrel{ind}{\sim} D(\mu, \sigma)$$

$$\eta_1 = g_1(\mu) = \beta_1 x + sf_1(x)$$

$$\eta_2 = g_2(\sigma) = \beta_2 x + sf_2(x)$$

The link functions $g_1 \wedge g_2$, relate the parameters of the outcome distribution with the explanatory variables, allowing both linear or non-linear relationships through smoothing functions $sf_1 \wedge sf_2$.

In our app, we used cubic splines as the smooth functions to describe the relationship for both μ and σ of the outcome with the exposure. The best GAMLSS model is selected based on Akaike’s information criterion (AIC) among the seven possible distribution families available on the gamlss R package: Johnson’s SU repair (JSU), Normal (NO), Generalized t (GT), Skew t type 3 repair (SST), Gumbel (GU), Logistic (LO) and t Family (TF). The Worm-Plot of the residuals should be used to evaluate the goodness of fit of the final model, a model that fits the data well will present the residuals close to the horizontal central red line. The predicted growth rate variance for each initial colony size is then extracted from the final model for graphical analysis.

3. Mathematical demonstrations:

Variance of growth rate decreases as sample size n increase

It is known that cell colony growth rate can be described by a normal distribution. Let's say that in a cell population the growth rate Y follows a normal distribution with mean μ and variance $\sigma^2 > 0$. Consider Y_1, Y_2, \dots, Y_n a simple random sample of this population, where n represents the initial colony size (CS). The sample mean and variance

$$\bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n Y_j$$

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (Y_j - \bar{Y})^2.$$

are unbiased and consistent estimators for μ and σ^2 , respectively. The random variable $(n-1) \frac{S^2}{\sigma^2}$ has a chi-square distribution with $n-1$ degrees of freedom, therefore its mean is equal to $n-1$ and its variance is $2(n-1)$ (11,12). Thus, using variance properties, the variance of S^2 is equal to $\frac{2\sigma^4}{n-1}$, as shown below:

$$\begin{aligned} \text{Var}(n-1) \frac{S^2}{\sigma^2} &= 2(n-1) \\ \frac{(n-1)^2}{\sigma^4} \text{Var}S^2 &= 2(n-1) \\ \text{Var}S^2 &= \frac{2(n-1)\sigma^4}{(n-1)^2} = \frac{2\sigma^4}{n-1}. \end{aligned}$$

Therefore, the variance of the estimator S^2 decreases with increasing the sample size, since

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \text{Var}S^2 = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{2\sigma^4}{n-1} = 0.$$

Consider the linear relationship $y = \alpha + \beta x$ where $y = \log_2 \text{Var}S^2 = \log_2 \frac{2\sigma^4}{n-1}$ and $x = \log_2 n$. Thus,

$$\log_2 \frac{2\sigma^4}{n-1} = \alpha + \beta \log_2 n. \quad (1)$$

Using properties of the logarithm function, the equation (1) can be rewritten as

$$\log_2 2\sigma^4 - \log_2(n-1) = \alpha + \beta \log_2 n,$$

so,

$$\alpha = \log_2 2\sigma^4 - \log_2(n-1) - \beta \log_2 n. \quad (2)$$

Due to the \log_2 scale used in our method to analyze colony size, the increase of one unit in x corresponds to the initial colony size $2n$, since

$$x + 1 = (\log_2 n) + 1 = \log_2 n + \log_2 2 = \log_2(2n).$$

Thus, for the increase of one unit in predictor x the equation for the linear relationship becomes

$$\log_2 \frac{2\sigma^4}{2n-1} = \alpha + \beta \log_2(2n),$$

and, therefore,

$$\alpha = \log_2 2\sigma^4 - \log_2(2n - 1) - \beta \log_2(2n). \quad (3)$$

Equating the equations (2) and (3) where the intercept α is expressed as a function of the values x and $x + 1$, it follows that

$$\log_2 2\sigma^4 - \log_2(n - 1) - \beta \log_2 n = \log_2 2\sigma^4 - \log_2(2n - 1) - \beta \log_2(2n)$$

and

$$\beta[\log_2(2n) - \log_2 n] = \log_2(n - 1) - \log_2(2n - 1)$$

$$\beta \log_2 \frac{2n}{n} = \log_2 \frac{n - 1}{2n - 1}$$

$$\beta \log_2 2 = \log_2 \frac{n - 1}{2n - 1}$$

Therefore,

$$\beta \log_2 \frac{n - 1}{2n - 1}.$$

By the L'Hopital rule, as $n \rightarrow \infty$

$$\lim_{n \rightarrow \infty} \log_2 \frac{n - 1}{2n - 1} = \log_2 \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{n - 1}{2n - 1} = \log_2 \frac{1}{2} = \log_2 2^{-1} = -1 \log_2 2 = -1.$$

Therefore, as $n \rightarrow \infty$ the slope parameter is equal to $\beta = -1$ and the equation in the Colony Variance Plot (CVP) becomes

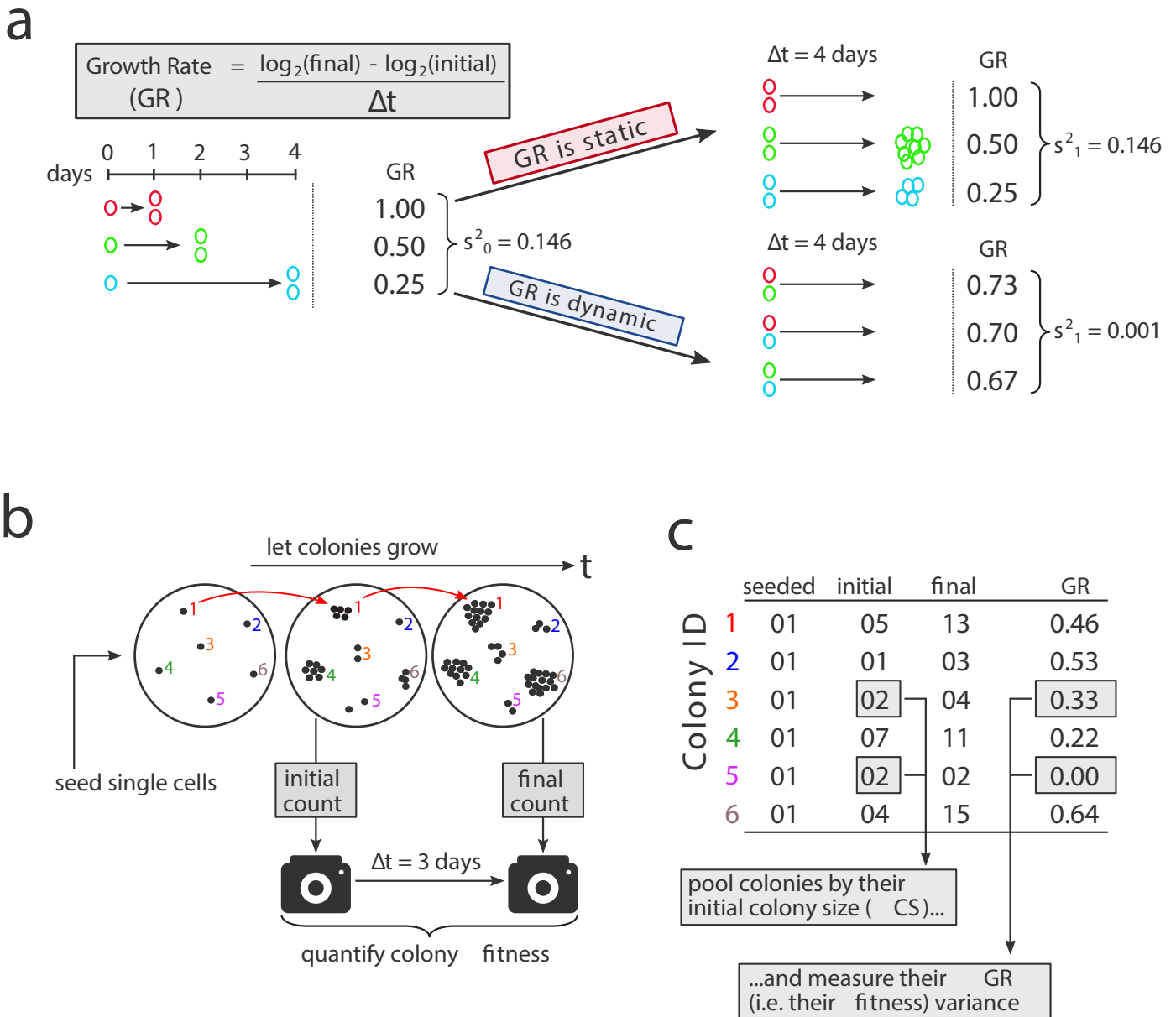
$$\log_2(\sigma^2) = \alpha - \log_2(CS).$$

Where the intercept $\alpha = \log_2 \sigma_0^2$ represents the growth rate variance in a heterogeneous cell population.

References

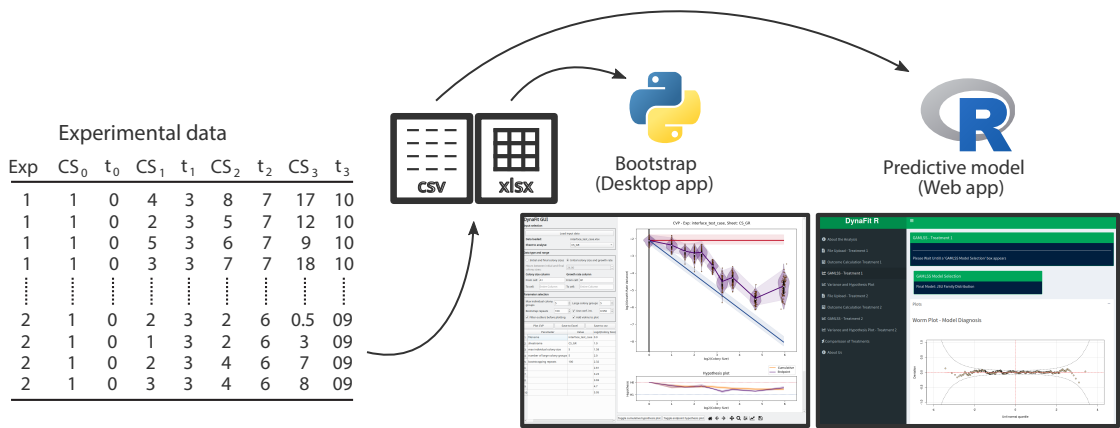
1. Kudo T, Jeknić S, Macklin DN, Akhter S, Hughey JJ, Regot S, et al. Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. *Nat Protoc.* 2018;13:155–69.
2. Regot S, Hughey JJ, Bajar BT, Carrasco S, Covert MW. High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell.* 2014;157:1724–34.
3. Yang KS, Kohler RH, Landon M, Giedt R, Weissleder R. Single cell resolution in vivo imaging of DNA damage following PARP inhibition. *Sci Rep.* 2015;5:10129.
4. Tamajusuku ASK, Villodre ES, Paulus R, Coutinho-Silva R, Battasstini AMO, Wink MR, et al. Characterization of ATP-induced cell death in the GL261 mouse glioma. *J Cell Biochem.* 2010;109:983–91.
5. Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell.* 2008;132:487–98.
6. Stewart-Ornstein J, Lahav G. Dynamics of CDKN1A in Single Cells Defined by an Endogenous Fluorescent Tagging Toolkit. *Cell Rep.* 2016;14:1800–11.
7. Lehmann EL, Casella G. *Theory of Point Estimation.* Springer; 1983.
8. Stasinopoulos, MD. *Flexible Regression and Smoothing: Using GAMLSS in R.* Chapman & Hall/CRC; 2017.
9. Stasinopoulos DM, Rigby RA. Generalized Additive Models for Location Scale and Shape (GAMLSS) in R. *Journal of Statistical Software.* 2007;23:1–46.
10. Mood A, Graybill, FA, Boes, DC. *Introduction to the Theory of Statistics.* 1973.
11. Fleischmann K. ROHATGI, V. K.: *An Introduction to Probability Theory and Mathematical Statistics.* John Wiley & Sons, New York-London-Sydney-Toronto 1976. 684. *Biometrical Journal.* 1979;21:797–797.

Supplementary Figure S1

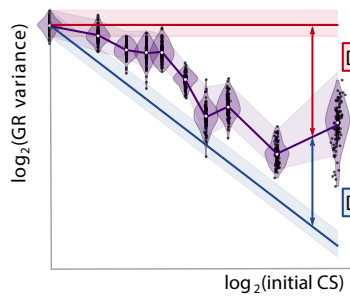


Supplementary Fig. S1. DynaFit principles. a, numerical representation of the rationale presented in Fig. 1a. Cells with static growth rates will produce colonies with the same variance in growth rate, regardless of colony size (upper scenario). Colonies containing cells with dynamic growth rates will present a lower variance of growth rates as they grow in number (lower scenario). b, schematic representation of the colony fitness experiment. Single cells are seeded, and colony fitness is quantified between two distinct time points. c, Example of experimental data obtained from b. For DynaFit, the colonies are grouped by their initial colony size. The growth rate variance is measured for each colony size.

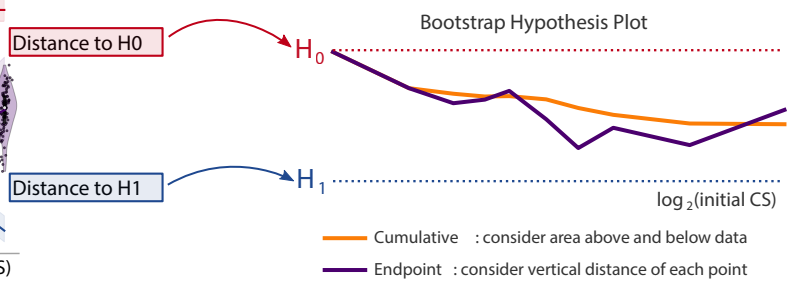
a



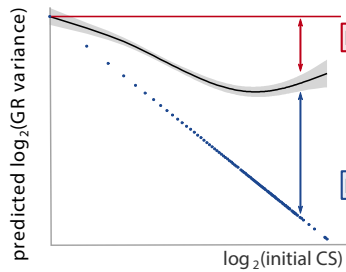
b



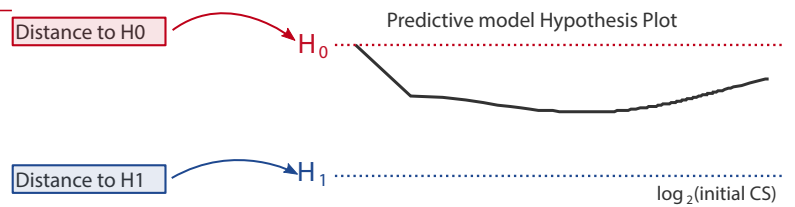
c



d

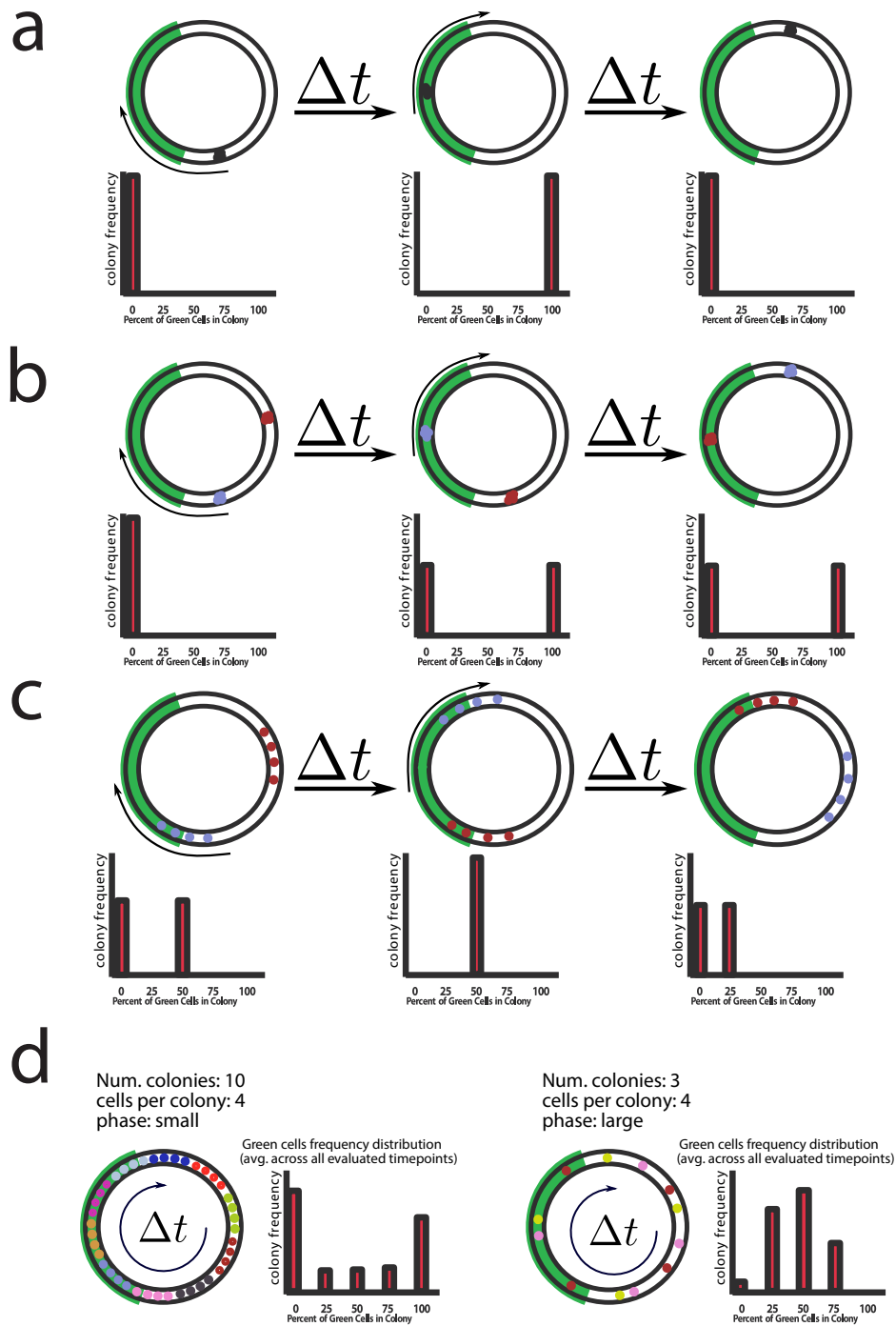


e



Supplementary Fig. S2. DynaFit implementations. a, data collected from Supplementary Fig. S1c is given as input to the two DynaFit apps. The Python bootstrap app and the R predictive modeling app are based on different analytical strategies. b. Colony Variance Plot formed by the Python app and c. its hypothesis plot. b. Colony Variance Plot formed by the R app and c. its hypothesis plot.

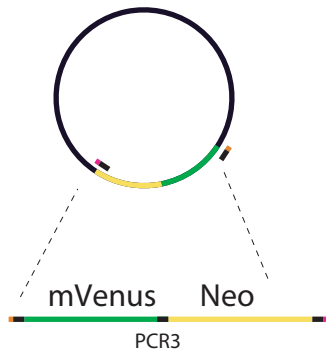
Supplementary Figure S3



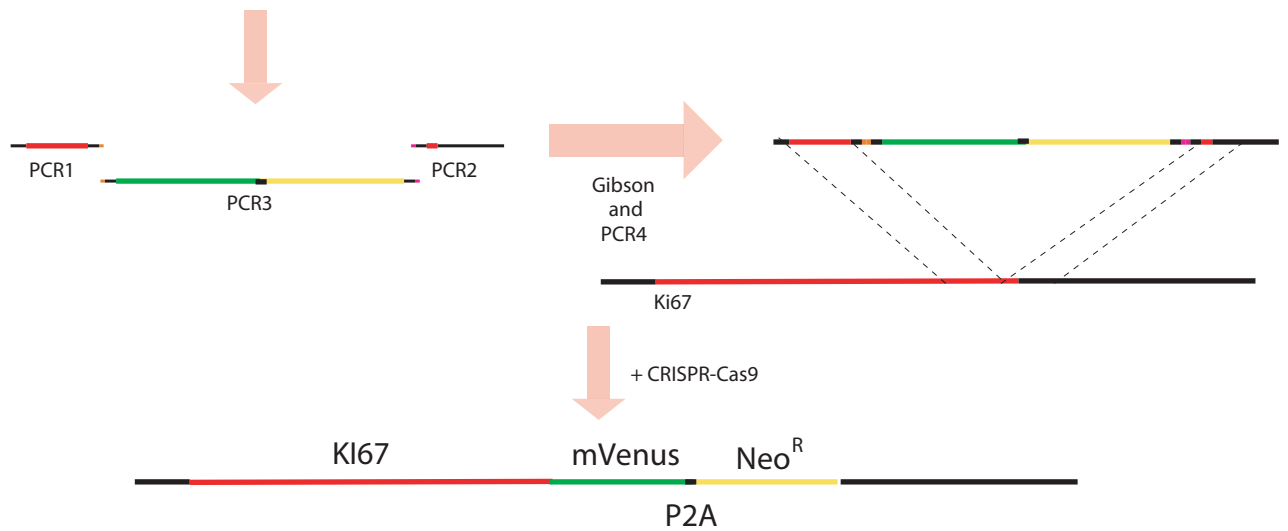
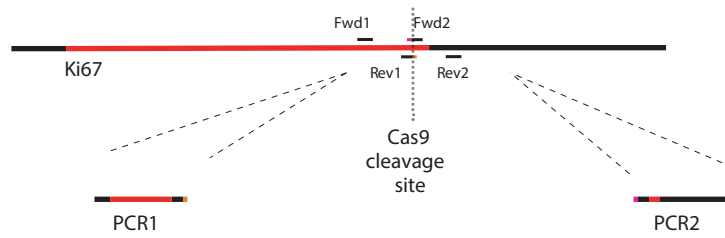
Supplementary Fig. S3. Analysis of the desynchronization of colonies of cells expressing FastFUCCI. a, FUCCI simulation for a single, synchronized colony with 4 cells. At a given time point, all cells in the colony will all either be green or not. b, simulating multiple colonies gives rise to multimodal distributions of green cell percentage in colonies. c, adding a phase shift parameter allows cells in each colony to be out of sync, producing percentages of green cells in each colony other than 0% or 100% for a given observation point. d, by modifying the simulation parameters, various frequency distributions of the percentage of green cells can be obtained for several colonies. Note that a, b and c represent three specific time steps of a full simulation run, which must walk all cells around the cell cycle at least once, and produced a final distribution considering all evaluated time steps.

