MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA

ASPECTOS MOLECULARES E DESTINO DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS SUBMETIDAS A ALTERAÇÕES DE PLOIDIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA

ASPECTOS MOLECULARES E DESTINO DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS SUBMETIDAS A ALTERAÇÕES DE PLOIDIA

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

OLIVEIRA, MARIA APARECIDA
Aspectos moleculares e destino de células tumorais humanas submetidas a alterações de ploidia / MARIA APARECIDA OLIVEIRA; orientador Glaúcia Maria Machado-Santelli. -- São Paulo, 2017.
68 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. a. 2. Cancer. 3. HIPPO. 4. Instabilidade cromossômica. 5. Citoesqueleto de actina. I. Machado-Santelli, Glaúcia Maria, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Maria Aparecida de Oliveira

Titulo da Dissertação/Tese: ASPECTOS MOLECULARES E DESTINO DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS SUBMETIDAS A ALTERAÇÕES DE PLOIDIA.

Orientador: Prof. Dra. Glaúcia M. Machado Santelli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o (a) candidato (a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **729/15** referente ao projeto intitulado: "*Implicações moleculares e destino das células tumorais de mama humanas submetidas a alterações de ploidia*" sob a responsabilidade de **Maria Aparecida de Oliveira,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº466 de 2012.

São Paulo, 24 de março de 2015.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedico o presente trabalho ao meu marido,
José Luis Lorenzi Lima.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Gláucia M. Machado Santelli, onde desenvolvi todo o cabedal de conhecimento que carrego agora. Esses quase 3 anos se passaram num piscar de olhos e ainda guardo com carinho o primeiro e-mail enviado e na lembrança a primeira conversa. Agradeço imensamente a experiência que compartilhei com você e o grupo BIOCEM, que, sem dúvida enriqueceu minha trajetória profissional, mas sobretudo, me fez um pessoal melhor e mais forte.

À cada membro do grupo BIOCEM, que de alguma maneira contribuiu e participou dessa trajetória, ajudando nas prévias, na bancada e também na conversa amiga.

À Prof. Dra. Marilene Lopes, quem primeiro abriu as portas do departamento e onde obtive os primeiros conhecimentos de como fazer ciência.

À Prof. Dra. Alison Colquhoun que disponibilizou seu tempo e seu equipamento a mim.

Aos Professores das disciplinas que colaboraram muito no meu desenvolvimento acadêmico.

Á Dra. Paula Rezende, sem a qual esse trabalho não seria o mesmo, agradeço pela ajuda profissional e principalmente pela amizade que tanto prezo.

À Dra. Sandra Muxel, Instituto de Biologia-USP, pela solicitude e gentileza sempre dispensada a minha pessoa.

À Dra. Maria Nadieg, UNIFESP, pelo empenho e a vontade em me ajudar.

Ao Professor Érico Padilha e sua esposa, pela ajuda inesperada.

Aos meus amigos, que mesmo distantes torceram por mim.

Ao meu pai, pelas poucas lembranças da infância, mas ainda assim, inesquecíveis.

Ao meu tio Mauro e minha tia Luiza, agradeço ao apoio à minha mãe, aos meus irmãos e a mim.

À minha saudosa e inesquecível mãe, exemplo de honestidade e trabalho, sempre penso em você nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos, pedaços do meu coração, Paulinho, Calio, Sina e Carmem, irmãs e amigas de todo o momento. Agradeço em especial ao meu irmão-pai, Done, causa primária de tudo o que eu conquistar profissionalmente.

Por último, a causa final de tudo o que faço na minha vida, José Luis, SOL do meu caminho, que ri e chora comigo, só você me deu a certeza de que não estava sozinha.

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomentos, que tornam possível o trabalho e o sonho de todos os dedicados pesquisadores do nosso país.

À FAPESP e a CAPES, que forneceram os subsídios utilizados neste trabalho.

Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que acham que sabem alguma coisa.

Sócrates.