Supplementary Figure S4

eFlut - mVenus-Neomycin

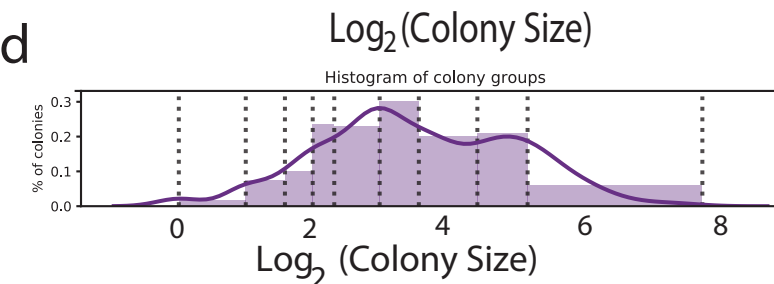
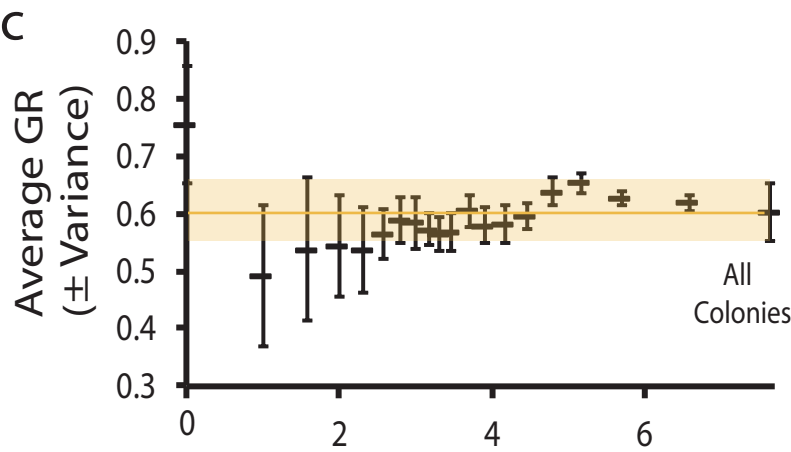
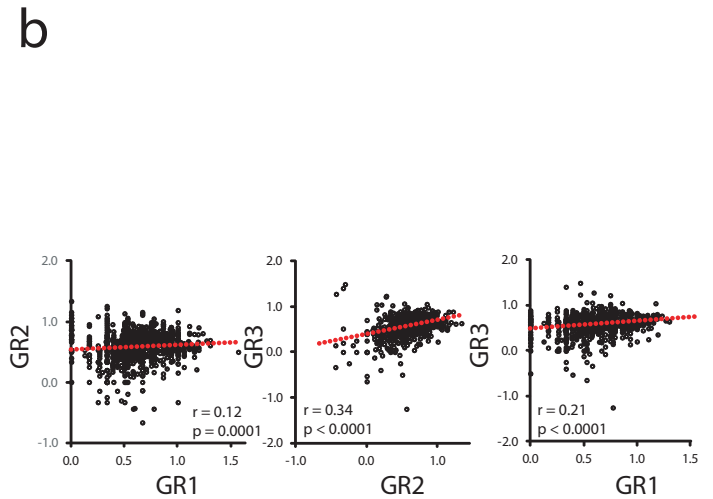
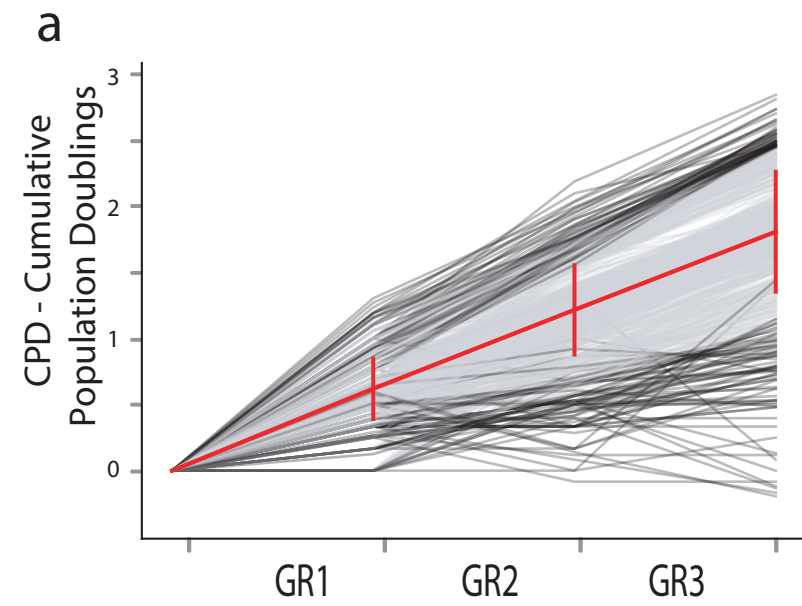


Ki67 human locus



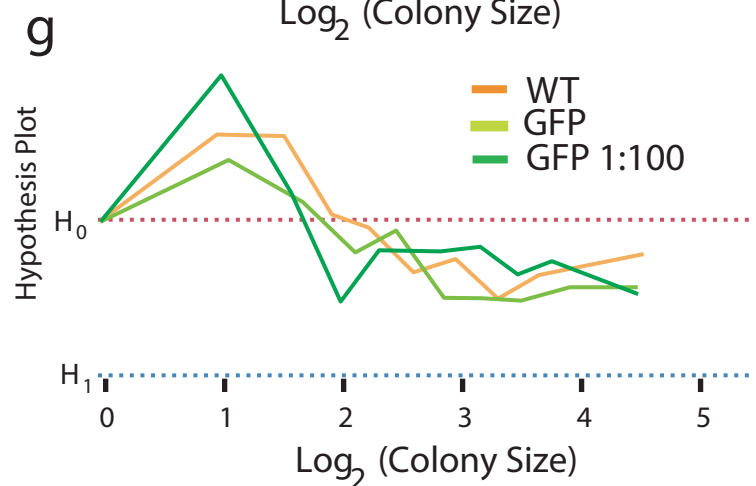
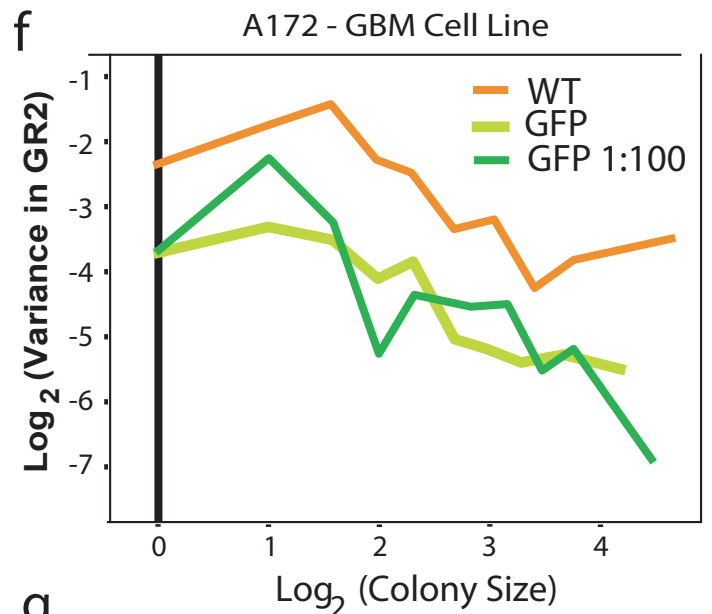
Primer	Sequence
Fwd1	tgcaagagtaaaggccaag
Rev1	cgctgcaccagctcctctggttctattttcttgaca
Fwd2	gaaccgcctccaccatgtcatagggacagtgaagatat
Rev2	gagtcattctcaaagcac
Rwd from Galit Lahav	tgtcaagaaaataagaaccagaggagctggtgcaggcg
Rev from Galit Lahav	atatctcactgtccctatgacatgggtggaggcggttc

Supplementary Fig. S4 . Tagging of the endogenous locus of Ki67 with EYFP. Sequence coding mVenus-P2A-Neomycin was PCR amplified from the eFlut-mVenus-Neomycin plasmid generously donated by Galit Lahav (Harvard University) and used to insert flanking regions of about 500 nt, amplified with the indicated primers. This was used for homologous recombination in the CRISPR-Cas9 targeted C-terminal region of Ki67 gene.

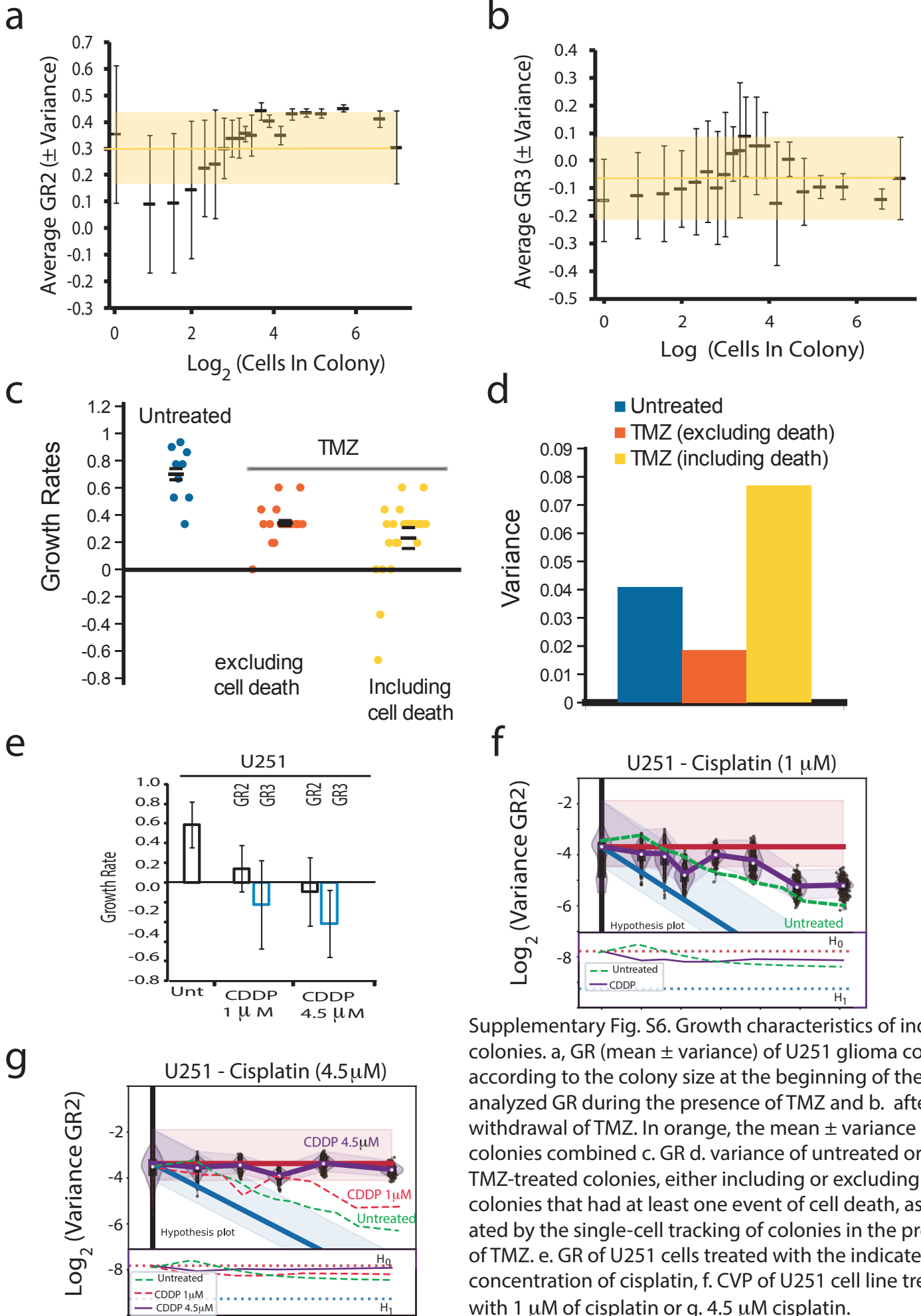


e

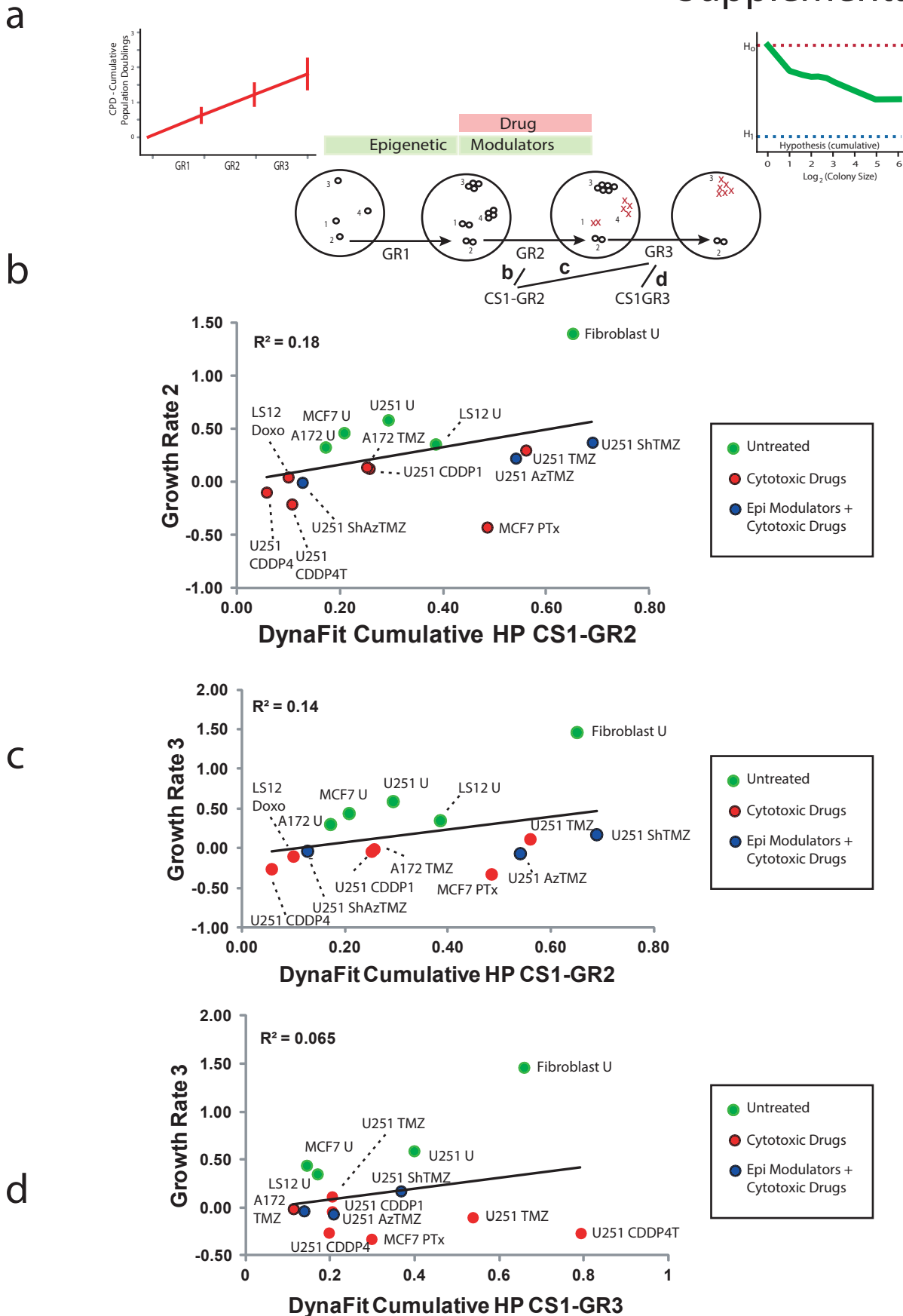
Cell Line	High Density		Low Density	
	Density (cell/cm ²)	GR (var)	Density (cell/cm ²)	GR (Var)
U251	1554	0.28 (0.0007)	31	0.50 (0.05)
A172	8386	0.21 (0.0004)	31	0.33 (0.18)



Supplementary Fig. S5 . Growth characteristics of individual treated colonies. a, GR of all colonies used in Fig. 1e. Mean \pm SD in red. b. Pairwise correlations among the three GRs. c. Mean \pm variance of GR2 of U251 glioma colonies according to the number of cells in CS1 or all colonies. Growth rate of colonies with 1 and 2 cells were different from all growth rates (ANOVA, Tukey's multiple comparison post-hoc test). d, Distribution of the number of colonies in each bin for Fig. 1e. e, GR of the indicated cell lines at high and low density. f, CVP and g, hypothesis plot of the glioma cell line A172wt (WT), GFP-tagged alone (GFP) or in the presence of 100 fold excess of untagged cells (GFP 1:100).



Supplementary Fig. S6. Growth characteristics of individual colonies. a, GR (mean \pm variance) of U251 glioma colonies according to the colony size at the beginning of the analyzed GR during the presence of TMZ and b. after the withdrawal of TMZ. In orange, the mean \pm variance GR of all colonies combined c. GR d. variance of untreated or TMZ-treated colonies, either including or excluding all colonies that had at least one event of cell death, as evaluated by the single-cell tracking of colonies in the presence of TMZ. e. GR of U251 cells treated with the indicated concentration of cisplatin, f. CVP of U251 cell line treated with 1 μ M of cisplatin or g. 4.5 μ M cisplatin.



Supplementary Fig. S7. Comparison of Dynafit results with growth rate. a, GR and DynaFit Cumulative Hypothesis plot results b. GR2 versus CS1-GR2 c. GR3 versus CS1-GR2 d. GR3 versus CS1-GR3 of untreated (green), treated only with cytotoxic drugs (red) and the combination of epigenetic modulators and cytotoxic drugs (blue).

CAPITULO II

APRESENTAÇÃO

Após a publicação do artigo “*Cancer cell fitness is dynamic*”, fomos convidados a escrever uma perspectiva científica sobre o artigo, a qual foi aceita para publicação na revista *Oncotarget*, conforme carta de aceite encontrada no Apêndice. Aqui, nós ampliamos a discussão a respeito do significado dos achados do dynafit ao lado dos demais achados da literatura.

The role of dynamic phenotypes in cancer

Luana S. Lenz^{1,2} and Guido Lenz^{1,2}

¹Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to: Guido Lenz, **email:** gulenz@gmail.com

Keywords: dynamic phenotype; fitness; tumor resistance; tumor evolution; single cell

Received: April 01, 2021

Accepted: June 16, 2021

Published:

Copyright: © 2021 Lenz and Lenz. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The question of whether cancer recurrence is mediated by a process that is exclusively Darwinian or that involves both Darwinian and Lamarckian processes is long standing and far from answered. The major open question is the origin of variation, whether it relays exclusively on stable, mostly genetic, mechanisms or whether it can also involve dynamic processes. Recent evidence with single-cell epigenomic and transcriptomic profiling and measurement of phenotypes in colonies indicate that several phenotypes quickly change with a few cell divisions. Most importantly, cell fitness under basal as well as in the presence of chemotherapeutic agents changes considerably over short periods of time and this dynamic is reduced by epigenetic modulators. These studies contribute to establish the dynamic nature of fitness and are key for the interplay between cancer cell dynamics and stable genetic and epigenetic alterations in the survival of a few cancer cells after therapy.

INTRODUCTION

A major challenge to overcome in cancer is to understand how cells adapt to survive to therapy. The classical Darwinian mechanism of resistance, in which random mutations permit natural selection, plays a role in cancer resistance, but is far from the only process involved. Mechanisms of tolerance generated through dynamics in cellular processes can also support therapy evasion. Therefore, the increased knowledge about the dynamics in several phenotypes in cancer cells in the last years has opened our eyes on the degree of these dynamics and their potential role in therapeutic resistance [1, 2]. Such fluctuation together with the occurrence of different level of expression memory along generations [3, 4] can contribute to heterogeneity found among related cells, and indicate that the heterogeneity of a tumor goes far beyond mutations.

So far, most studies of dynamics have focused on signaling pathways, expression of specific genes and modulation of cellular processes [5, 6], however, the most important omniphentotype in cancer is the number of live descendant of a cancer cell after a defined time, i.e., its fitness. Several studies have shown the improve on cell fitness due to phenotypic changes [7, 8], however the focus is usually populational and not on the dynamics

of single cells. A very remarkable example is the impact of the flower isoforms on fitness. This transmembrane protein has four isoforms, two of them are related with a winner phenotype and the other two with a loser phenotype, thus being considered a ‘fitness fingerprint’ [9, 10]. The outcome depends on the expression of neighboring cells and other proteins involved in signaling [9, 11, 12]. Even though it is known that the flower protein expression is important to tumor growth and metastasis [9, 13], it is not known if the expression of the flower gene is stable or fluctuates over time in single cells. In this regard, the question remains whether a winner cell will produce descendants that are all winners, or will the formed clone be a mix of winner and loser cells in a similar proportion of the population of non-related cells?

The major challenge to measure the dynamic of fitness at single cells is that when a cell dies, the ability to get information about its future is lost, and when a cell divides, the cell is not the same anymore. To overcome this methodological barrier and address the dynamics in cancer cell fitness, we created the Dynamic Fitness Analysis (DynaFit) method [14]. The rationale of DynaFit is that if fitness does not change during the formation of colonies, the fitness level of the founding cell will be phenocopied to all cells in the colony and therefore the comparison between colonies will reveal a variance in fitness similar

to the variance of their founding cells. However, if fitness changes over time or with cell division, cells with diverse fitness levels will produce colonies that will be formed from high and low fitness cells and therefore these colonies will have a behavior much closer to the average fitness and therefore a variance in fitness among colonies much lower than the variance of their founding cells (Figure 1). As DynaFit takes into account the size of the colony, one can estimate the degree of dynamics in fitness.

The results obtained with DynaFit clearly show that normal and cancer cells change their fitness after only a few generations both under normal growth condition or in the presence of chemotherapeutic agents [14]. This indicates that tolerance to these agents fluctuates and may thus contribute for the high rate of failure of treatment of tumors such as glioblastoma.

The origins of phenotypic fluctuations are diverse and far from understood. We observed that sister cells already have different levels of MAPK signaling levels and that cell cycle desynchronization and the induction of apoptosis and senescence becomes different among

cells in colonies after a few divisions [14]. Others have also shown the contribution of cell cycle-dependent fluctuations [15], transcriptional noise [16, 17] and epigenetic modulation [18] on the variation of cells. Tolerance is a dynamic phenomenon caused by epigenetic reprogramming [19, 20] which can either remain dynamic or be fixed in population through genetic assimilation [21] or genetic resistance [22]. We hypothesized that alterations in epigenetic pathways through epigenetic inhibitors could alter the dynamic of fitness. Indeed, cells treated with both histone deacetylase inhibitor and DNA methyltransferase inhibitor maintain a variance among colonies similar to the observed in single cells. Besides that, fractional killing was reduced in bigger colonies when they were treated with epigenetic inhibitors along with TMZ compared with colonies treated only with TMZ, indicating that when epigenetic mechanisms are blocked the sensitive phenotype is phenocopied through generations [14].

The strategy to freeze the level of tolerance of cells has the drawback of fixing both the good and the bad. The strategy of evolutionary trap could be employed

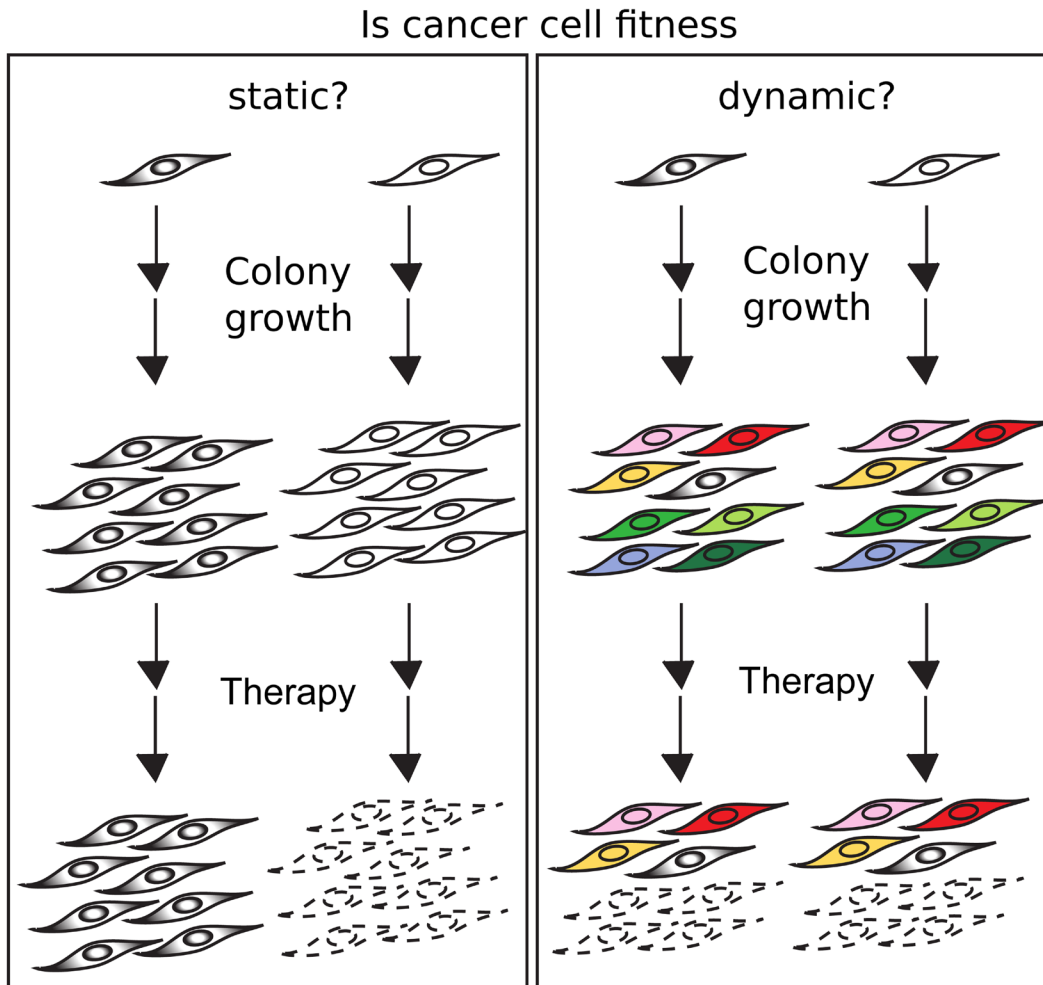


Figure 1: If fitness is conserved, cells with high and low fitness will generate colonies which will be resistant or sensitive to a therapeutic agent (left). If fitness changes with time and/or division, the colonies formed from high and low fitness cells will be similar, in which both colonies will undergo fractional killings in the presence of a therapeutic agent (right).

to deal with cells with a stabilized tolerant state to a given drug [23]. In that case, the pressure of a drug will positively select a trait that confers an advantage, but also produce fitness trade-offs, that can be explored with a second therapeutic intervention. This concept has been demonstrated in relation to the aneuploid phenotype [24] and the antagonistic pleiotropy between bromodomain and BCL-2 inhibitors in acute myeloid leukemia [25]. However, the practical applicability of the rationale of evolutionary trap in a therapeutic setting is still in the distant future.

The incorporation of dynamic processes in our knowledge of cancer biology is fundamental for basic and applied cancer research. Integrating Darwinian and Lamarckian evolutionary concepts in cancer cell adaptation to therapeutic pressure is key for moving forward in the comprehension on how cancer cells adapt to the challenges of therapy and is the only way to improve therapies available.

CONFLICTS OF INTEREST

Authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011; 146:633–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026>. [PubMed]
- Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, Körbel C, Laschke MW, Gimotty PA, Philipp SE, Krause E, Pätzold S, Villanueva J, et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell*. 2013; 23:811–25. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.003>. [PubMed]
- Shaffer SM, Emert BL, Reyes Hueros RA, Cote C, Harmange G, Schaff DL, Sizemore AE, Gupte R, Torre E, Singh A, Bassett DS, Raj A. Memory Sequencing Reveals Heritable Single-Cell Gene Expression Programs Associated with Distinct Cellular Behaviors. *Cell*. 2020; 182:947–59. e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.003>. [PubMed]
- Phillips NE, Mandic A, Omid S, Naef F, Suter DM. Memory and relatedness of transcriptional activity in mammalian cell lineages. *Nat Commun*. 2019; 10:1208. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09189-8>. [PubMed]
- Paek AL, Liu JC, Loewer A, Forrester WC, Lahav G. Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. *Cell*. 2016; 165:631–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.025>. [PubMed]
- Filippi-Chiela EC, Bueno e Silva MM, Thomé MP, Lenz G. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy*. 2015; 11:1099–113. <https://doi.org/10.1080/1548627.2015.1009795>. [PubMed]
- McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends Cancer*. 2020; 6:49–61. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.11.009>. [PubMed]
- Menon DR, Hammerlindl H, Torrano J, Schaidler H, Fujita M. Epigenetics and metabolism at the crossroads of stress-induced plasticity, stemness and therapeutic resistance in cancer. *Theranostics*. 2020; 10:6261–77. <https://doi.org/10.7150/thno.42523>. [PubMed]
- Madan E, Pelham CJ, Nagane M, Parker TM, Canas-Marques R, Fazio K, Shaik K, Yuan Y, Henriques V, Galzerano A, Yamashita T, Pinto MAF, Palma AM, et al. Flower isoforms promote competitive growth in cancer. *Nature*. 2019; 572:260–64. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1429-3>. [PubMed]
- Madan E, Peixoto ML, Dimitrion P, Eubank TD, Yekelchik M, Talukdar S, Fisher PB, Mi QS, Moreno E, Gogna R. Cell Competition Boosts Clonal Evolution and Hypoxic Selection in Cancer. *Trends Cell Biol*. 2020; 30:967–78. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.10.002>. [PubMed]
- Merino MM, Rhiner C, Lopez-Gay JM, Buechel D, Hauert B, Moreno E. Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell*. 2015; 160:461–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.017>. [PubMed]
- Gogna R, Shee K, Moreno E. Cell Competition During Growth and Regeneration. *Annu Rev Genet*. 2015; 49:697–718. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055214>. [PubMed]
- Parker T, Madan E, Gupta K, Moreno E, Gogna R. Cell Competition Spurs Selection of Aggressive Cancer Cells. *Trends Cancer*. 2020; 6:732–36. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.03.008>. [PubMed]
- Lenz LS, Faccioni JL, Bracco PA, Santos JAF, Pereira LC, Buss JH, Tamborindeguy MT, Torgo D, Monteiro T, Mantovani GB, Santo CN, Marcolin JC, Dalsin E, et al. Cancer Cell Fitness Is Dynamic. *Cancer Res*. 2021; 81:1040–51. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488>. [PubMed]
- Hsu CH, Altschuler SJ, Wu LF. Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell*. 2019; 178:361–73.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.041>. [PubMed]
- Kannoly S, Gao T, Dey S, Wang IN, Singh A, Dennehy JJ. Optimum Threshold Minimizes Noise in Timing of Intracellular Events. *iScience*. 2020; 23:101186. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101186>. [PubMed]
- Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. 2002; 297:1183–86. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>. [PubMed]
- Meir Z, Mukamel Z, Chomsky E, Lifshitz A, Tanay A. Single-cell analysis of clonal maintenance of transcriptional and epigenetic states in cancer cells. *Nat Genet*. 2020;

- 52:709–718. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0645-y>. [PubMed]
19. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*. 2010; 141:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.027>. [PubMed]
 20. Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, Beqiri M, Sproesser K, Brafford PA, Xiao M, Eggan E, Anastopoulos IN, Vargas-Garcia CA, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*. 2017; 546:431–35. <https://doi.org/10.1038/nature22794>. [PubMed]
 21. Salgia R, Kulkarni P. The Genetic/Non-genetic Duality of Drug ‘Resistance’ in Cancer. *Trends in Cancer*. *Trends Cancer*. 2018; 4:110–18. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.01.001>. [PubMed]
 22. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, Maruvka YE, Ji F, Bhang HE, Krishnamurthy Radhakrishna V, Siravegna G, Hu H, Raouf S, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nat Med*. 2016; 22:262–69. <https://doi.org/10.1038/nm.4040>. [PubMed]
 23. Gatenby RA, Brown JS. Integrating evolutionary dynamics into cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020; 17:675–86. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0411-1>. [PubMed]
 24. Chen G, Mulla WA, Kucharavy A, Tsai HJ, Rubinstein B, Conkright J, McCroskey S, Bradford WD, Weems L, Haug JS, Seidel CW, Berman J, Li R. Targeting the adaptability of heterogeneous aneuploids. *Cell*. 2015; 160:771–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.026>. [PubMed]
 25. Lin KH, Rutter JC, Xie A, Pardieu B, Winn ET, Bello RD, Forget A, Itzykson R, Ahn YR, Dai Z, Sobhan RT, Anderson GR, Singleton KR, et al. Using antagonistic pleiotropy to design a chemotherapy-induced evolutionary trap to target drug resistance in cancer. *Nat Genet*. 2020; 52:408–17. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0590-9>. [PubMed]

CAPITULO III

APRESENTAÇÃO

Muitos fenótipos impactam o *fitness* celular, os quais também devem ser dinâmicos. As mitocôndrias são estruturas altamente dinâmicas e que afetam diretamente vários aspectos celulares, em especial a energia disponível para o crescimento e a decisão de apoptose. A funcionalidade, morfologia e massa mitochondrial dependem de quatro processos: fissão, fusão, biogênese e mitofagia, como o resultado final da combinação desses processos resulta na massa mitochondrial total presente em uma célula, foi avaliado no manuscrito abaixo a massa mitochondrial e seu impacto no *fitness* celular em situação controle e tratada. Também exploramos as alterações provocadas pela TMZ sobre as mitocôndrias e a ocorrência de mitoses assimétricas. O manuscrito será em breve submerido à revista *Mitochondrion*.

Mitochondrial response of glioma cells to temozolomide

Luana Suéling Lenz^{1,2}, Daphne Torgo de Lemos^{1,2}, Julieti Huch Buss^{1,2}, Guido Lenz^{1,2*}

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

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

* Corresponding Author: Guido Lenz, UFRGS, Av Bento Goncalves, 9500, Predio 43431, sala 107, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970, Brazil. Phone: 5551- 3308-7620; Fax: 5551-3308-7003; E-mail: lenz@ufrgs.br

Abstract

Metabolic adaptations are central for carcinogenesis and response to therapy, but little is known about the contribution of mitochondrial functionality to the response of gliomas cells in response to the standard treatment with temozolomide (TMZ). Here we investigated the dynamic and heterogeneity of the mitochondrial mass in response to TMZ at single cell level. Asymmetric mitosis contributed to the heterogeneity of mitochondrial levels in glioma cells. Mitochondrial networks responded to TMZ with increase of mitochondrial mass and the production of round structures of dysfunctional mitochondria. The amount of mitochondria affected the fitness of cells in control and treated condition.

Keywords: mitochondria, asymmetric mitosis, cell fitness, temozolomide

1. Introduction

Cancer tissue presents complex metabolic adaptations to sustain cellular growth [1]. The importance of mitochondrial functionality to cancer is evidenced by the necessity to restore mtDNA [2] and the negative selection of mitochondrial mutations [3]. Besides the central role in metabolism, mitochondria are also central in the control of apoptosis. Because of these characteristics, mitochondria could be a target to cancer therapy [4]. However, the absence of positive results from clinical trials with inhibitors of metabolic pathways points to the challenges still faced by the

metabolic plasticity of cancer cells [5]. Therefore, the understanding of the metabolism dynamic in single cells is fundamental before the proposal of new therapeutic strategies.

Glioblastoma is a tumor from central nervous system that despite the existence of consolidated treatment, which is composed by tissue removal by surgery followed by radiotherapy and chemotherapy, has a poor prognosis. Rarely patients achieve the 2-year survival mark [6]. In glioblastoma, one very prevalent metabolic modification is the mutation in isocitrate dehydrogenase that diverges the Krebs cycle intermediate α -ketoglutarate to the oncometabolite 2-hydroxiglutarate, with strong impact in DNA methylation [7]. Glioma cells respond to temozolamide (TMZ), the standard chemotherapeutic drug, activating several cellular processes, including cell cycle arrest, apoptosis, autophagy and senescence [8,9]. In addition, such cells develop alterations in mitochondrial functionality [10,11], but there is no data from single cells studies or the description of the dynamics of mitochondrial mass in the transition from sensitive to resistant.

Tumorigenesis is harmed when DRP1 (responsible for the fission of mitochondrial network) expression is inhibited in brain tumor initiator cells, suggesting that mitochondrial dynamics are important to tumor growth [12]. The mitochondrial dynamics is responsible for morphological changes in the organelle that impact the energy production [13]. The process includes the constant cycles of fusion, fission, biogenesis and mitophagy, that ultimately impacts the amount of functional mitochondria. Once the amount of mitochondria is the final outcome of such dynamics, our aim is to describe the responses of mitochondria amount to TMZ, and the impact of it on cellular fitness.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture, transduction and treatments

A172 cell line were acquired from American Tissue Culture Collection (ATCC), cultured in DMEM LOW (Gibco #31600-034) supplemented with 10% fetal bovine serum (Laborclin #630111) and maintained at 37°C 5% CO₂ in an humidified atmosphere. Cells were routinely tested to *Mycoplasma* through MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza). During experiments the medium were supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Gibco #15140-122) and 0.1% amphotericin B (Gibco #15290-018). Transduction were performed with lentivirus as previous described [9] with the plasmids pLYS1-FLAG-MitoGFP-HA (addgene #50057) [14] and lentilox. A172 transduced cells were cloned, generating the cell lines A172^{mitoGFP}, which express GFP on the inner membrane of mitochondria, and A172^{GFP}, which express a cytosolic GFP, both under control of a

CMV promoter. A172^{mitoGFP} cells were later transduced with pLenti-H2B-mCherry (addgene #89766) [15], which codifies a mCherry red fluorescent protein fused to histone H2B and named A172^{mitoGFP-H2B}. A172 cells were transduced with pCLBW-cox8-EGFP-mCherry (addgene #78520) [16] to measure mitophagy level. TMZ (Sigma-Aldrich Chemical T2577) and Rotenone (Cayman chemical company 13995) were diluted in DMSO and used at 50 or 100 μ M and 100 nM respectively, final concentration of DMSO were less than 1%. Cells previous of treatment were considered as control cells.

2.2 Mitotracker staining

Mitotracker staining were performed with mitotracker green and red (Invitrogen M7514 and M22425) at 100 nM for 30 minutes. The colocalization analysis were performed with JACoP plugin [17]. To measure the mitochondrial mass in A172 and U251 wt cells, the staining was performed 5 days after treatment with TMZ 100 μ M 3 hrs, and the images were acquired in an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200 M) with 40x of magnification. Staining of cells with round structures was made at 8 days after treatment with photos taken 30 minutes after mitotracker (images were taken in an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200 M) with 100x oil immersion objective). Quantification was manually performed on ImajeJ.

2.3 Mitophagy

Cells transduced with the mitophagy reporter were kept untreated, treated with TMZ or treated with rotenone 100 nM for 3 days as a positive control, the images were acquired in Zeiss Axiovert 200 M with 100x oil immersion objective. The quantification of every cell was performed manually on ImageJ. Mitophagy was quantified through the percentage of pixels values above 5 after the subtraction of the green fluorescence from red fluorescence.

2.4 Asymmetric mitosis

Asymmetric mitochondrial mitosis in A172^{mitoGFP-H2B} was observed in standard culture. Pairs of cells with post mitotic morphology (round and stuck together) were imaged with Zeiss Axiovert 200 M on red and green channel. The quantification was performed in ImageJ. After the subtraction of background, pairs of cells with the red fluorescence (histone) ratio above 1.4 were eliminated from the analysis to avoid misinterpretation about the kinship. The remaining pairs of cells were considered sisters and the ratio of integrated density (mean gray value minus background x area) of green channel were analyzed. Sisters categorized as outliers from the distribution (identify by SCOUTS [18]) were considered as asymmetric, and were manually reviewed. To access the impact

on fitness, sister cells with asymmetric integrated density were first imaged with Zeiss Axiovert 200 M and then imaged for the next days in CytoSMARTTH System (Lonza). Descendants were followed with manual tracking using the software Ice[19]. Three days after the first mitosis, cells were treated with TMZ 100 μ M for 3 hours. These cells were further photographed in Zeiss Axiovert 200 M on days 3, 5 and 7 after TMZ treatment to investigate the mitochondrial mass.