RESUMO

OLIVEIRA, M. A. **Aspectos moleculares e destino de células tumorais humanas submetidas a alterações de ploidia.** 2017. total de folhas exemplo 68f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

A instabilidade cromossômica e a aneuploidia são características associadas às células malignas. Sabe-se que essas alterações podem ser resultantes de erros em eventos durante a mitose. Com o objetivo de gerar uma população com ganho de ploidia, utilizamos dois inibidores de fases distintas da mitose. Resultando no aumento da frequência celular em G2/M, ou seja, células com 4 vezes o número de cromossomos (4C) e de células com DNA acima de 4, hipertetraploide. Quantificamos a quantidade de núcleos e demonstramos que o tratamento, especificamente, levou a uma NCI, e não a multinucleação. Ambas linhagens celulares submetidas ao tratamento apresentaram alterações morfológicas, como protrusões de membrana, indicando alterações no citoesquelto. Nas análises de mRNA e da expressão proteica, observamos alterações na regulação da actina, coincidindo com a elevação dos mRNAs de YAP/TAZ, efetores co-transcricionais da via Hippo, regulada por alterações no citoesqueleto de actina. Desde modo, propomos, que o tratamento utilizado é um método eficiente para o estudo de células aneuploides e da NCI, que o citoesqueleto de actina é modulado por esse fenótipo e requer YAP/TAZ, provavelmente para manter a sobrevivência e favorecer a proliferação celular observada após o tratamento.

Palavras chaves: aneuploidia, câncer, HIPPO, instabilidade cromossômica, citoesqueleto de actina.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. A. **Molecular Aspects and Fate of Human Tumor Cells Undergoing Ploidy Changes**. 2017. 68 p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

Chromosomal instability and aneuploidy are characteristics associated with malignant cells. It is known that these changes may be due to errors in events during mitosis. In order to generate a population with gain of ploidy, we used two inhibitors of distinct phases of mitosis. Resulting in increasing cell frequency in G2/M, cells with 4 times the number of chromosomes (4C) and cells with DNA above 4, hypertetraploid. We quantified the number of nuclei and demonstrated that the treatment specifically led to NCI, not multinucleation. Both cell lines submitted to treatment presented morphological alterations, such as membrane protrusions, indicating changes in the cytoskeleton. In the analysis of mRNA and protein expression, we observed alterations in actin regulation, coinciding with the elevation of YAP / TAZ mRNAs, co-transcriptional effectors of the Hippo signaling pathway, regulated by changes in the actin cytoskeleton. We propose, that the treatment used is an efficient method for the study of aneuploid cells as well NCI. Also, the actin cytoskeleton is modulated by that phenotype which requires high YAP / TAZ, probably to maintain cell survival and promote cell proliferation observed.

Keywords: aneuploidy, cancer, HIPPO, chromosomal instability, actin cytoskeleton.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado da via de sinalização Hippo.....25

Figura 2 – Imagem da linhagem celular MCF-7.....30

Figura 3 – Imagem da linhagem celular A549.....30

Figura 4 – Esquema de tratamento.....31

Figura 5 – Esquema explicativo da técnica FUCCI.....35

Figura 6 – Gráfico e imagens do tratamento com Monastrol.....38

Figura 7 – Ciclo celular da linhagem MCF-7.....39

Figura 8 – Ciclo celular da linhagem A549.....41

Figura 9 – Imagens da citometria de fluxo Amnis.....42

Figura 10 – Quantificação de núcleos.....44

Figura 11 – Imagens em tempo real da linhagem celular A549, submetida ao tratamento.....45

Figura 12 – Imagens em tempo real da linhagem celular A549, não tratada.....47

Figura 13 – Alterações morfológicas em células em cultura.....48

Figura 14 – Alterações morfológicas em células fixadas.....50

Figura 15 – Quantificação de mRNAs.....51

Figura 16 – Expressão proteica.....53

Figura 17 - 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 ANEUPLOIDIA 14
1.2 MECANISMOS QUE INDUZEM A ANEUPLOIDIA 17
1.3 *ANEUPLOIDIA E CÂNCER* 20
1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO 22
1.5 YAP/TAZ NO CÂNCER 25
2 MATERIAL E MÉTODOS 29
2.1 CULTURA CELULAR 29
2.2 TRATAMENTO SEQUENCIAL DE MONASTROL E BLEBBISTATINA 31
2.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS 31
2.4 q-PCR em tempo real 32
2.5 WESTERN BLOTTING 33
2.6 CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO 34
2.7 FUCCI (indicador de ciclo celular à base de ubiquitinação) 34
3 RESULTADOS e DISCUSSÃO 37
3.1 TRATAMENTO COM MONASTROL 37
3.2 EFEITO DO TRATAMENTO SEQUENCIAL DE MONASTROL E BLEBBISTATINA NO CICLO CELULAR 40
3.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS COM + DE 1 NÚCLEO 43
3.4 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO CELULAR (FUCCI) 45
3.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS 49
3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS mRNAS 52
3.7 EXPRESSÃO PROTEÍCA 53
4 CONSIDERAÇÃO FINAL 56
REFERÊNCIAS* 58

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANEUPLOIDIA

Os mecanismos de controle do ciclo celular trabalham a fim de chegar ao final da mitose com células filhas com idêntico conteúdo de DNA da célula mãe, disso depende a homeostase do organismo. No entanto, células com ganho de ploidia representam uma parte da população em diferentes tecidos. Aneuploidia é geralmente incompatível com a vida e muitas vezes leva a interrupção da gestação ou natimorto em seres humanos. Somente tolerada em poucos casos, como trissomias dos cromossomos 13, 5, 18, 21 e X, contudo, levando ao desenvolvimento de síndromes genéticas, como Down, Turner e outras.

Alterações de ploidia podem ser resultado da instabilidade cromossômica numéica (NCI), mecanismo caracterizado por ganho ou perda de cromossomos ou partes de cromossomos durante a divisão, que ocorre continuamente durante os sucessivos ciclos celulares (LENGAUER et al., 1997). E pode ser de dois tipos: W-NCI, perda ou ganho de cromossomos inteiros ou S-NCI, rearranjo estrutural de cromossomos, incluindo também, falhas como translocação, deleção e/ou duplicação, promovendo ganho ou perda de partes de cromossomos.

Erros de segregação cromossômica ocorrerem naturalmente em aproximadamente 1% das culturas celulares normais e entre 1% a 5% em tecidos de camundongos, no entanto esse fenótipo é eliminado ao longo dos sucessivos ciclos celulares (CIMINI et al., 1999; KNOUSE et al., 2014; REISH et al., 2011; SHELTZER et al., 2011; THOMPSON et al., 2008; TORRES et al., 2008; ZHU et al., 2012;). Contudo nem toda alteração cromossômica constituinte de tecidos normais tendem a ser eliminadas pelo controle do ciclo celular, em alguns casos permanecem como característica típica em determinados sítios ou estágios de desenvolvimento (CARBONE; CHAVEZ 2015), como é o caso do tecido nervoso e hepático, que podem apresentar variadas taxas de alterações cromossômicas que não são eliminadas, uma hipótese aceita, seria que essa heterogeneidade, resultado da aneuploidia, favoreça às funções nesses tecidos (DUNCAN et al., 2012; MUOTRI et al., 2006; REHEN et al., 2001).

Com relação ao cérebro, evidências que há uma elevada taxa de aneuploidia nesse tecido, ainda é bastante controversa. Estudos indicam que 10% dos neurônios