2.5 Imaging and quantification of transduced cells

A172^{mitoGFP-H2B} cells were treated with TMZ 50 or 100 μ M for 3 hours and imaged on Zeiss Axiovert 200 M or with the Incucyte[®] System (Sartorius) for the following days, with photos every 30 minutes with the 20x objective. Nuclear size and green fluorescence were manually measured in ImageJ. The presence of round structures was analyzed in population of cells once per day. In addition, the presence of such structures at the single cell level were verified each hour, and each cell were classify as follow: category 0 – absence of round structures; 1 – presence of one very small round structure; 2 – presence of at least two small structures; 3 – presence of at least one big round structure; 4 – presence of at least two big round structures; 5 – presence of several round structures, including at least 3 big round structures (Fig S2c). The dynamics of round structures was analyzed in the 10th day after treatment with 50 μ M for 3 hours. Treated cells were imaged in the Incucyte[®] System (Sartorius) for 1 h and photos were taken each 2 minutes. The size of round structures was measured on the bigger diameter with Incucyte Software and the area over time was measured with ImageJ. The time to reduce to 50% from the maximum area are indicated as $t_{0.5}$, and it was estimated for the round structures that disappear without the reduction to 50% by the average of the time when it disappear and the time before. For analysis in colonies, A172^{mitoGFP-H2B} were plated and in the next day 20 single cells or sister cells were randomly chosen and imaged with the Zeiss Axiovert 200 M 40 x objective. Five days after plating, colonies were treated with TMZ 100 μ M for 3 hours. Colonies were imaged on days 1, 5, 8, 14 and 21 after plating. The percentage of cells with round structures in colonies at day 8 were compared to the expected from population analysis and from random grouped cells.

2.6 Cell sorting

A172^{mitoGFP-H2B} cells are harvested, centrifuged and resuspended in PBS 1% BSA and sorted with BD FACS ARIA III between 10% less green fluorescent and 10% more green fluorescent populations. The two populations were collected in 96 plates, with 1000 cell per well. Cells were let to adhere for two hours and then treated with TMZ 100 μ M for three hours or kept on standard

culture condition. Photos were taken on day 0, 6 and 9 after sorting to track the population growth, and the cumulative population doubling (CPD) were calculated as $(\log(\text{final cell number}) - \log(\text{initial cell number}))/\text{days}$. At day 6 and 9, cells were also harvested, and cytometry were performed.

3. Results

3.1 Acute TMZ treatment induce changes in mitochondria amount

Since metabolic changes are central in cancer, and previous studies have shown metabolic changes in cells resistant to TMZ [10,11], we aimed to investigate the impact of acute treatment with TMZ over mitochondria. To analyze mitochondrial dynamics in single cell level, we generate A172^{mitoGFP} cell line through lentiviral transduction, thus staining the inner mitochondrial membrane. The gene inserted consists of 160 nucleotides from the MCU (a calcium transporter from the inner mitochondrial membrane) which contains the signal peptide to mitochondria, fused to EGFP, and is under the control of a CMV promoter. Cells were cloned to assure that the whole population has the same quantity of insertions and they were further transduced with a mCherry red protein that localizes into nucleus. As expected, the EGFP of cells A172^{mitoGFP-H2B} colocalize with mitotracker red signal (Fig 1a and S1a).

Previous results from our group [20] indicate that, after treatment with TMZ 100 μM for 3 hours, mitochondrial mass increase in U87 glioma cells at day 5. In line with these results, the integrated density of mitochondrial mass in cells A172 increased after TMZ treatment (Fig 1b), with both the fluorescence area and mean intensity increasing (Fig 1d). This was also confirmed by flow cytometry (Fig 1h), and when A172^{wt} and U251^{wt} were evaluated with mitotracker green[®] (Fig 1Sc). On the other hand, in A172^{GFP} control cells, which were transduced only with EGFP, no significant alteration in the integrated density and fluorescence signal was observed (Fig 1c and 1e), despite an increase in cell size (Fig 1e), as described for TMZ [8]. Even though we observed a transitory increase in fluorescence of A172^{GFP}, it was not sustained, and the comparison between A172^{mitoGFP} and A172^{GFP} indicate the same increase in cell size but not in relation to fluorescence (Fig 1f and 1g). These results indicate that the fluorescence increase observed is not a consequence of GFP increase in expression, but a rise in GFP mitochondrial accumulation, caused by increase in mitochondrial mass due to mitochondrial biogenesis or reduction of mitochondrial degradation. The analysis of integrated density at single cell level demonstrated the same tendency of increase observed in populational analysis (Fig S1b). We did not observed differences in mitophagy levels (Fig S1e and S1f). The treatment also increased the heterogeneity of population, once the coefficient of variation

increased from 0.5 to 0.7 in A172^{mitoGFP} (Fig 1d). To our surprise, the range of increase in integrated density is not related with the fitness after TMZ (Fig S1g).

Additionally, single cell tracking revealed that cells continue to proliferate until 24 hours after treatment, and the time to cell death was variable, with the peak of death near to the increase observed in mitochondrial mass (data not shown). This generated a cumulative population doubling with an initial stability and subsequent decrease (Fig S1d) and indicate that could be a link between the two phenotypes.

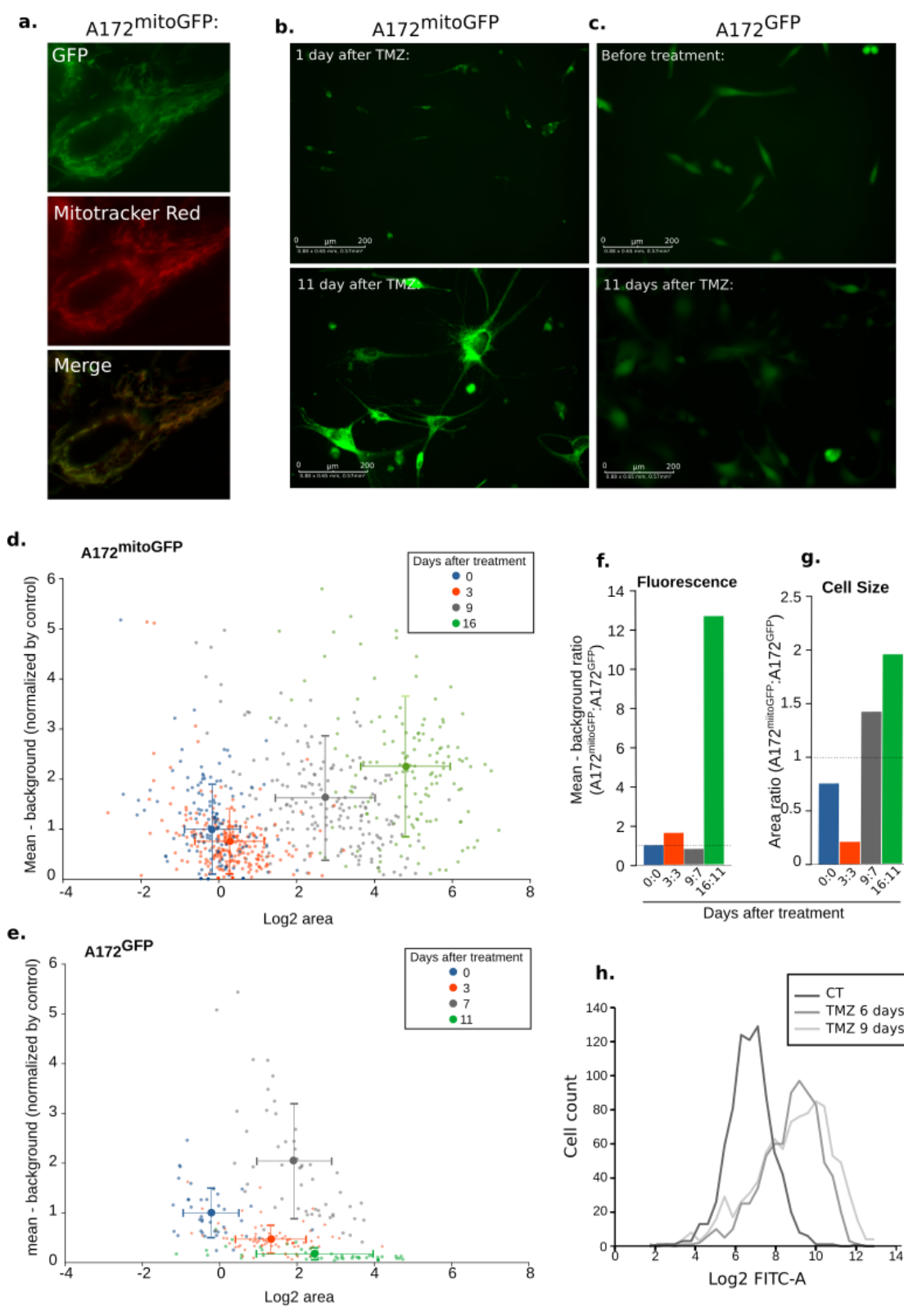


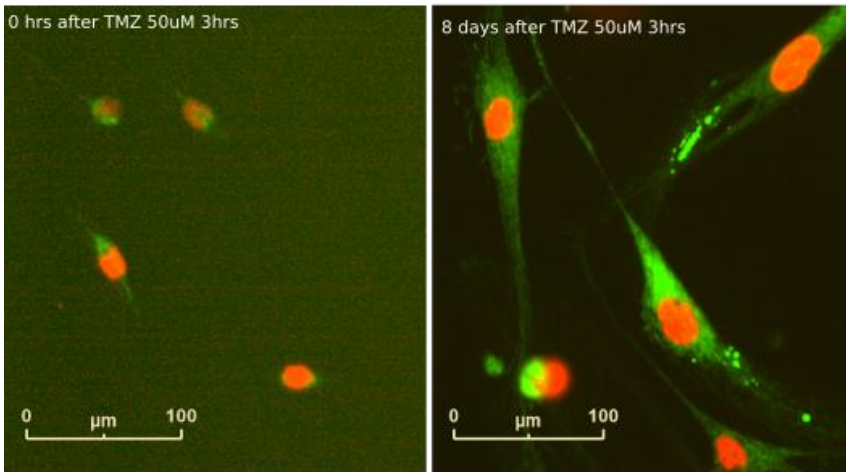
Figure 1. Overlap between mitochondrial GFP and mitotracker red in A172^{mitoGFP} cells (a). Example of A172^{mitoGFP} (b) and A172^{GFP} (c) cells under control or treated condition. Mean green fluorescence and size of A172^{mitoGFP} (d) and A172^{GFP} (e) cells after indicated days of treatment. Ratio between A172^{mitoGFP} and A172^{GFP} of fluorescence (f) and cell size (g) before and after treatment. Cytometry of A172^{mitoGFP} cells in control conditions or after the indicated days of treatment with TMZ 100 μ M during 3 hours (h).

3.2 Morphological changes in the mitochondrial network

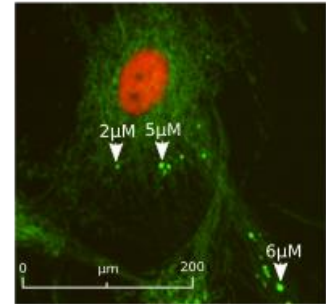
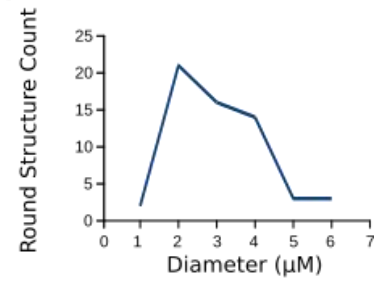
Besides altering the amount of mitochondria, TMZ treatment also produced considerable morphological changes. The most striking was the appearance of round structures (Fig 2a) with a size ranging between 1 to 6 μM (Fig 2b) that are fluorescent in the A172^{mitoGFP} but not in the A172^{GFP} cells (Fig S3c). The proportion of cells containing round structures increased with time until reaching a plateau around 10 days after treatment (Fig 2c and S2b). Additionally, single cell tracking until 13 days after treatment revealed that almost every cell presented, at same point, these round structures (Fig S2e). Interestingly, in this instance, cells that evaded therapy had a mitochondrial mass and morphology similar to untreated cells (Fig S2a). The dynamic of nuclear increase after TMZ treatment [9] is similar to the dynamic of the appearance of round structures (Fig 2c). Therefore, we investigate if there was a relation between the two phenotypes. Indeed, cells categorized as 0 (see section 2.5) had a smaller nuclear size (Fig 2d). We also investigated if there was a genetic component to the appearance of round structures by imaging colonies and comparing it to random grouped cells. The results were similar among colonies versus randomly assembled cells (Fig S2d), indicating that the appearance of structures is not conserved in colonies and that the probability of appearance of structures is not transmitted from mother to daughter cells.

To verify if such structures are stress granules, we evaluate the dynamic of appearance of round structures. Stress granules are known to increase in size after formed, by the addition of new content or by the fusion of granules [21]. Cells were imaged after 10 days of treatment every 2 minutes for 1 hour. We observed that the round structures decreased in size until disappearing (Fig 2e and 2f), while time to reduction to half of the initial size ($t_{0.5}$) were highly variable (Fig 2e red dots), including structures that remained over the time of analysis (Fig 2e, gray line without red dot). The fluorescence of mitochondrial network demonstrated just a slight reduction in fluorescence, indicating that the disappearing of round structure were not caused by photo bleaching (S2f). Besides that, we did not observe fusion or fission between round structures (Fig S2g), suggesting that these structures are not stress granules. Round structures were also observed in cells transduced with the mitophagy plasmid (Fig S3b). This indicates that these structures are not located in autolysosomes as would be if the round structures were visualized just in the red channel, since the green fluorescence from GFP is lost when exposed to low pH. When A172^{mitoGFP} cells were stained with mitotracker red we did not observe round structures in the red channel (Fig S3a) suggesting that the round structures are dysfunctional mitochondria.

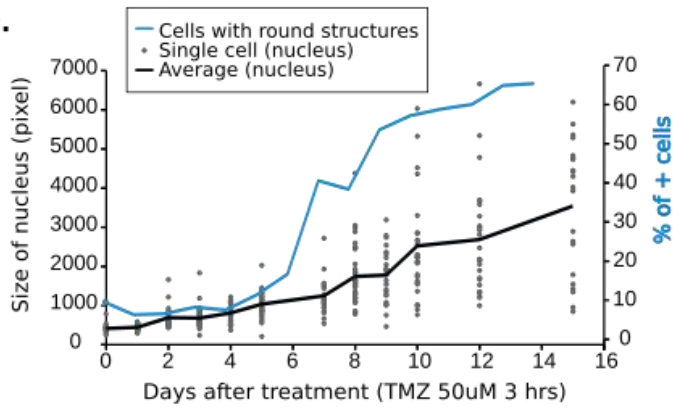
a.



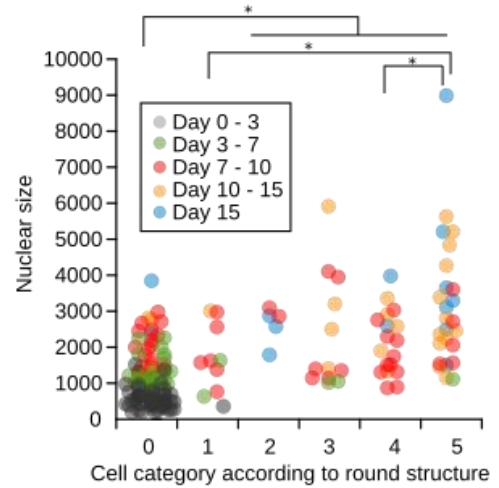
b.



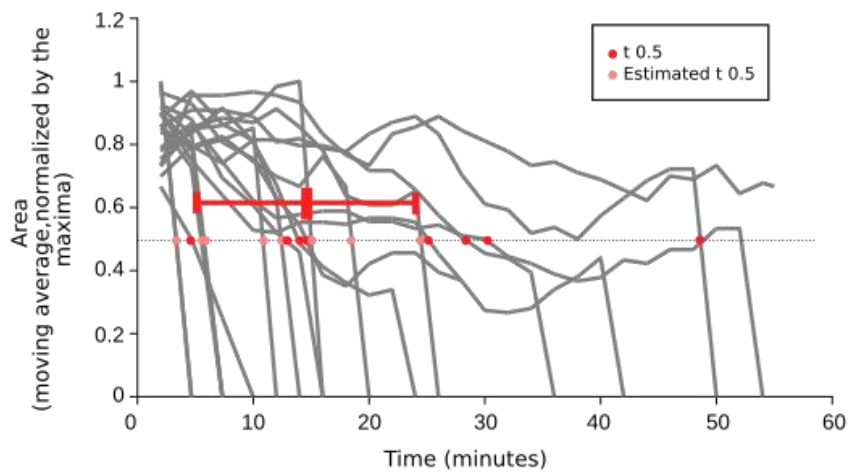
c.



d.



e.



f.

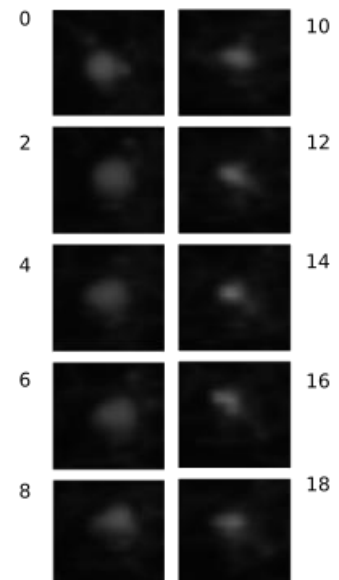


Figure 2. A172^{mitoGFP-H2B} present alterations in mitochondrial network after 8 days of treatment, with the presence of round structures **(a)**. Size of round structures observed in cells 10 days after treatment with TMZ 50uM 3hrs (top) and same examples (bottom) **(b)**. Percentage of cells with round structures (blue line) and the nuclear size (black line) increase over time **(c)**. Relation between nuclear area and category of round structure (see section 2.5), the color's dot represents the day after treatment **(d)**. Dynamic of size, where the time to reduce to half of the maximum size are shown as a red dot, **(e)** and an example **(f)** since the appearance until disappearance of round structure, observed from 4 cells analyzed.

3.3 Impact of mitochondrial mass on the cell fitness

As fitness is a dynamic feature [22], we asked if cells could divide asymmetrically their mitochondrial content and have different fitness as a consequence. The partition of mitochondria was considered as asymmetric when the ratio between sisters was an outlier from population and represented 9.4% of the mitosis (Fig 3a and 3b). Additionally, we tracked the descendant of sister cells that had an asymmetry regarding the integrated density (Fig 3c). Cell with bigger integrated density had a higher fitness in control situation (Fig 3c and S4a), but fewer after treatment (Fig 3c). The tracking of single cell also revealed that the mitochondrial mass is dynamic (Fig 3c).

To further support these findings, we sorted cells with high and low mitochondrial mass (Fig 3d). Sorting of A172^{mitoGFP} cells indicated that cells with high mitochondrial content grew faster than low mitochondrial content cells in control conditions (Fig 3e). Interestingly, the fluorescent intensities were quickly restored, but the high fluorescent cells were faster in returning to the average fluorescent than the low fluorescent cells, in support of the faster growth rate of the high mito-GFP cells (Fig S4b, S4c and S4d). On the other hand, in the presence of TMZ, the cells with low mito-GFP exhibited a higher fitness (Fig 3f). Furthermore, sorted cells had no difference in cell size, indicating that the difference of fitness observed were a consequence of mitochondrial content and not cell size.

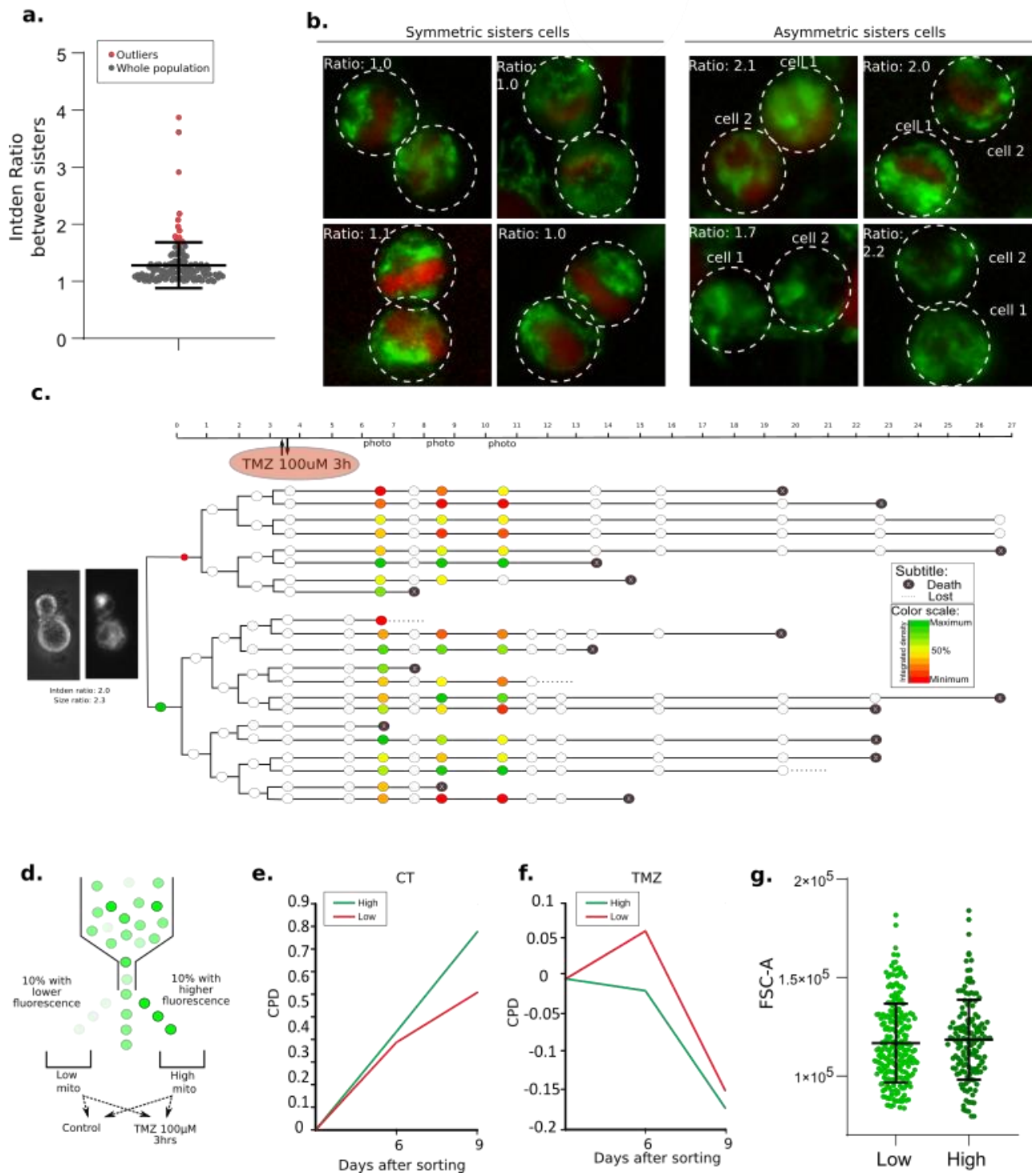


Figure 3. Partition of mitochondria between sister cells indicated by the ratio of integrated density (**a**) and examples of asymmetric partition of mitochondria (**b**). A genealogy generated from asymmetric sisters, cells were let to grow during three days under control condition, then treated with TMZ 100uM for 3 hours, the mitochondrial mass were analyzed 3, 5 and 7 days after treatment and are represented by colors, black circles represent cell death, and dots at the end of a branch represent lost cells (**c**). A172^{mitoGFP-H2B} were sorted between high and low green fluorescence (**d**) and let to grow in control condition (**e**) or treated with TMZ 100uM 3hrs (**f**), the cell number were evaluated at day 6 and 9 after sorting with microscopy. Cell size of high and low fluorescence population after sorting (**g**).

4. Discussion

The interference of mitochondrial content on fitness of cells in control condition reported here agrees with previous results, once it was observed that cells with higher mitochondrial content have higher transcription rate and lower length of cell cycle[23,24]. Cells with high mitochondria content also presented higher sensitivity to TRAIL, a treatment not used in patients[25].

Asymmetric mitosis contribute to resistance of bacteria [26] and glioma cells [27] through the asymmetric partition of efflux pump and surface receptors respectively. Besides that, it is possible that this phenomenon be related to the generation of tumoral heterogeneity [28], that is a major problem to be overcome in glioblastoma. Asymmetric partition of aged or dysfunctional mitochondria are related with phenotypic memory [29,30], and here we ask if asymmetric partition of mitochondrial content could interfere in cell fitness. We find that almost 10% of mitosis were asymmetric in integrated density, and the impact on the fitness were analyzed through manual tracking of asymmetric sisters and further through cell sorting of high and low fluorescent cells.

Even though the area of the cell is an important component in the integrated density calculation, we do not observed difference in cell size between high and low fluorescence sorted cells. This indicate that mitochondria have an impact on fitness independently of the cell size.

Additionally, our findings describe alterations in mitochondrial network including the appearance of round structures, which was never reported before, but why they are formed and its composition remained to be further explored. Taken together with the increase in mitochondrial mass, the results indicate that mitochondrial network play a role in the chronic answer to TMZ. If this knowledge could be applied to new therapeutic approaches remained an open question. It is possible that a pre-treatment that induces mitochondrial biogenesis could increase TMZ toxicity.

5. Conclusions

The results observed here demonstrate that mitochondria amount have a role in the fitness of glioma cells, and the asymmetric partition of the mitochondria contributes to the heterogeneity and therefore to tumor evolution. TMZ treatment induces chronic alterations in mitochondrial mass, we quote the amount and the appearance of round structures. The biological significance of such alterations remains to be further explored.

Acknowledgements

We wish to thank Charley Christian Staats for critical reading of the manuscript. pLYS1-FLAG-MitoGFP-HA (addgene #50057) was a gift from Vamsi Mootha, pLenti-H2B-mCherry (addgene #89766) was a gift from Torsten Wittmann and pCLBW-cox8-EGFP-mCherry (addgene #78520) was a gift from David Chan.

Funding sources:

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul FAPERGS (PqG 17/2551-0001020-5). L.S. Lenz, J.H. Buss and G. Lenz received Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq fellowships, D. T. de Lemos received FAPERGS fellowships.

References

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011; 144: 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Dong LF, Kovarova J, Bajzikova M, Bezawork-Geleta A, Svec D, Endaya B, Sachaphibulkij K, Coelho AR, Sebkova N, Ruzickova A, Tan AS, Kluckova K, Judasova K, et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *Elife*. 2017; 6: 1–22. doi: 10.7554/eLife.22187.
3. Yuan Y, Ju YS, Kim Y, Li J, Wang Y, Yoon CJ, Yang Y, Martincorena I, Creighton CJ, Weinstein JN, Xu Y, Han L, Kim HL, et al. Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nat Genet* [Internet]. Springer US; 2020; 52: 342–52. doi: 10.1038/s41588-019-0557-x.
4. Anderson GR, Wardell SE, Cakir M, Yip C, Ahn YR, Ali M, Yllanes AP, Chao CA, McDonnell DP, Wood KC. Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors. *Nat Commun* [Internet]. Springer US; 2018; 9. doi: 10.1038/s41467-018-04033-x.
5. McGuirk S, Audet-Delage Y, St-Pierre J. Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends in Cancer* [Internet]. Elsevier Inc.; 2020; 6: 49–61. doi: 10.1016/j.trecan.2019.11.009.
6. Poon MTC, Sudlow CLM, Figueroa JD, Brennan PM. Longer-term (≥ 2 years) survival in

patients with glioblastoma in population-based studies pre- and post-2005: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. Nature Publishing Group UK; 2020; 10: 1–10. doi: 10.1038/s41598-020-68011-4.

7. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, et al. Mutations in Gliomas. *N Engl J Med*. 2009; 360: 765–73.
8. Silva AO, Dalsin E, Onzi GR, Filippi-Chiela EC, Lenz G. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* [Internet]. Elsevier; 2016; 348: 177–83. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.09.014.
9. Filippi-chiela EC, Manssur M, Thomé P, Lenz G, Cremonese E, Manssur M, Filippi-chiela EC, Bueno M, Paulo M, Filippi-chiela EC, Manssur M, Thom MP. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. 2016; 8627. doi: 10.1080/15548627.2015.1009795.
10. Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, Darley-Usmar VM, Bailey SM, Gillespie GY, Landar A, Griguer CE. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* [Internet]. © 2010 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.; 2010; 285: 39759–67. doi: 10.1074/jbc.M110.147504.
11. Oliva CR, Moellering DR, Gillespie GY, Griguer CE. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. *PLoS One*. 2011; 6: 9–13. doi: 10.1371/journal.pone.0024665.
12. Xie Q, Wu Q, Horbinski CM, Flavahan WA, Yang K, Zhou W, Dombrowski SM, Huang Z, Fang X, Shi Y, Ferguson AN, Kashatus DF, Bao S, et al. Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. *Nat Neurosci*. Nature Publishing Group; 2015; 18: 501–10. doi: 10.1038/nn.3960.
13. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016; 27: 105–17. doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001.
14. Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovács-Bogdán E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science* (80-). 2013; 342: 1379–82. doi:

10.1126/science.1242993.

15. Pemble H, Kumar P, van Haren J, Wittmann T. GSK3-mediated CLASP2 phosphorylation modulates kinetochore dynamics. *J Cell Sci.* 2017; 130: 1404–12. doi: 10.1242/jcs.194662.
16. Rojansky R, Cha MY, Chan DC. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife.* 2016; 5: 1–18. doi: 10.7554/eLife.17896.
17. Oltersburg SB, Cordelières FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc.* 2006; 224: 213–32.
18. Onzi GR, Faccioni JL, Alvarado AG, Bracco PA, Kornblum HI, Lenz G. SCOUT: Single-cell outlier analysis in cancer. *bioRxiv.* 2020; : 2–6. doi: 10.1101/2020.03.25.007518.
19. De Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin JC. Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods.* 2012; 9: 690–6. doi: 10.1038/nmeth.2075.
20. Bueno e Silva MM. ALTERAÇÕES MITOCONDRIAIS E REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA APÓS TRATAMENTO COM TEMOZOLOMIDA [Internet]. 2016. Available from file:///Users/andreataquez/Downloads/guia-plan-de-mejora-institucional.pdf%0Ahttp://salud.tabasco.gob.mx/content/revista%0Ahttp://www.revistaalad.com/pdfs/Guias_ALAD_11_Nov_2013.pdf%0Ahttp://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v66n3.60060.%0Ahttp://www.cenetec.
21. Wheeler JR, Matheny T, Jain S, Abrisch R, Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife.* 2016; 5: 1–25. doi: 10.7554/eLife.18413.
22. Lenz LS, Faccioni JL, Bracco PA, Santos JAF, Pereira LC, Buss JH, Tamborindeguy MT, Torgo D, Monteiro T, Mantovani GB, Santo CN, Marcolin JC, Dalsin E, et al. Cancer Cell Fitness Is Dynamic. *Cancer Res.* 2021; 81: 1040–51. doi: 10.1158/0008-5472.can-20-2488.
23. Guantes R, Rastrojo A, Neves R, Lima A, Aguado B, Iborra FJ. Global variability in gene expression and alternative splicing is modulated by mitochondrial content. *Genome Res.* 2015; 25: 633–44. doi: 10.1101/gr.178426.114.
24. das Neves RP, Jones NS, Andreu L, Gupta R, Enver T, Iborra FJ. Connecting variability in global transcription rate to mitochondrial variability. *PLoS Biol.* 2010; 8. doi: 10.1371/journal.pbio.1000560.
25. Márquez-Jurado S, Díaz-Colunga J, Das Neves RP, Martínez-Lorente A, Almazán F, Guantes R, Iborra FJ. Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic

- gene expression. *Nat Commun* [Internet]. Springer US; 2018; 9. doi: 10.1038/s41467-017-02787-4.
26. Bergmiller T, Andersson AMC, Tomasek K, Balleza E, Kiviet DJ, Hauschild R, Tkačik G, Guet CC. Biased partitioning of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC underlies long-lived phenotypic heterogeneity. *Science* (80-). 2017; 356: 311–5. doi: 10.1126/science.aaf4762.
 27. Hitomi M, Chumakova AP, Silver DJ, Knudsen AM, Pontius WD, Murphy S, Anand N, Kristensen BW, Lathia JD. Asymmetric cell division promotes therapeutic resistance in glioblastoma stem cells. *JCI Insight*. 2021; 6. doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.130510.
 28. Fernandez-de-Cossio-Diaz J, Mulet R, Vazquez A. Cell population heterogeneity driven by stochastic partition and growth optimality. *Sci Rep*. 2019; 9: 1–17. doi: 10.1038/s41598-019-45882-w.
 29. Katajisto P, Döhla J, Chaffer CL, Pentimikko N, Marjanovic N, Iqbal S, Zoncu R, Chen W, Weinberg RA, Sabatini DM. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* (80-). 2015; 348: 340–3. doi: 10.1126/science.1260384.
 30. Hinge A, He J, Bartram J, Javier J, Xu J, Fjellman E, Sesaki H, Li T, Yu J, Wunderlich M, Mulloy J, Kofron M, Salomonis N, et al. Asymmetrically Segregated Mitochondria Provide Cellular Memory of Hematopoietic Stem Cell Replicative History and Drive HSC Attrition. *Cell Stem Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2020; 26: 420-430.e6. doi: 10.1016/j.stem.2020.01.016.

Supplementary figures

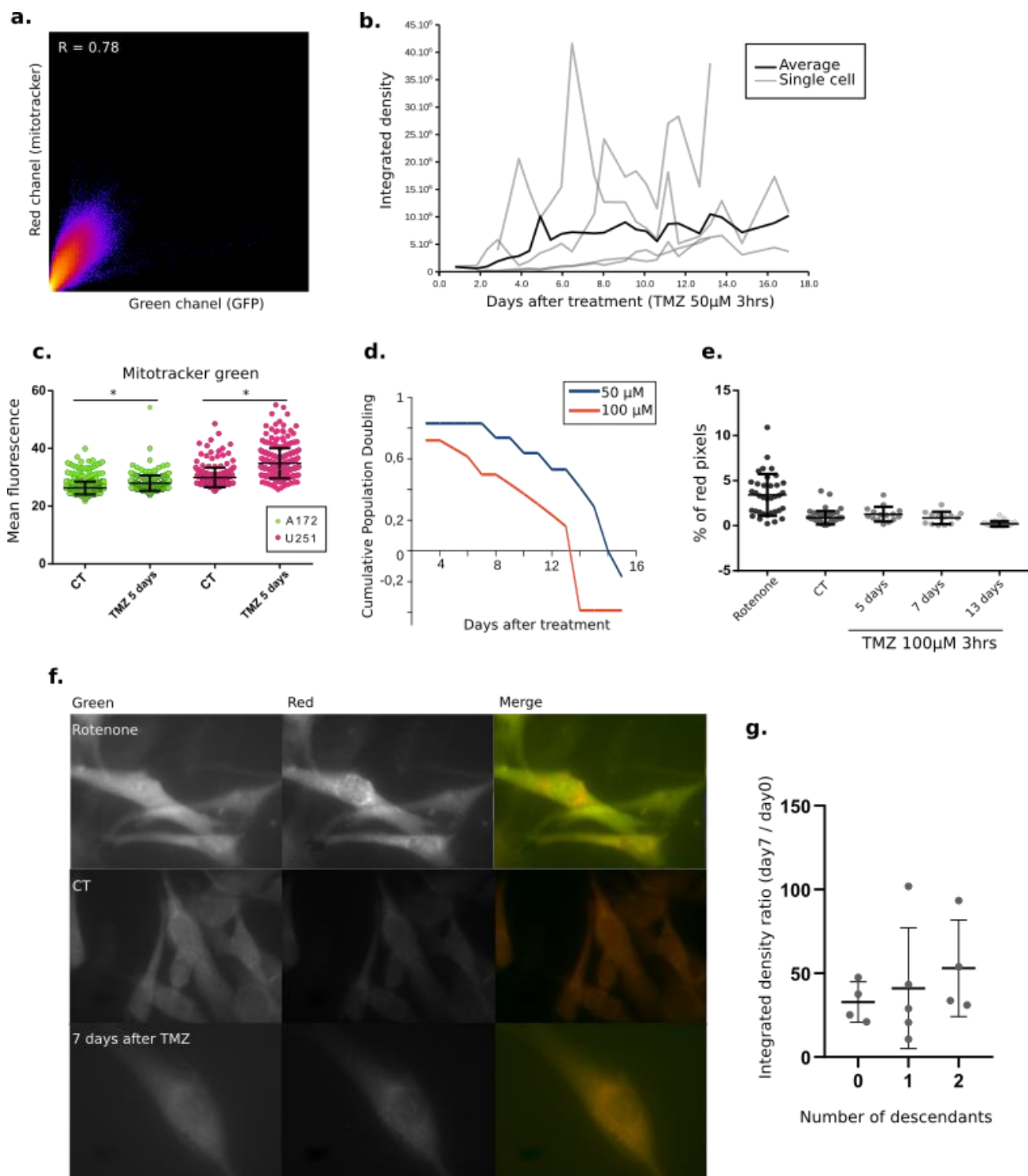


Figure S1. Correlation between green and red channel on the colocalization analysis of mitochondrial GFP and mitotracker red **(a)**. Average and single cells data of integrated density along time after treatment **(b)**. Mitochondrial mass of A172^{wt} and U251^{wt} measured with mitotracker green under control situation or after 5 days of drug removal (TMZ 100 μ M 3 hours) **(c)**. Cumulative population doubling of cells treated with TMZ 100 μ M or 50 μ M **(d)**. Levels of mitophagy **(e)** and images **(f)** of A172 cells transduced with mitophagy marker in positive control (rotenone), control condition and at the indicated days after treatment. **(g)** Ratio between integrated density of day 7 and 0 after TMZ 50 μ M 3hrs and the number of descendants after 15 days of treatment.

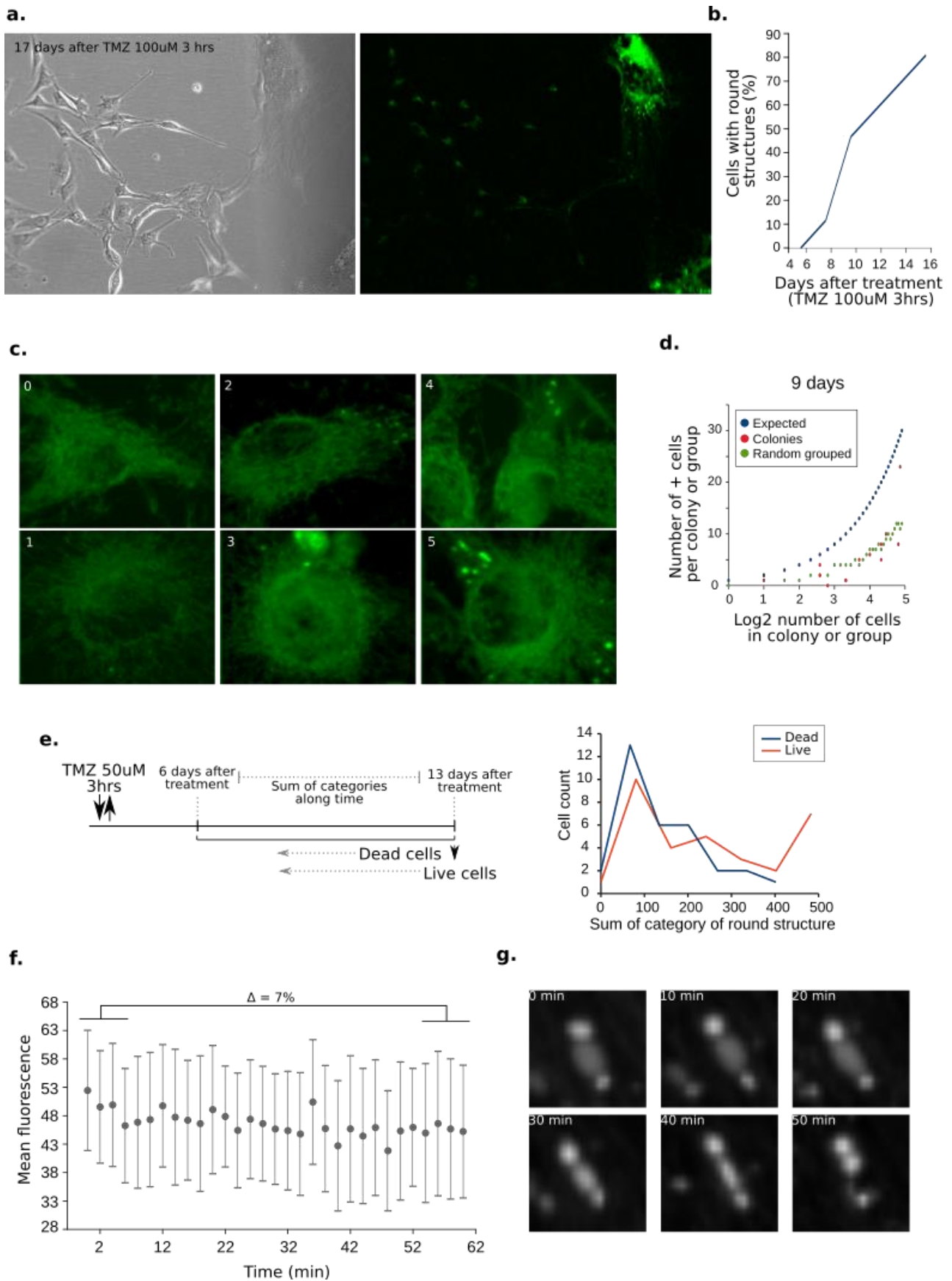


Figure S2. Morphology and mitochondrial network of A172^{mitoGFP+H2B} cells that restored proliferation after 17 days of treatment besides a cell that remained quiescent or senescent (**a**). Percentage of cells with round structures at indicated days after treatment (**b**). Example of cells with different amount of round structures categorizes as described in section

2.5 (c). Expected presence of cells with round structures according to the percentage observed in hole population at day 9 after treatment to groups of different sizes (blue dots), and the number of cells with round structures observed in colonies (red) or random grouped cells (green) with different sizes (d). The experiment design to track cells with round structures (left) and sum of categories of each cell from day 6 to 13 after treatment (right) (e). Mean green fluorescence of mitochondrial network during the 1 hour of acquisition with photos every 2 minutes (f). Absence of fusion and fission of round structures (g).