no cérebro saudável são aneuploides (MCCONNELL et al., 2013; WESTRA et al., 2008), uma possível explicação, seria que faz parte da fisiologia normal do órgão, resultando em heterogeneidade neuronal e nas populações da glia. Outro cenário aponta para a inadequação dos modelos e técnicas utilizadas nesses trabalhos (BAKKER et al., 2015), a maioria dos estudos que trazem essa informação foram realizados em camundongos, que apresenta um cérebro com pouca similaridade com o cérebro humano. Análises gênicas em amostras post-mortem, observou-se uma prevalência de apenas 2.2% de células aneuploides. Recentemente, dados provenientes de 1500 células cerebrais, apenas 0,7% foram qualificadas com alterações cromossômicas (VAN DEN BOS et al., 2016). Assim, essa questão da frequencia e do papel da aneuploidia no sistema nervoso central permanece em discussão, visto as dificuldades que permeiam os estudos nessa área e a origem das amostras, que provem de indivíduos pos-mortem ou com epilepsia ou Alzheimer, representando uma porção pequena do cérebro e já afetado por doenças.

Diferentemente do cérebro, tem-se melhor estabelecido a presença regular de células aneuploides no fígado, cerca da metade dos hepatócitos em adultos são poliploides ou aneuploides (DUNCAN et al., 2012; KNOUSE et al., 2014), estudos sugerem que essa variedade de células traz uma contribuição para a adaptação do fígado às injúrias e ao estresse crônico (DUNCAN et al., 2012).

Células tronco, é uma condição celular que vem sendo associado à aneuploidia. As células tronco são divididas em dois subtipos segundo seu potencial de diferenciação: Pluripontes, células tronco que podem dar origem aos três tipos de tecido embrionário e multipotentes, células já comprometidas com o tecido de origem. Hoje técnicas são capazes de desdiferenciar células trocnco e gerar IPSCs (pluripotent stem cells), capazes de dar origem a qualquer tipo de célula somática (TAKAHASHI et al., 2007). Os trabalhos que vem relacionando células tronco com aneuploidia mostram que há uma menor incidência de alterações cromossômicas e aumento de genes relacionados ao reparo do DNA, o que as tornaria mais resistentes a aneuploidia (MAYNARD et al., 2008). As células tronco se utilizam do apoptose ou progredir para a diferenciação, como um dos meios de impedir a viabilidade de células com danos no DNA (JAIN et al., 2012). Enquanto a aneuploidia parece se acumular nas células somáticas ao longo do envelhecimento em camundongo, as células tronco aneuploides, nos mesmos animais apresentam-se raras (BAKER et al., 2013). Demonstrando a alta complexidade que envolve esse fenômeno e que as células

tronco são mais sensíveis a danos no DNA do que as células somáticas (FOIJER et al., 2013).

Outro fenômeno bastante relacionado a aneuplodia, é o envelhecimento. (JACOBS et al., 1963; PIERRE; HOAGLAND 1972). As primeiras evidências, que fortaleceram essa associação, surgiram a partir de experimentos realizados com camundongos com diferentes graus de expressão de BubR1, proteína que inibe o início da anáfase quando há erros de ligações entre os cinetócoros e os microtúbulos do fuso mitótico. Nos camundongos mutantes com baixa expressão de BubR1, esperava-se uma propensão ao desenvolvimento de tumores, e em vez disso, observou-se o desenvolvimento de uma série de características relacionadas ao envelhecimento, como: menor tempo de vida, catarata, perda de gordura, deficiência na cicatrização, redução da espessura dérmica, entre outros (BAKER et al., 2004).

Estudos posteriores fortalecem essa associação (FAGGIOLI et al., 2012; WILLIAMS et al. 2008), sugerindo que seja um mecanismo natural do envelhecimento (BAKER et al. 2013). Somando-se a isso, há evidências que esse fenótipo contribua para mutações prejudiciais, que podem promover desordens degenerativas, como o Alzheimer (IOUROV et al., 2009).

Outra característica a ser considerada nos estudos de células aneuploides, é seu potencial adaptativo (CHEN et al., 2015; DUNCAN et al., 2012; RANCATI et al., 2008), resultando no aumento da resistência aos tratamentos, uma vez que a inibição da proliferação pode selecionar e favorecer a heterogeneidade fenotípica das células tumorais mais resistentes (CHEN et al., 2015). A perda ou o ganho de cromossomos específicos é extremamente rara, mas há evidências que mostram em determinados casos, um padrão não arbitrário (DUIJF et al., 2013; OZERY-FLATO et al., 2011).