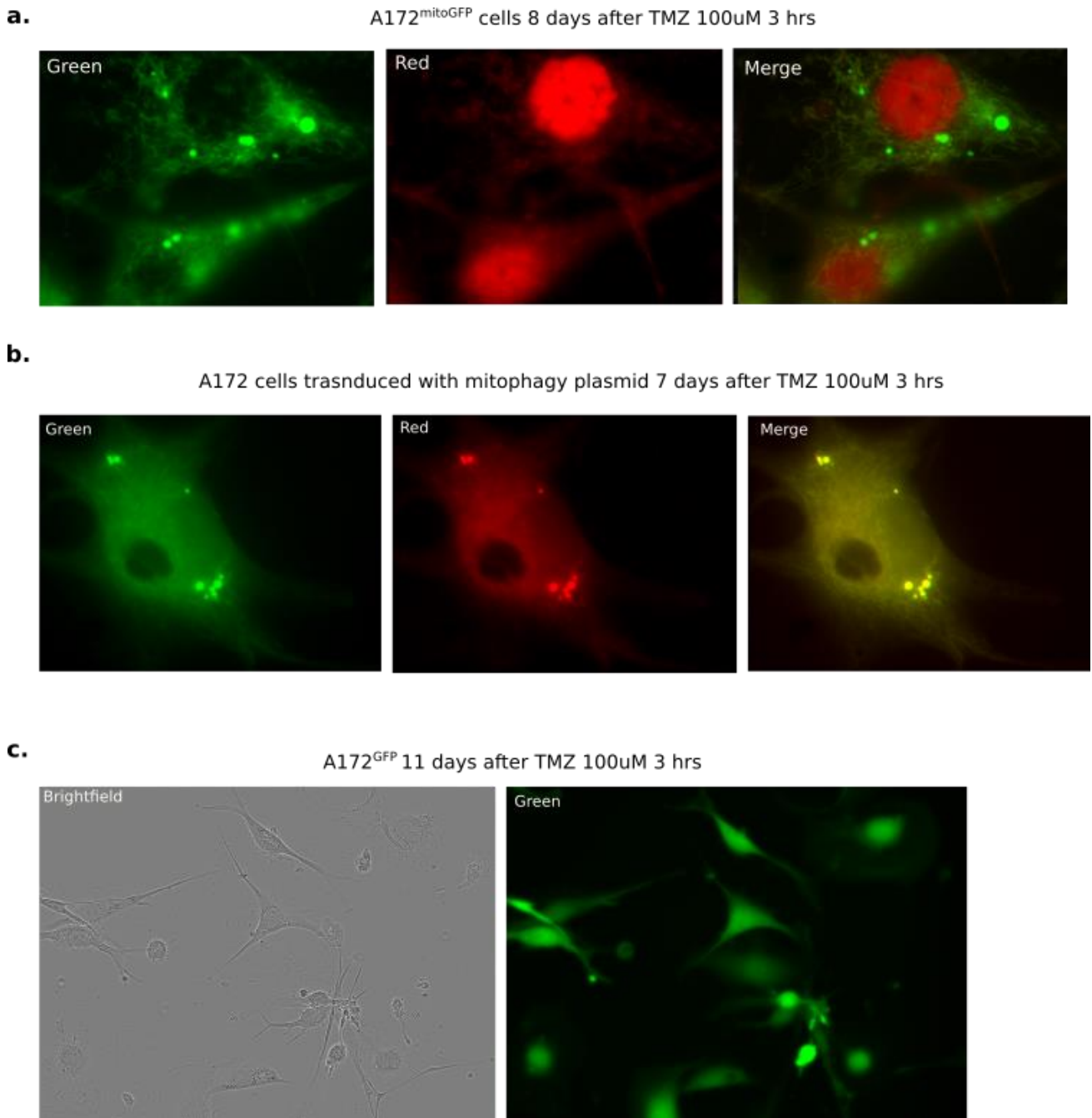


Figure S3. A172^{mitoGFP-H2B} stained with mitotracker red 8 days after treatment with TMZ (a). A172 cells transduced with the mitophagy reporter 7 days after treated with TMZ (b). A172^{GFP} control cells 11 days after treatment with TMZ (c).

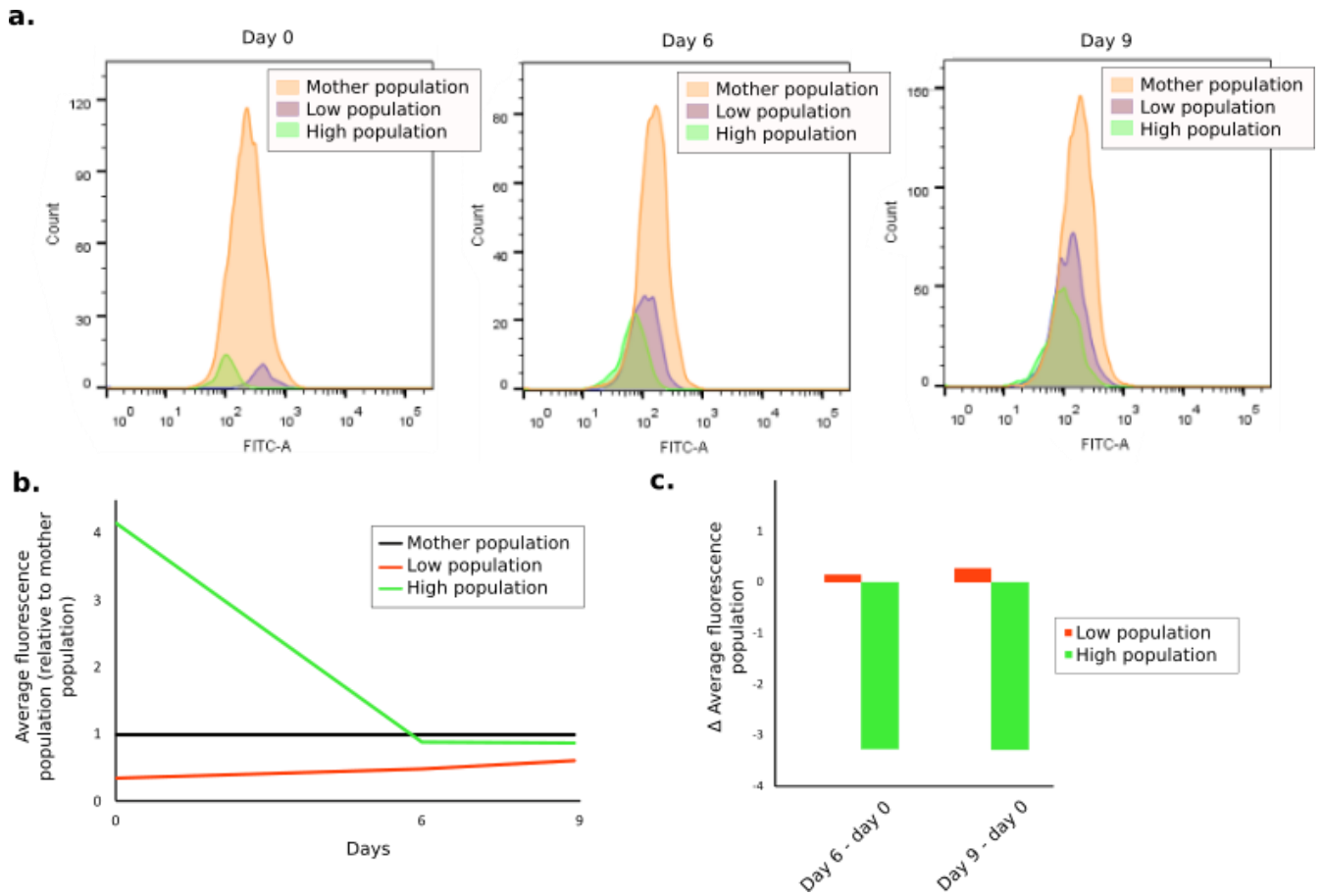


Figure S4. Green fluorescence of A172^{mitoGFP-H2B} on days 0, 6 and 9 after sorting of high and low fluorescence cells **(a)**. Green fluorescence average of A172^{mitoGFP-H2B} sorted between low green fluorescence (orange line) or high green fluorescence (green line) relative to not sorted (mother population, black line) in days 0, 6 and 9 after sorting **(b)**. Difference of green fluorescence average in each population (low – orange; high – green) at day 6 or 9 relative to day 0 **(c)**.

DISCUSSÕES INTEGRADAS

A presente tese teve como principal objetivo identificar fenótipos dinâmicos que contribuem para a tolerância de células tumorais e que levam a diferentes respostas mesmo em células geneticamente idênticas. No capítulo I, demonstramos que células irmãs já apresentam diferenças quanto à atividade de ERK e ao número de descendentes. Adicionalmente, no capítulo III nós demonstramos a ocorrência de partição assimétrica de mitocôndrias em 9,4% das mitoses, medida pela razão da densidade integrada, que leva em consideração o tamanho celular e a média de fluorescência. Assim as mitoses assimétricas contribuem para o aumento da heterogeneidade (HUH & PAULSSON 2011), que é um dos grandes desafios para o tratamento de gliomas.

As células com mais massa mitocondrial tiveram um *fitness* maior em relação às células com menos mitocôndrias em situação controle, e menor após o tratamento com TMZ, indicando que mitoses assimétricas podem ser um importante fator para o *fitness* de células tumorais e contribuir para a flutuação deste fenótipo. Embora a massa mitocondrial não tenha correlação com a funcionalidade mitocondrial (MIETTINEN & BJÖRKLUND 2016), resultados prévios indicam que após tratamento com TMZ as células adotam um metabolismo mais oxidativo ao invés de glicolítico (BUENO E SILVA, 2016, RABÉ *et al* 2020). Como já mencionado na discussão do manuscrito encontrado no capítulo III, esses resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram que células com mais mitocôndrias tem menor tamanho do ciclo celular (NEVES *et al* 2010), maiores taxas de transcrição (GUANTES *et al* 2015) e sensibilidade ao TRAIL (JURADO *et al* 2018). Isso sugere que além de contribuir para o *fitness* diferencial e a heterogeneidade da organela, a partição assimétrica de mitocôndrias deve contribuir indiretamente para a heterogeneidade entre células irmãs de processos como a síntese protéica e a dinâmica de proteínas pró e anti-apoptóticas. Mesmo que os resultados anteriores já sugeriam que células com mais mitocôndrias teriam *fitness* aumentado por ter um menor ciclo celular e maior

produção protéica, o acompanhamento de descendentes de irmãs assimétricas demonstrou que essa tendência gera um impacto que vai além da primeira geração (tempo de ciclo das células irmãs).

Os motivos que levaram à maior sensibilidade de células com mais mitocôndrias podem ser variados. A abundância de proteínas pró-apoptóticas, que se correlaciona com a massa mitocondrial, é responsável pela maior sensibilidade ao TRAIL (JURADO *et al* 2018), e pode ser importante na resposta à TMZ. É possível que as ROS também tenham um papel na toxicidade, uma vez que elas estão relacionadas com a massa mitocondrial (BUENO E SILVA, 2016). O menor tempo de ciclo em células com mais mitocôndrias (NEVES *et al* 2010) também indica menor presença de células de proliferação lenta, que estão descritas como sendo mais resistentes à quimioterapia (HOANG-MINH *et al* 2018). Entretanto, todas essas possibilidades devem ser testadas futuramente. Adicionalmente, a linhagem A172 não expressa a proteína MGMT (CHAHAL *et al* 2012) e é considerada sensível à TMZ. Avaliar a resposta mitocondrial em outras linhagens com estado do MGMT diferente é importante e deve apresentar resultados distintos, uma vez que este é o principal mecanismo de resistência descrito para a TMZ (ESTELLER *et al* 2000).

Embora nós tenhamos observado que células com maior massa mitocondrial tem mais sensibilidade, nós não observamos relação entre o delta da massa mitocondrial antes e após TMZ com a sensibilidade ao tratamento. Esse resultado foi surpreendente, uma vez que esperávamos que o aumento nas mitocôndrias poderia ser um mecanismo induzido para adaptação ao tratamento. Outra surpresa foi que a presença das estruturas redondas e sua dinâmica também não tiveram relação com o *fitness* (dados não mostrados). Estas questões merecem ser revistas, uma vez que nestes experimentos não apareceram subpopulações que retomaram o crescimento (CPD Fig S1d) como observado em estudos prévios (SILVA *et al* 2016). Isso pode ter sido decorrência de toxicidade provocada pela sequência de fotos, já que proteínas fluorescentes produzem ROS quando absorvem luz (ONUKWUFOR *et al* 2020). Fotos mais espaçadas podem resolver essa questão, porém se tornam um desafio para o acompanhamento de células únicas. Sobre a identidade das estruturas redondas,

nossos dados indicam que elas são mitocôndrias disfuncionais, uma vez que elas são formadas nos dois marcadores mitocondriais transduzidos (MCU-GFP e Cox8-EGFP-mCherry) mas não são coradas pelo mitotracker. Entretanto, esses resultados devem ser futuramente comprovados por imunocitoquímica com anticorpos contra proteínas mitocondriais.

Recentemente foi descrito que células de glioma apresentam um estado de transição entre sensível e resistente à TMZ com aumento na atividade mitocondrial, mas que essa característica é revertida nas células resistentes (RABÉ et al 2020). Entretanto, os autores não consideraram que a população de células consideradas transitórias poderiam ter sofrido uma seleção negativa. Dados de acompanhamento de células únicas poderiam responder essa questão. Nesta tese, esta questão não foi respondida porque as células acompanhadas não apresentaram a retomada do crescimento, embora nós observamos que células de outros campos que não foram fotografados e que retomaram o crescimento apresentavam tamanho e massa mitocondrial iguais às células não tratadas. Por outro lado, OLIVA *et al*/2011 mostraram resultados contraditórios, em que as células resistentes a TMZ tinham maior metabolismo mitocondrial. Essas diferenças podem ser consequência dos diferentes tempos e concentrações da droga utilizada: enquanto o primeiro estudo e os resultados apresentados nesta tese eram com 50 a 100 μ M por não mais do que 15 dias, o estudo dos demais eram com aumentos progressivos na concentração de TMZ por 6 meses, até atingir 1mM. Em resumo, nós demonstramos que a população e células únicas aumentam a fluorescência mitocondrial, o que pode ocorrer através da inibição da mitofagia e / ou aumento da biogênese. Porém não sabemos se as células que retomam o crescimento tem massa mitocondrial menor porque passaram por um processo de alterações metabólicas como uma forma de tolerância e tiveram o fenótipo revertido, ou se elas tiveram uma vantagem seletiva em relação às células que tiveram aumento da massa mitocondrial.

O esclarecimento do ponto acima é importante porque caso as alterações na rede mitocondrial e metabolismo sejam uma adaptação, este mecanismo refletiria uma indução lamarckista, e um co-tratamento com um bloqueador dessa dinâmica poderia

prevenir o surgimento das células resistentes. Embora nós tenhamos feito tentativas de responder essa questão com o uso de metformina (uma droga utilizada no tratamento de diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019) que bloqueia o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (OWEN *et al* 2000, WHEATON *et al* 2014)), na presente tese não foi possível apresentar dados para responder essa questão devido à pandemia. Alguns estudos já indicam o co-tratamento de metformina e TMZ (SESEN *et al* 2015, YU *et al* 2016, VALTORTA *et al* 2017), porém nenhum deles usou a droga em uma concentração similar à encontrada no sangue de pacientes (LALAU *et al* 2011).

Outra possibilidade seria bloquear a biogênese mitocondrial ou aumentar a mitofagia. Nossos resultados não mostraram alterações na mitofagia, indicando que o aumento na massa mitocondrial se dá pela biogênese. Embora a metodologia utilizada para medir a mitofagia é pouco sensível, se tivéssemos observado a redução da mitofagia este resultado seria surpreendente já que a TMZ provoca aumento da autofagia (FILIPPI-CHIELA *et al* 2015). Essa conclusão leva à inferência de que o aumento na massa mitocondrial seria decorrência do aumento na biogênese. Embora resultados prévios do nosso laboratório não tenham identificado aumento da expressão de PGC-1 α (BUENO E SILVA, 2016), PGC-1 β e PCR podem estar envolvidos (SCARPULLA 2008).

Uma terceira possibilidade terapêutica seria o emprego da metodologia conhecida como armadilha evolutiva. Nesse caso são feito dois tratamentos sequenciais com drogas diferentes, sendo que a primeira favorece células com um fenótipo específico, aumentando sua presença na população, e a segunda droga tem como alvo este mesmo fenótipo (CHEN *et al* 2014, LIN *et al* 2020). É provável que esse conceito se aplique tanto a um fenótipo selecionado quando a um fenótipo induzido. Como vimos que células com mais mitocôndrias tem maior sensibilidade, é possível que um tratamento prévio que mate células com poucas mitocôndrias, ou que induza o aumento da massa mitocondrial possa aumentar a citotoxicidade da TMZ. Essa hipótese pode ser testada forçando as células a adotarem um metabolismo

oxidativo previamente a TMZ, por substituição da glicose do meio de cultura por glutamina.

As mitocôndrias possivelmente estão relacionadas à flutuação do *fitness*, descrita no capítulo I, em especial porque, como já dito, elas são organelas extremamente dinâmicas e passam por partição assimétrica na mitose. Nós demonstramos que a flutuação no *fitness* é um fenômeno que ocorre tanto em células tumorais quanto em células não transformadas (fibroblastos). De fato, tanto células tumorais quanto normais tem genes com expressão clonal (herdável) e outros não (MEIR *et al* 2020). Um fato que deve ser levando em consideração é que o estudo do capítulo I foi feito com células isogênicas, em um modelo 2D com condições controladas e estáveis, diferente do que é encontrado em um organismo vivo, em que as células estão inseridas em um ambiente 3D altamente dinâmico. Como o microambiente tem um grande impacto sobre as células tumorais (QUAIL & JOYCE 2013), é esperado que a instabilidade fenotípica *in vivo*, pelo menos em células tumorais, seja ainda maior do que o reportado aqui.

As células saudáveis de organismos eucarióticos adotam estratégias para manter fenótipos e portanto reduzir a instabilidade, entre eles estão o controle epigenético (ALLIS & JENUWEIN 2016) e multi regiões regulatórias para a expressão de um gene (o número médio para organismos pluricelulares é seis), que reduz a probabilidade de ativação indevida (NELSON & COX, 2014). Adicionalmente, quanto maior a expressão de um gene menor o ruído sobre essa transcrição (ELOWITZ *et al* 2002), e provavelmente menor sua instabilidade. A remoção dessas barreiras de controle aumentariam a instabilidade fenotípica, já que os sistemas tendem a desordem, e impossibilitariam a vida. Por outro lado, a instabilidade fenotípica abre espaço para a evolução. De fato a plasticidade fenotípica está relacionada a resistência em situações adversas em diferentes classes de organismos (HORVATH JR *et al* 2011, RICHTER *et al* 2012, YU *et al* 2017, HORN *et al* 2020).

Embora nós tenhamos demonstrado mecanismos dinâmicos que estão envolvidos com a flutuação no *fitness* (atividade de ERK, dessincronização de ciclo celular, dano ao DNA), o impacto de cada um é uma questão difícil de ser respondida

e tema para muitas pesquisas futuras. O que já sabemos, é que existem tantos genes que apresentam herdabilidade quanto os que não apresentam (MEIR *et al* 2020, SHAFFER *et al* 2020), e genes que apresentam grande correlação entre irmãos perdem a memória transcricional depois de 17 gerações (PHILLIPS *et al* 2019). A origem da oscilação nas taxas de transcrição e demais fenótipos também merece atenção, e envolvem diversos processos tais como os citados no capítulo II.

A descrição da dinâmica fenotípica só é possível graças às análises em células únicas. No câncer, células únicas são centrais para a progressão da doença, uma vez que a origem tanto do tumor primário quanto de metastases é clonal (NOWEL 1976, TALMADGE *et al* 1982). Portanto, a investigação de efeitos nas células únicas deveria ser a preocupação central nos estudos sobre essa doença. Embora a metodologia de células únicas mais utilizada seja o sequenciamento de RNA e, e este permitiu grandes avanços como a identificação de subpopulações fenotípicas distintas em um único tumor (PATEL *et al* 2014), ele não permite a avaliação da dinâmica celular por não utilizar células vivas. Nesta tese foram estabelecidas marcações fluorescentes celulares que possibilitaram avaliar em células únicas fenótipos como a progressão do ciclo celular e a massa/morfologia mitocôndrial. Através da marcação do locus endógeno do gene que codifica para a proteína Ki67 por CRISPR, e ao lado de células transduzidas com o indicador de ciclo celular FUCCI, nós demonstramos que células clonais perdem a sincronização do ciclo celular pela metade em menos de 4 gerações. Esse achado é importante pois diversos fenótipos celulares variam de acordo com o ciclo celular, entre eles a morfologia mitocôndrial (KASHATUS *et al* 2011), e por isso é esperado que a simples dessincronização de células clonais pode contribuir para a morte fracionada em células geneticamente idênticas.