A aneuploidia pode representar um papel importante na homeostase de diversos órgãos e estágios de desenvolvimento, assim como favoreceu ao processo evolutivo, representando uma ferramenta fundamental para a geração da variabilidade genética (OTTO; WHITTON 2000). Entretando, está associada, intimamente, com muitas doenças, sobretudo o câncer, no qual já foi considerada como principal causa da tumorigênese, hipótese ainda bastante discutida e sem resposta definitiva (SHELTZER et al., 2012).

1.2 MECANISMOS QUE INDUZEM A ANEUPLOIDIA

Erros durante o processo de divisão celular podem dar origem a células com a quantidade de DNA distinto da célula mãe. Esses erros são finamente controlados pelo checkpoint mitótico, contudo eventos que ignoram os mecanismos de controle, dão à célula alterada capacidade de progredir no ciclo e gerar progênies aneuploides (MUSACCHIO; SALMON 2007).

Os pontos de checagens são mecanismos de feedback que monitora a progressão do ciclo celular e inibe o início de eventos subsequentes até que os processos da etapa anterior tenham sido executados com sucesso. O ponto de checagem mitótico monitora a ligação dos cromossomos aos microtúbulos durante o processo de divisão. Para a distribuição equitativa de DNA entreas as células filhas, é necessário que todas as cromátides irmãs estejam ligadas aos microtúbulos do fuso mitótico. Um único cinetócoro que não esteja ligado adequadamente ao microtúbulo desencadeia um sinal inibitório, que atrasa a progressão da mitose, até que haja a correção dessa ligação. Esse sinal induz o aumento da expressão da proteína Mad2 (mitotic arrest deficient) que se associa aos cinetócoros não ligados ao fuso durante a metáfase. Bub1 (budding uninhibited benzimidazole) interage com Mad2 e juntos inibem o início da anáfase. Esse atraso é causado pela ligação de Mad2 e Bub1 ao complexo Cdc20 que é ativado por outro complexo, o APC (complexo promotor da anáfase). Quando todos os cinetócoros estão ligados adequadamente aos microtúbulos, o complexo APC ubiquitina as securinas que mantinham as separases inativas, estas por sua vez, livres, quebram as coesinas que mantinham as cromátides irmãs unidas, permitindo a migração destas para os respectivos polos da célula, finalizando com a citocinese, garantindo assim a divisão adequada das cromátides irmãs (WEAVER; CLEVELAND 2009).

Diversas falhas nos mecanismos de controle da divisão celular podem promover ou favorecer a NCI e o aparecimento da aneuploidia, entre elas citamos:

A. Erros durante a montagem do fuso mitótico. Embora mutações nos genes responsáveis pelo checkpoint de montagem dos fusos sejam pouco frequentes em câncer, falhas nesse mecanismo estão associadas ao aumento da aneuploidia, mutações em BUB1B são encontradas na Síndrome da aneuploidia variada em mosaico (HANKS et al., 2004), assim como a super expressão de proteínas responsável pelo ponto de checagem do fuso, como MAD2, a hiperativação dessa

proteína em ratos motivou o desenvolvimento de tumores aneuploides (KATO et al., 2011; SOTILLO et al., 2007).

B. Perda prematura ou tardia da coesão entre as cromátides irmãs, causada, por exemplo, pela superexpressão da separasse ou securina, controladoras da coesão entre as cromátides, contribui para a formação da aneuploidia e a transformação celular (ZHANG et al., 2008). Embora nem toda mutação nesses genes leve a NCI e consequentemente à aneuploidia. O impacto da perda da coesão em consequência de mutações genéticas é ainda pouco conhecido (KIM et al., 2016; TAYLOR et al., 2013).

C. Ligações merotélicas: são falhas nas ligações entre os cinetócoros e os microtúbulos do fuso. São especialmente perigosas, pois são pouco percebidas pelo ponto de checagens do fuso mitótico (CIMINI et al., 2008), são consideradas uma das principais causas da NCI (GREGAN et al., 2011), a incidência de cromossomos atrasados durante a anáfase em células cancerosas está entre 10 e 60% (NICHOLSON; CIMINI 2013). Quando um cinetócoro está ligado a microtúbulos de ambos os pólos, normalmente ocorre um atraso na migração desse cromossomo. Se a falha não for corrigida, ambas as cromátides podem migrar para o mesmo polo ou podem permanecer na zona intermediária, neste caso, são excluídas do núcleo e em consequência gerar micronúcleos, perfil bastante associado com linhagens celulares cancerosas (CIMINI et al., 2003; ERTYCH et al., 2014).

D. Fusos Multipolares: surgem a partir principalmente da amplificação centrossomal. São prevalentes entre células com NCI. Frequentemente encontrados em canceres humanos, como em tumores invasivos de mama, que apresentam uma taxa crescente de aneuploidia diretamente proporcional ao grau de agressividade tumoral (MACHADO-SANTELLI et al.,1994), são pouco tolerados em células não transformadas.Super-replicação dos centríolos é um modo pelo qual as células podem aduirir centrossomos extras, ocorre quando há a superexpressão da proteína Polo-like quinase (PLK4), maior reguladora da duplicação centrossomal, resultando em múltiplos centrossomos extras (COELHO et al., 2015; MARTIN et al., 2014), que podem se aglomerar em dois polos, no início da mitose, criando um fuso pseudobipolar, fenômeno denominado aglomerado centrossomal, como uma provável forma de adaptação, já que células que se submetem a anáfases multipolares, geralmente, dão origem a progênies inviáveis (GANEM et al., 2009). Como esse mecanismo evita uma mitose aberrante ou gera células irmãs

aneuploides, ainda não está completamente elucidado, um efeito observado é que há um aumento de ligações merotélicas, mecanismo que leva a perda de cromossomos durante a anáfase (MILUNOVIĆ-JEVTIĆ et al., 2016; RING et al., 1982).

E. Células tetraploides: estado geneticamente instável que pode preceder a aneuplodia e facilitar a tumorigênese (GANEM et al., 2007). Podem surgir por fusão celular, a célula resultante entra no ciclo com dois centrossomos que são subsequentemente duplicados, depois da mitose podem surgir células irmãs com fusos bipolares que serão estáveis ou com fusos multipolares instáveis (DEAVE; KREIZINGER 1971). Quando ocorre por falha na citocinese, podem desencadear uma NCI, já que essas células são cariotipicamente instáveis e são capazes de induzir a formação tumoral em camundongos (FUJIWARA et al., 2005; GANEM et al., 2009).

Estudos trazem informações conflitantes, como o controle do ciclo age sobre essas células poliploides. Num trabalho verificou-se que a perda da função de p53 precede a tetraploidização (BARRETT et al., 1999) e em outro que a indução de tetraplodização ativa p53 (GANEM et al., 2014), pórem, em ambos foi demonstrado que as células podem continuar proliferando por diferentes mecanismos. Como se dá esse intercambio entre p53 e tetraploidização não está claro, provavelmente diversas vias de sinalização estejam envolvidas nesse processo e uma já associada, é a via de sinalização HIPPO (GANEM et al., 2014).

O destino das células tetraploides pode variar bastante, se houver a ativação dos checkpoints, a célula pode parar em G1 e eventualmente seguir para a apoptose. Se os pontos de checagens estiverem comprometidos, a célula poderá progredir no ciclo, resultando em NCI, gerando aneuploidia e/ou morte celular. Pode ocorrer também a redução do conteúdo de DNA pela mitose, resultando na segregação de células filhas diploides ao longo de várias divisões celulares, enquanto as células hipodiploides seguirão para a apoptose (PERA; RAINER 1973).