A instabilidade fenotípica no fitness observada quando as células foram tratadas representa um desafio para a terapia alvo-específica. Um exemplo disso é a resposta de tumores com BRAFV600E ao vemurafenibe, que tem como alvo-específico a proteína mutada. Esta via promove o crescimento celular, e ao ser tratada com vemurafenibe é inibida. Porém a via não é uma estrutura estática, e ao ser inibida ela se remodela e os mecanismos de retroalimentação negativa também são reduzidos.

Isso torna a via mais sensível a ativação e pode resultar em crescimento celular. (LITO *et al* 2012, GEROSA *et al* 2019). Se a flutuação fenotípica pode ser modelada é uma questão ainda a ser explorada, entretanto nossos resultados sugerem que sim.

Por fim, ainda sobre o capítulo I dessa tese, nós descrevemos uma nova metodologia para quantificar a dinâmica do *fitness* celular, a qual tem como grande vantagem o baixo custo de aplicação, o que a torna de fácil acesso mesmo para laboratórios pequenos e de baixo orçamento, como é o caso de muitos laboratórios de pesquisa brasileiros. Embora o racional por trás da metodologia possa ser aplicado também para outros fenótipos, a avaliação da dinâmica do *fitness* em células únicas é inovadora, uma vez que ao alcance do nosso conhecimento não havia outra metodologia que permitisse tal avaliação.

A visualização do câncer como uma doença dinâmica, em que células únicas são capazes de alterações fenotípicas e mesmo de adaptação é essencial para a melhora dos tratamentos disponíveis. Na presente tese foi demonstrado que células clonais apresentam flutuações fenotípicas, que comprovamos serem adicionadas pela mitose, através da partição assimétrica de mitocôndrias, mas também devem ter o tempo como um fator importante. Eventos de baixa frequência podem ter um impacto significativo em uma doença que é dirigida por alterações em células únicas, como o câncer. Nesse caso, a partição assimétrica de mitocôndrias, a qual ocorre em 9,4% das mitoses, representa $9,4 \cdot 10^7$ células para um tumor com 1cm^3 (DEL MONTE 2009). Ou seja, a partição assimétrica de mitocôndrias, uma vez que altera a probabilidade de morte por TMZ, representa $9,4 \cdot 10^7$ chances de surgimento da tolerância e consequente resistência. Estas descobertas representam desafios para as terapias atuais, incluindo as terapias alvo-específicas, e deverão ser levadas em conta para as estratégias terapêuticas que serão desenvolvidas futuramente.

CONCLUSÕES

Os principais achados da presente tese foram os seguintes:

- Células clonais apresentam instabilidade no *fitness*, e esta não é uma característica exclusiva de células tumorais;
- Células irmãs apresentam variabilidade quanto a dinâmica de ERK e *fitness*;
- Células em colônias tem uma redução pela metade na sincronia do ciclo celular em apenas 4 gerações, e são variadas em relação ao dano no DNA;
- O *fitness* também flutua entre gerações quando as células são tratadas, de uma maneira tratamento-específica, e o tratamento com moduladores epigenéticos reduz essa flutuação, reduzindo o fenômeno de morte fractional;
- O tratamento com TMZ induz alterações na massa mitocondrial;
- Células com mais mitocôndrias tem *fitness* maior em situação controle e menor em situação tratada em relação às células com menos mitocôndrias;
- Partição assimétrica de mitocôndrias acontecem em 9,4% das mitoses, e contribuem para a heterogenidade, *fitness* diferencial e flutuação fenotípica clonal.

A flutuação do *fitness* reportada é importante para a biologia tumoral uma vez que esta é a característica que irá determinar se o câncer irá progredir ou regredir. A flutuação fenotípica demonstra que processos não hereditários contribuem para a tolerância e resistência. Assim, os resultados reafirmam que a evolução darwiniana, embora muito importante, não é suficiente para explicar o processo de resistência tumoral. Como perspectiva futura são apresentados os tópicos abaixo:

- Investigação de outros processos responsáveis pela flutuação do *fitness*;
- Se processos do modelo lamarckista (indução e fixação de fenótipos) contribuem para a variabilidade clonal e o surgimento da tolerância;
- Identificar qual mecanismo leva às alterações na massa mitocondrial observados e promovem a partição assimétrica mitocondrial;

- Testar as hipóteses, formuladas a partir do que foi observado em relação às mitocôndrias, para aumento da citotoxicidade da TMZ: bloquear a dinâmica de aumento da massa mitocôndrial por (1) bloqueadores da função mitocôndrial, ou (2) por modulação da biogênese e mitofagia; (3) aumentar a massa mitocôndrial previamente à TMZ.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ-ARENAS, A. *et al.* Interplay of Darwinian Selection, Lamarckian Induction and Microvesicle Transfer on Drug Resistance in Cancer. *Scientific Reports* 9: p.1-13 (2019).

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 42(1): p. 90-102 (2019).

ANDERSON, G. R. *et al.* Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors. *Nature Communications* 9: p. 1-13 (2018).

ANDERSON, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: p. 457-465 (1981).

ARORA, M. *et al.* Endogenous Replication Stress in Mother Cells Leads to Quiescence of Daughter Cells. *Cell Reports* 19: p. 1351-1364(2017).

ARYAMAN, J. *et al.* Mitochondrial Heterogeneity. *Front Genet* 9: p.1-16 (2019).

ASGHAR, U. S. *et al.* Single-Cell Dynamics Determines Response to CDK4/6 Inhibition in Triple-Negative Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 23(18): p. 5561-5572 (2017).

BALABAN, N. Q. *et al.* Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology* 17: p. 441-448 (2019).

BARR, A. R. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nature Communications* 8: p. 14728-14745 (2017).

BARRANGOU, R. *et al.* (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315: p. 1709-1712.

BASS, J. & LAZAR, M. A. Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* 5: p. 994-999 (2016).

BATCHELOR, E. *et al.* Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Molecular Systems Biology* 7: p. 488-496 (2011).

BEBAWY, M. *et al.* Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia* 23: p. 1643–1649 (2009).

BERG, O. G. & KURLAND, C. G. Why Mitochondrial Genes are Most Often Found in Nuclei. *Molecular Biology and Evolution* 17: p. 951–961 (2000).

BERGMILLER, T. *et al.* Biased partitioning of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC underlies long-lived phenotypic heterogeneity. *Science* 356: p. 311-315 (2017).

BOCK, F. J. & TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21: p. 85-100 (2019).

BONASIO, R. *et al.* Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* 330: p. 612-616 (2010).

BRASTIANOS, P. K. *et al.* Genomic Characterization of Brain Metastases Reveals Branched Evolution and Potential Therapeutic Targets. *Cancer Discovery* 5(11): p. 1164–1177 (2015).

BRINKER, A. E. *et al.* Mitochondrial Haplotype Alters Mammary Cancer Tumorigenicity and Metastasis in an Oncogenic Driver–Dependent Manner. *Cancer Research* p. 6941-6949 (2017).

BUENO E SILVA, M. M. Alterações mitocondriais e reprogramação metabólica em células de glioblastoma após tratamento com temozolomide. Dissertação de mestrado (2016).

CAMPBELL, S. L. & WELLEN, K. E. Metabolic Signaling to the Nucleus in Cancer. *Molecular Cell* 71: p. 398-408 (2018).

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455: p. 1061–1068 (2008).

CARA, S. & TANNOCK, I. F. Retreatment of patients with the same chemotherapy: Implications for clinical mechanisms of drug resistance. *Annals of Oncology* 12: p. 23-27 (2001).

CARLTON, J. G. *et al* Membrane and organelle dynamics during cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21: p. 151–166 (2020).

CHAHAL, M. *et al.* O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase Is a Novel Negative Effector of Invasion in Glioblastoma Multiforme. *Mol Cancer Ther* 11(11): p. 2440–2450 (2012).

CHEN, B. *et al.* Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell* 155: p. 1479–1491(2013).

CHEN, G. *et al.* Targeting the Adaptability of Heterogeneous Aneuploids. *Cell* 160: p. 771–784 (2014).

CHEONG, J. *et al.* Dual Inhibition of Tumor Energy Pathway by 2-Deoxyglucose and Metformin Is Effective against a Broad Spectrum of Preclinical Cancer Models. *Mol Cancer Ther* 10(12): p. 2350-2362 (2011).

CHO, S. W. *et al.* Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology* 31: p. 230–232 (2013).

CHUNG, J. *et al.* Phosphorylation-Induced Motor Shedding Is Required at Mitosis for Proper Distribution and Passive Inheritance of Mitochondria. *Cell Reports* 16:2142–2155 (2016).

COURTNEY, K. D. *et al.* Isotope Tracing of Human Clear Cell Renal Cell Carcinomas Demonstrates Suppressed Glucose Oxidation In Vivo. *Cell Metabolism* 28(5): p. 793-800 (2018).

DAR, R. D. *et al.* Screening for noise in gene expression identifies drug synergies. *Science* 344(6190): p. 1392-1396(2014).

DAVIDSON, S. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing Reveals a Dynamic Stromal Niche That Supports Tumor Growth. *Cell Reports* 31: p. 1-18 (2020).

DEL MONTE U. Does the cell number 10⁹ still really fit one gram of tumor tissue? *Cell Cycle*, 8: p. 505–506 (2009).

DENNY, B. J. *et al.* NMR and Molecular Modeling Investigation of the Mechanism of Activation of the Antitumor Drug Temozolomide and Its Interaction with DNA. *Biochemistry* 33: p. 9045-9051 (1994).

DONG, L. F. *et al.* Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *eLife* 6: p. 1-22 (2017).

DRUKER, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 344: p. 1031-1037 (2001).

EBINGER, S. *et al.* Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cell* 30: p. 849-862 (2016).

ELOWITZ, M. B. *et al.* Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science* 297: p. 1183-1186 (2002).

ESTELLER, M. *et al.* Inactivation of the DNA-repair gene MDM1 and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine* 343(19): p. 1350-1354 (2000).

EVAN, G. I. *et al.* Induction of Apoptosis in Fibroblasts by c-myc Protein. *Cell* 69: p. 119-128 (1992).

FALLAHI-SICHANI, M. *et al.* Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Molecular Systems Biology* 13: p. 905-929 (2017).

FALKENBERG, M. *et al.* Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature Genetics* 31: p. 289-264 (2002).

FILIPPI-CHIELA, E. C. *et al.* Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. *Autophagy* 11: p.1099-1113 (2015).

FORET, S. *et al.* DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees. *PNAS* 109(13): p. 4968–4973(2012).

FUENTEALBA, L. C. *et al.* Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *PNAS* 105(22): p. 7732-7737 (2008).

GASCOIGNE, K. E., TAYLOR, S. S. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer cell* 14:111-122 (2008).

GAO, R. *et al.* Nanogrid single-nucleus RNA sequencing reveals phenotypic diversity in breast cancer. *Nature Communications* 228 (2017).

GEROSA, L. *et al.* Sporadic ERK pulses drive non-genetic resistance in drug-adapted BRAF V600E melanoma cells. *BioRxiv* (2019).

GIACOMELLO, M. *et al.* The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature* 21: p. 204-224(2020).

GILLIES, R. J. *et al.* Causes and Effects of Heterogeneous Perfusion in Tumors. *Neoplasia* 1: p. 197-207 (1999).

GOMES, L. C. *et al.* During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature Cell Biology* 13(5): p. 589-598 (2011).

GORRE, M. E. & SAWYERS, C. L. Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology* 9: p. 303–307 (2002).

GOTTLIEB, R. A. & STOTLAND, A. MitoTimer: a novel protein for monitoring mitochondrial turnover in the heart. *J Mol Med* 93: p. 271–27 (2015).

GUANTES, R. *et al.* Global variability in gene expression and alternative splicing is modulated by mitochondrial content. *Genome Research* 25: p. 633–644 (2015).

GUICHET, P. O. *et al.* Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. *Plos one* p. 1-13 (2016).

GUILBERT, *et al.* Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. *Cell* 155: p. 1479-1491 (2013).

GRANADA, A. E. *et al.* The effects of proliferation status and cell cycle phase on the responses of single cells to chemotherapy. *Molecular Biology of the Cell* 31:845-857 (2020).

GUPTA, P. B. *et al.* Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell* 146: p. 633-644 (2011).

HAFNER, A. *et al.* p53 pulses lead to distinct patterns of gene expression albeit similar DNA-binding dynamics. *Nature Structural e Molecular Biology* 24: p. 840-849 (2017).

HALBROOK C J *et al.* Clonal Heterogeneity Supports Mitochondrial Metabolism in Pancreatic Cancer. *BioRxiv* (2020).

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: p. 646-674 (2011).

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: p. 57-70 (2000).

HARDEE, M. E. *et al.* Novel Imaging Provides New Insights into Mechanisms of Oxygen Transport in Tumors. *Current Molecular Medicine* 9: p. 435-441 (2009).

HATA, A. N. *et al.* Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. *Nature medicine* 22(3): p. 262-269 (2016).

HENSLEY, C. T. *et al.* Metabolic Heterogeneity in Human Lung Tumors. *Cell* 164: p. 681–694 (2016).

HEIDEN, M. G. V. *et al.* Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324: p. 1029-1033 (2009).

HILLE, F *et al* (2018) The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell* 172: p. 1239-1259.

HINGE, A. *et al*. Asymmetrically Segregated Mitochondria Provide Cellular Memory of Hematopoietic Stem Cell Replicative History and Drive HSC Attrition. *Cell Stem Cell* 26: p. 420–430 (2020).

HINOHARA, K. *et al*. KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance. *Cancer Cell* 34: p. 939-953 (2018).

HITOMI, M. *et al*. Asymmetric Division Promotes Therapeutic Resistance in Glioblastoma Stem Cells. *JCI Insight* 6(3): p. 1-16 (2021).

HOANG-MINH, L. B. *et al*. Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. *The EMBO Journal* 37: p. 1-21 (2018).

HORN, L. A. *et al*. Tumor Plasticity and Resistance to Immunotherapy. *Trends in cancer* 6(5): p. 432-441 (2020).

HORVATH JR, D. J. *et al*. Morphological plasticity promotes resistance to phagocyte killing of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbes and Infection* 13(5): p. 426-437 (2011).

HORVATH, S. E. & DAUM, G. Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52(4): p. 590-614 (2013).

HUANG, S. The molecular and mathematical basis of Waddington's epigenetic landscape: A framework for post-Darwinian biology? *Bioessays* 34: p. 149–157 (2011).

HUFF, L. M. *et al*. Characterization of Gene Rearrangements Leading to Activation of MDR-1. *Journal of biological chemistry* 281(48): p. 36501-36509 (2006).

HUH, D. & PAULSSON, J. Random partitioning of molecules at cell division. *PNAS* 108(36): p.15004-15009 (2011).

HSU, P. D. & ZHANG, F. (2012) Dissecting Neural Function Using Targeted Genome Engineering Technologies. *ACS Chem. Neurosci.* 3: p. 603–610.

HSU, C. H. *et al*. Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell* 178:361-373 (2019).

IWATA, R. *et al*. (2020) Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science* 369: p. 858–862.

ICHIM, G. *et al.* (2015) Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. *Molecular Cell* 57: p. 860–872.

INDE, Z. *et al.* Kinetic Heterogeneity of Cancer Cell Fractional Killing. *Cell Reports* 32(1):107845-107865 (2020).

JACOBSON, M. D. Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell* 88: p. 347–354 (1997).

JAVID, B. *et al.* Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *PNAS* 111(3): p. 1132-1137 (2014).

JENKINS R. B. *et al.* A t(1;19)(q10;p10) Mediates the Combined Deletions of 1p and 19q and Predicts a Better Prognosis of Patients with Oligodendroglioma. *Cancer Research* 66(20): p. 9852-9861 (2006).

JINEK, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: p. 816–821 (2012).

KANDOTH, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502:333-339 (2013).

KANUNGO, S. *et al.* Mitochondrial disorders. *Ann Transl Med* 6(24): p. 475-492 (2018).

KATAJISTO, P. *et al.* Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science* 348(6232): p. 340–343 (2015).

KASHATUS, D. F. *et al.* RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nature Cell Biology* 13: p. 1108–1115 (2011).

KELLY, D. P. & SCARPULLA, C. S. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & Development* 18: p. 357–368 (2004).

KIM, C. *et al.* Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing. *Cell* 173: p. 879–893 (2018).

KOMOR, A. C. *et al.* Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533:420–424 (2016).

KUCHEN, E. E. *et al.* Hidden long-range memories of growth and cycle speed correlate cell cycles in lineage trees. *Elife* (2020).

LALAU, J. *et al.* Establishment of a Database of Metformin Plasma Concentrations and Erythrocyte Levels in Normal and Emergency Situations. *Clin Drug Investig* 31(6): p. 435-438 (2011).

LANDRY, B. D. *et al.* Tumor-stroma interactions differentially alter drug sensitivity based on the origin of stromal cells. *Molecular Systems Biology* 14:1-15 (2018).

LANE, N. How energy flow shapes cell evolution. *Current Biology* 30: p. R451-R520 (2020).

LÅNG, E. *et al.* Coordinated collective migration and asymmetric cell division in confluent human keratinocytes without wounding. *Nature communications* 9: p. 3665-3680 (2018).

LEBLEU, V. S. *et al.* PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology* 16(10): p. 992-1005 (2014).

LEE, M. J. *et al.* Sequential Application of Anticancer Drugs Enhances Cell Death by Rewiring Apoptotic Signaling Networks. *Cell* 149:780-794 (2012).

LIESA, M. & SHIRIHA, O. S. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metabolism* 17: p. 491-506 (2013).

LITO, P. *et al.* Relief of Profound Feedback Inhibition of Mitogenic Signaling by RAF Inhibitors Attenuates Their Activity in BRAFV600E Melanomas. *Cancer Cell* 22: p. 668-682 (2012).

LIN, K. H. *et al.* Using antagonistic pleiotropy to design a chemotherapy-induced evolutionary trap to target drug resistance in cancer. *Nature Genetics* 52: p. 408-417 (2020).

LIU, Y. *et al.* Mitotic polarization of transcription factors during asymmetric division establishes fate of forming cancer cells. *Nature Communications* 9: p. 2424-2438 (2018).

MACHEDA, M. L. *et al.* Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol* 202: p. 654-662 (2005).

MÁRQUEZ-JURADO, S. *et al.* Mitochondrial levels determine variability in cell death by modulating apoptotic gene expression. *Nature Communications* 9: p. 1-11 (2018).

MARUYAMA, T. *et al.* Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology* 33: p. 538-542 (2015).

MATTENBERGER, Y. *et al.* (2003) Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Letters* 538: p. 53-59.

MCGRANAHAN, N. & SWANTON, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* 168: p. 613-628 (2017).

MCGUIRK, S. *et al.* Metabolic Fitness and Plasticity in Cancer Progression. *Trends in cancer* (6): p. 49-61 (2020).

MEIR, Z. *et al.* Single-cell analysis of clonal maintenance of transcriptional and epigenetic states in cancer cells. *Nature genetics* 52: p. 709-718 (2020).

MIETTINEN, T. P. & BJORKLUND, M. Cellular Allometry of Mitochondrial Functionality Establishes the Optimal Cell Size. *Developmental Cell* 39: p. 370–382 (2016).

MISHRA, P. & CHAN, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: p. 634-646 (2014).

MIURA, H. *et al.* Cell-to-Cell Heterogeneity in p38-Mediated Cross-Inhibition of JNK Causes Stochastic Cell Death. *Cell Reports* 24: p. 2658-2668 (2018).

MONTERO, J. *et al.* Drug-Induced Death Signaling Strategy Rapidly Predicts Cancer Response to Chemotherapy. *Cell* 160: p. 977–989 (2015).

MORRIS, J. *et al.* Pervasive within-Mitochondrion Single-Nucleotide Variant Heteroplasmy as Revealed by Single-Mitochondrion Sequencing. *Cell Reports* 21: p. 2706–2713 (2017).

MULLEN, A. R. *et al.* Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481: p. 385-389 (2011).

NAJM, F. J. *et al.* Orthologous CRISPR–Cas9 enzymes for combinatorial genetic screens. *Nature Biotechnology* 36: p.179-189 (2017).

NEFTEL, C. *et al.* An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* 178: p. 835–849 (2019).

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6 ed. Porto Alegre - Artmed, 2014.

NEVES, R. P. *et al.* Connecting Variability in Global Transcription Rate to Mitochondrial Variability. *Plos Biology* 8(12): p. 1-11 (2010).

NICHOLLS, T. J. & GUSTAFSSON, C. M. Separating and Segregating the Human Mitochondrial Genome. *Trends in Biochemical Science* 43(11): p. 869-881 (2018).

NISHIKAWA, K. & KINJO, A. R. Mechanism of evolution by genetic assimilation: Equivalence and independence of genetic mutation and epigenetic modulation in phenotypic expression. *Biophysical Reviews* 10: p. 667-676 (2018).

NOWELL, P. C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science* 194: p. 23-28 (1976).

O'FLAHERTY, L. *et al.* Dysregulation of hypoxia pathways in fumarate hydratase-deficient cells is independent of defective mitochondrial metabolism. *Human Molecular Genetics* 19: p. 3844–3851 (2010).

OLDRINI, B. *et al.* MGMT genomic rearrangements contribute to chemotherapy resistance in gliomas. *Nature Communications* 11: p. 3883-3893 (2020).

OLIVA, C. R. *et al.* Acquisition of Temozolomide Chemoresistance in Gliomas Leads to Remodeling of Mitochondrial Electron Transport Chain. *The Journal Of Biological Chemistry* 285(51): p. 39759 –3976 (2010).

OLIVA, C. R. *et al.* Acquisition of Chemoresistance in Gliomas Is Associated with Increased Mitochondrial Coupling and Decreased ROS Production. *PlosOne* 6(9): p. 1-10 (2011).

ONISHI, M. *et al.* Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO Journal* 40: p. 1-27 (2021).

ONU KWUFOR, J. O. *et al.* Quantification of reactive oxygen species production by the red fluorescent proteins KillerRed, SuperNova and mCherry. *Free Radical Biology and Medicine* 147: p. 1-7 (2020).

OTERO, D. C. CD19 Function in Early and Late B Cell Development: I. Maintenance of Follicular and Marginal Zone B Cells Requires CD19-Dependent Survival Signals. *The Journal of Immunology* 170: p. 73-83 (2002).

OSTROM *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro-Oncology* 19(5): p. 1-88 (2017).

OSUKA, S. & VAN MEIR, E. G. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest.* 127(2): p. 415-426 (2017).

OWEN, M. R. *et al.* Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348: p. 607-614 (2000).

PARK, S. & LEHNER, B. Cancer type-dependent genetic interactions between cancer driver alterations indicate plasticity of epistasis across cell types. *Molecular Systems Biology* 11: p. 824-834 (2015).

PARSONS, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* 321: p. 1807-1812 (2008).

PASTUSHENKO, I. & BLANPAIN, C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology* 29(3): p. 212-226 (2019).

PATEL, A. P. *et al.* Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344: p. 1396-1401 (2014).

PAYNE, J. L. & WAGNER, A. The causes of evolvability and their evolution. *Nature Review Genetics* 20:24-38 (2018).

PEAK, A. L. *et al.* Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. *Cell* 165:631-642 (2016).

PERNAS, L. & SCORRANO, L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Reviews in Physiology* 78: p. 11.1-11.27 (2016).

PHILLIPS, N. E. *et al.* Memory and relatedness of transcriptional activity in mammalian cell lineages. *Nature Communications* 10: p. 1-12 (2019).

PHILLIPS, R. E. *et al.* Epigenomic Reprogramming as a Driver of Malignant Glioma. *Cancer Cell* 38: p. 1-14 (2020).

PICKRELL, A. L. & YOULE, R. J. The Roles of PINK1, Parkin, and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. *Neuron* 85: p. 257-273 (2015).

PISCO, A. O. *et al.* Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. *Nature Communications* 4:2467 (2013).

POULIKAKOS, P. I. *et al.* RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 480: p. 387-391 (2011).

PRENSNER, J. R. & CHINNAIYAN, A. M. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nature Medicine* 17: p. 291-293 (2011).

PUSAPATI, R. V. *et al.* mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Underlies Escape from Glycolysis Addiction in Cancer Cells. *Cancer Cell* 29: p. 548–562 (2016).

QUAIL, D. F. & JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19(11): p. 1423-1437 (2013).

RABÉ, M. *et al* Identification of a transient state during the acquisition of temozolomide resistance in glioblastoma. *Cell Death and Disease* 11(19): p. 1-14 (2020).

RAMIREZ, M. *et al*. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nature Communications* 7:10690-10698 (2016).

RAMOR, P. *et al*. Small cell carcinoma of the ovary, hypercalcemic type, displays frequent inactivating germline and somatic mutations in SMARCA4. *Nature Genetics* 46: p. 427-429 (2014).

RICHTER, S. *et al*. Phenotypic plasticity facilitates resistance to climate change in a highly variable environment. *Oecologia* 169: p. 269–279 (2012).

ROBEY, R. W. *et al*. Revising the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer* 18: p. 452-464 (2018).

ROESCH, A. *et al*. Overcoming Intrinsic Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1B^{high} Cells. *Cell* 23: p. 811-825 (2013).

ROUX, J. *et al*. Fractional killing arises from cell-to-cell variability in overcoming a caspase activity threshold. *Molecular Systems Biology* 11: p. 803:819 (2015).

RUPRECHT, B. *et al*. Lapatinib Resistance in Breast Cancer Cells Is Accompanied by Phosphorylation-Mediated Reprogramming of Glycolysis. *Cancer Research* 77(8): p. 1842–1853 (2017).

SAGAN, L. *et al*. On the Origin of Mitosing Cells. *Journal of Theoretical Biology* 14: p. 225-274 (1967).

SALGIA, R. & KULKARNI, P. The Genetic/Non-genetic Duality of Drug ‘Resistance’ in Cancer. *Trends in Cancer* 4: p. 110-118 (2018).

SANCHO, P. *et al*. MYC/PGC-1a Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metabolism* 22: p. 590–605 (2015).

SANSONE, P. *et al*. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *PNAS* 114(43): p. E9066-E9075 (2017).

SANTOS, L. C. *et al*. Mitochondrial origins of fractional control in regulated cell death. *Nature Communications* 10: p. 1313-1310 (2019).

SASAKI, T. *et al.* Live imaging reveals the dynamics and regulation of mitochondrial nucleoids during the cell cycle in Fucci2-HeLa cells. *Scientific Reports* 7: p. 11257-11269 (2017).

SCARPULLA, R. C. Nuclear Control of Respiratory Chain Expression by Nuclear Respiratory Factors and PGC-1-Related Coactivator. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147: p. 321–334 (2008).

SCIACOVELLI, M. *et al.* Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature* 537: p. 544-547 (2016).

SESEN, J. *et al.* Metformin Inhibits Growth of Human Glioblastoma Cells and Enhances Therapeutic Response. *Plos one* p. 1-24 (2015).

SHAFFER, S. M. *et al.* Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546: p. 431-435 (2017).

SHAH, M. A. & SCHWARTZ, G. K. Cell Cycle-mediated Drug Resistance: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research* 7: p. 2168-2181 (2001).

SHARMA, S. V. *et al.* A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* 141:69-80 (2010).

SHAFFER, S. M. *et al.* Memory Sequencing Reveals Heritable Single-Cell Gene Expression Programs Associated with Distinct Cellular Behaviors. *Cell* 182:1–13 (2020).

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* 348(2): p. 177-183 (2016).

SORIANO, G. P. *et al.* Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. *Leukemia* 30: p. 2198–2207 (2016).

SOTTORIVA, A. *et al.* A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nature genetics* 47: p. 209-218 (2015).

SPENCER, S. L. *et al.* Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature* 459: p. 428-432 (2009).

SRINIVASAN, T. *et al.* NOTCH Signaling Regulates Asymmetric Cell Fate of Fast- and Slow-Cycling Colon Cancer-Initiating Cells. *Cancer Research* 76(11): p. 3411-3421 (2016).

STEIN, U. Point Mutations in the *mdr1* Promoter of Human Osteosarcomas are Associated With In vitro Responsiveness to Multidrug Resistance Relevant Drugs. *European Journal of Cancer* 30A(10): p. 1541-1545 (1994).

STEWART-ORNSTEIN, J. & LAHAV, G. Dynamics of CDKN1A in Single Cells Defined by an Endogenous Fluorescent Tagging Toolkit. *Cell Reports* 14, p. 1800–1811 (2016).

STEWART, J. B. & CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nature* 16: p. 530-542 (2015).

STUPP, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *The new england journal of medicine* 352: p. 987-996 (2005).

SU, Y. *et al.* Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *PNAS* 114(52): p. 13679-13684 (2017).

TADA, Y. *et al.* MDR1 Gene Overexpression and Altered Degree of Methylation at the Promoter Region in Bladder Cancer during Chemotherapeutic Treatment. *Clinical Cancer Research* 6: p. 4618-4627 (2000).

TAGUCHI, N. *et al.* Mitotic Phosphorylation of Dynamin-related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission. *The Journal Of Biological Chemistry* 282(15): p. 11521–11529 (2007).

TALMADGE, J. E. *et al.* Evidence for the clonal origin of spontaneous metastases. *Science* 217(4557): p. 361-363 (1982).

TESLAA, T. *et al* The Source of Glycolytic Intermediates in Mammalian Tissues. *Cell Metabolism* 33(2): p. 367-378 (2021).

TISDALE, M. J. Antitumour imidazotetrazines – XV: Role of guanine O⁶ alkylation in the mechanism of cytotoxicity of imidazotetrazinones. *Biochemical Pharmacology* 36(4): p. 457-462 (1987).

TORRES, C. M. *et al* The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science* 353(6307): p. 1514-1521 (2016).

VALTORTA, S. *et al.* Metformin and temozolomide, a synergic option to overcome resistance in glioblastoma multiforme models. *Oncotarget* 8(68): p. 113090-113104 (2017).

VAZ, M. *et al.* Chronic Cigarette Smoke-Induced Epigenomic Changes Precede Sensitization of Bronchial Epithelial Cells to Single-Step Transformation by KRAS Mutations. *Cancer Cell* 32: p. 360–376 (2017).

VERHAAK, R. G. W. *et al.* Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17: p. 98–110 (2010).

VISAKORPI, T. *et al.* In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature Genetics* 9: p. 401-406 (1995).

XIAO, Z. *et al.* Metabolic landscape of the tumor microenvironment at single cell resolution. *Nature Communications* 10: p. 3763-3775 (2019).

WAKS, A. G. & WINER, E. P. Breast Cancer Treatment a Review. *JAMA* 321: p. 288-300 (2019).

WANG, L. *et al.* A long non-coding RNA targets microRNA miR-34a to regulate colon cancer stem cell asymmetric division. *Elife* 5: p. 14620-14636 (2016).

WANG, Q. *et al.* Article Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32:42–56 (2017).

WATSON, P. A. *et al.* Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 15: p. 701-711 (2015).

WEATHERS, S. P. S. & GILBERT, M. R. Toward Personalized Targeted Therapeutics: An Overview. *Neurotherapeutics* 14: p. 256–264 (2017).
<https://doi.org/10.1007/s13311-016-0496-5>

WESSELING, P. & CAPPER, D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 44: p. 139–150 (2018).

WHEATON, W. W. *et al.* Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife* 3: p. 1-18 (2014).

WANROOIJ, S. *et al.* Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *PNAS* 105(32): p. 11122–11127 (2018)

WONG, A. L. *et al.* (2016) Multiplexed barcoded CRISPR-Cas9 screening enabled by CombiGEM. *PNAS* 113(9): p. 2544–2549.

WOODS, D. C. Mitochondrial Heterogeneity: Evaluating Mitochondrial Subpopulation Dynamics in Stem Cells. *Stem Cells International* 2017: p. 1-7 (2017).

WRIGHT, N. M. A. & GOSS, G. D. Third-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 8: p. S247-S264 (2019).

YAN, H. *et al.* IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *The New England Journal of Medicine* 360(8): p. 765-773 (2009).

YANG, D. *et al.* Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Scientific Reports* 6: p. 1-15 (2016).

YU, H. A. *et al.* Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clinical Cancer Research* 19(8): p. 2240-2247 (2013).

YU, L. *et al.* Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Res* 77(7): p. 1564-1574 (2017).

YU, Z. *et al.* Temozolomide in combination with metformin act synergistically to inhibit proliferation and expansion of glioma stem-like cells. *Oncology Letters* 11: p. 2792-2800 (2016).

YUAN, Y. *et al.* Comprehensive molecular characterization of mitochondrial genomes in human cancers. *Nature Genetics* 52: p. 342–352 (2020).

ZHAO, X. Y. *et al.* Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nature Medicine* 6: p. 703-706 (2000).

APÊNDICE

CARTA DE ACEITE

Manuscript #	048980
Title	The role of dynamic phenotypes in cancer
Corresponding Author	Guido Lenz (UFRGS)
Date:	2021-06-16 16:30
Last Sent:	2021-06-16 16:30
Created By:	Redacted
From:	editorialoffice@oncotarget.com
To:	gulenz@gmail.com
CC:	Redacted
BCC:	Redacted
Subject:	048980 Decision Letter
Email	<p>June 16, 2021</p> <p>Guido Lenz UFRGS Biofisica Bento Gonçalves, 9500; Prédio 43431, Sala 115 Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970 Brazil</p> <p>RE: The role of dynamic phenotypes in cancer</p> <p>Dear Dr. Guido Lenz:</p> <p>I am pleased to inform you that your manuscript "The role of dynamic phenotypes in cancer" has been accepted for publication in Oncotarget.</p> <p>To promote your paper further, we can publish Editorial on your paper. Would you suggest potential authors who may write it? You may contact potential authors directly and let us know.</p> <p>Your paper will be published after you fill out the required author agreement form. The Publisher will email a link to this form to you shortly.</p> <p>To ensure delivery of our email, please add the following addresses to your addresses book, spam filter "whitelist", or tell your organization's IT group to allow these address to pass through any filtering software they may have set up:</p> <p>forms@oncotarget.com payment@oncotarget.com</p> <p>Sincerely,</p> <p>Mikhail Prof. Mikhail V. Blagosklonny, MD, PhD Co-Editor-in-Chief Oncotarget</p> <p>---</p> <p>This email message may contain legally privileged and/or confidential information. If you are not the intended recipient(s), you are hereby notified that any disclosure, copying, distribution, or use of this email message is prohibited. If you have received this message in error, please notify the sender immediately by e-mail and delete this email message from your computer. Thank you.</p>

CURRÍCULO VITAE

LENZ, L. S.

1. DADOS PESSOAIS:

Nome: Luana Suéling Lenz

Local e data de Nascimento: Tucunduva, Rio Grande do Sul, Brasil,
29/06/1993

Endereço profissional:

Instituto de Biociências - Dep. Biofísica

Prédio 43431 - Sala 115

Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Bairro Agronomia

Porto Alegre, 91501-970, Brazil

Telefone: (55) 99623 3567

E-mail: luana_s_lenz@hotmail.com

2. FORMAÇÃO:

2017-2021: Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Guido Lenz. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

2015-2017: Mestrado em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria. Orientadora: Cinthia Melazzo de Andrade. Co-orientadora: Micheli Mainardi Pillat. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

2011-2015: Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria.

3. ESTÁGIOS:

2018-2021: Aluna de doutorado do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Orientação: Guido Lenz. Atividades desenvolvidas: cultura celular, clonagem de vetor plasmidial, CRISPR, transduções retro e lentivirais, citometria, clonogênicos, tracking de células únicas, co-orientação de alunos de iniciação científica e de trabalho de conclusão de curso de graduação. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

2015-2017: Aluna de mestrado do Programa de Pós Graduação Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria. Orientação: Cinthia Melazzo de Andrade e Micheli Mainardi Pillat. Atividades desenvolvidas: cultura celular, citometria para quantificação do ciclo celular, apoptose e marcações com anticorpos, testes de migração, citotoxicidade e clonogênicos. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

2014-2015: Bolsista de iniciação científica no Laboratório Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria. Orientação: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Atividades desenvolvidas: ensaios bioquímicos para quantificação de atividade enzimática e de estresse oxidativo, cultura celular, PCR, ensaio cometa para quantificação de dano ao DNA. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS);

2012-2014: Iniciação científica voluntária no Laboratório Biogenômica, Universidade Federal de Santa Maria. Orientação: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Atividades desenvolvidas: ensaios bioquímicos para quantificação de atividade enzimática e de estresse oxidativo, cultura celular, PCR, ensaio cometa para quantificação de dano ao DNA;

2012-2014: Bolsista de Iniciação à Docência, Universidade Federal de Santa Maria. Orientação: Lenira Maria Nunes Sepel. Atividades desenvolvidas: atividades práticas em laboratório com alunos da educação básica, feira de ciências, palestras sobre educação Ambiental. Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do nível Superior (CAPES);

2011-2012: Iniciação científica voluntária no Laboratório de Diversidade Genética, Universidade Federal de Santa Maria. Orientação: Marlise Ladvoat Bartholomei-Santos. Atividades desenvolvidas: extração de DNA de crustáceos da família Aeglidae, PCR e análise de padrões de evolução a partir de BLAST.

4. EXPERIÊNCIA DIDÁTICA:

2017-2017: Docência orientada na disciplina de Metodologia Científica para o curso de biomedicine da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

2015-2015: Docência orientada na disciplina de Bioquímica Experimental para o curso de medicina veterinária da Universidade Federal de Santa Maria;

2014-2014: Professora estagiária do 1º ano do Ensino médio do Colégio Estadual Coronel Pilar;

2013-2013: Professora estagiária do 7º ano do Ensino fundamental da Escola Estadual de Ensino Fundamental Santa Helena;

2012-2013: Professora voluntária de biologia do cursinho Pré-Vestibular Popular Alternativa.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS:

1. LENZ, L. S. FACCIONI, J. L. BRACCO, P. A. SANTOS, J. A. F. *et al.* Cancer Cell Fitness Is Dynamic. *Cancer Research* 81: p. 1040-1051 (2021).

2. BRUM, E. S. *et al.* DNA damage and inflammatory response in workers exposed to fuels and paints. *Archives of Environmental & Occupational Health* 76: p. 152-162 (2021).

3. PALMA, T. V. *et al.* Berberine induces apoptosis in glioblastoma multiforme U87MG cells via oxidative stress and independent of AMPK activity. *Molecular Biology Reports* 47: p. 4393-4400 (2020).

4. DE OLIVEIRA, J. S. *et al* Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. *Psychopharmacology* 235: p. 1432-2072 (2018).

5. AZZOLIN, V. F. *et al*. Effects of Pyridostigmine bromide on SH-SY5Y cells: An in vitro neuroblastoma neurotoxicity model. *Mutation Research-Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis* 823: p. 1-10 (2017).

6. DE OLIVEIRA, J. S. *et al* Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic alzheimer-like dementia: involvement of acetylcholinesterase and cell death. *Neurotoxicology* 57: p. 241-250 (2016).

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSO:

1. LENZ, L. S. *et al*. Mitochondrial response to temozolomide treatment in glioma cells. *AACR Annual meeting* (2020).

2. LENZ, L. S. Tópicos sobre metabolismo e mitocôndrias no câncer. *VII Curso de Sinalização Celular no Câncer - Teoria e Prática da Biologia Celular Tumoral* (2019).

3. AZZOLIN, V. F. *et al*. Efeito cito e genotóxico do brometo de piridostigmina frente à células neurais SH-SY5Y. *World Congress on Brain, Behavior and Emotions* (2017).

4. LENZ, L. S. *et al*. Berberine prevents the increase reactive species in hippocampus of rats submitted to sporadic dementia of alzheimer type. *23rd International Congress of the IUBMB and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)* (2015).

5. ALGARVE, T. D. *et al*. Toxicogenetic effect of Ala16Val-SOD2 Polymorphism in methyl mercury toxicity. *I Latin American Congress os Clinical and Laboratorial Toxicology* (2014).

2. 5.MANICA-CATTANI, M. F. *et al*. Protective effect of guaraná powder (*Paullinia cupana*) against paraquat toxicity in *Drosophila melanogaster* model. *I Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology* (2014).

3. 6.LENZ, L. S *et al*. O Guaraná como imunomodulador de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. *VII Congresso Internacional de bioanálises, X Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XIV Semana Gaúcha de Biomedicina* (2014).

4. 7.CAPELETO, D. *et al*. Effect of resveratrol on the production of reactive oxygen species in cells carrying different genotypes of superoxide dismutase 2. *III Simpósio Internacinal de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares* (2014).

5. MACHADO A. K. *et al*. Reversão da senescência celular de células tronco derivadas do tecido adiposo com suplementação de guaraná (*Paullinia cupana*). *Jornada Acadêmica Integrada – Universidade Federal de Santa Maria* (2014). (Apresentação de Trabalho/Outra).

6. SILVA, T. O. *et al.* Avaliação da associação entre SIRT1 e o perfil lipídico em idosos ribeirinhos. *XXV Congresso Brasileiro de Genética Médica* (2013).
7. LENZ, L. S. *et al.* Avaliação da associação entre SIRT1 e o perfil lipídico em idosos ribeirinhos. *Jornada Acadêmica Integrada – Universidade Federal de Santa Maria* (2013).
8. CEREZER, C. *et al.* Cara-bicho: elaboração de jogo didático de zoologia para o ensino fundamental e médio. *IV Simpósio de Biodiversidade* (2013).
9. FREITAS, T. K. LENZ, L. S. BARTHOLOMEI-SANTOS, M. L.. Padrões de evolução do gene mitocondrial COI em moluscos bivalves. *XVIII Encontro de Geneticistas do Rio Grande do Sul* (2012).