1.3 *ANEUPLOIDIA E CÂNCER*

O câncer sempre esteve associado ao fenótipo aneuploide, porém, não há um consenso a respeito do papel da aneuplodia nos estágios do desenvolvimento tumoral, embora seja uma característica predominante em células cancerosas. Considerando que algumas linhas de pesquisas afirmam que a aneuplodia é a força primária que dirige a tumorigênese (DUESBERG et al., 1998), outras, no entanto argumentam que é apenas um efeito decorrente da transformação (ZIMONJIC et al., 2001).

Quem primeiro relacionou erros na divisão celular ao câncer foi Boveri (BOVERI 1914) quando observou no desenvolvimento de ouriços que divisões mitóticas anormais resultavam em alterações cromossômicas numéricas. Tempos mais tarde, outros autores sugeriram determinados genes como responsáveis pelo início do tumor e não a NCI em si (DUESBERGE et al., 1998; HAHN et al., 1999). É essencial estabelecer a ligação entre aneuplodia e NCI, sabe-se que ambas se afetam mutualmente. Células humanas com trissomias tendem a taxas mais elevadas de perda ou ganho de cromossomos que células diploides (REISH et al., 2006, 2011).

Embora seja observado que modelos de camundongos com NCI sejam mais propensos ao desenvolvimento de tumores. Ainda não foi possível entender como alterações no conteúdo do DNA pode impactar os estágios da evolução tumoral (ROBIN; DEURSEN 2013). Sabe-se, porém, que trissomias e tetrassomias, são frequentemente observadas em tumores iniciais (BALABAN et al.,1986; SACOTO et al., 2011).

Estudos *in vitro* ainda estão longe de mimetizar o ambiente intratumoral, com alta heterogeneidade celular, microambientes diferentes, altas taxas de mutações e estresse proteico. Assim, estudos capazes de fornecer novas condições de avaliações são necessários, a fim de contrinuir para o desenvolvimento de técnicas mais eficazes no estudo do papel da aneuploidia na evolução tumoral.

Ensaio com culturas de leveduras demonstraram que a poliploidia ou tetraploidia leva a NCI, e aumeta a taxa de sobrevivência celular, o estudo sugeri que altas taxas de mutações sofridas nesse processo, favorece a adaptação, mantendo mutações beneficas e promovendo sobrevivência em cultura. Se essa plasticidade também pode ser observada em células de mamíferos ainda não se pode afirmar (SANSREGRET et al.,2017; SELMECKI et al., 2015).

Análise de canceres humanos mostraram que o fenômeno de duplicação completa do DNA no início do desenvolvimento tumoral foi detectado em 37% dos tumores analisados (CARTER et al., 2012; DEWHURST et al., 2014). Outros experimentos com linhagens tumorais demonstraram que células tetraploides são mais tolerantes a erros de segregação cromossômicas do que células diploides (KUZNETSOVA et al., 2015). Está bem demonstrado que células tetraploides levam a NCI, como consequencia a uma elevação na taxa da heterogeneidade cariótipica e rearranjos cromossomais contínuos que favorecem a formação de tumores em camundongos (DAVOLI; DE LANGE 2012; DEWHURST et al., 2014). Altas taxas de alterações cromossômica implica numa sobrevivência mais curta de pacientes com melanoma, análises feitas em amostras tumorais e normais demonstraram que o aumento da aneuploidia está associado com a redução de marcadores do sistema imune, o que também foi associado com uma menor sobrevivência de pacientes com melanoma. Sabe-se que a evasão de células tumorais do sistema imune é uma das marcas do câncer (DAVOLI et al., 2017). Assim, temos bem estabelecido, que a aneuploidia está presente na maioria dos tumores sólidos e representa um fator de pior prognóstico da doença. (BAKHOUM et al., 2011; BIRKBAK et al., 2011; DUESBERGE et al., 2006; MACHADO-SANTELLI et al., 1994).

A complexidade genética encontrada nas células aneuploides é um fator determinante que dificulta a elucidação dos mecanismos envolvidos na formação do tumor. Além das alterações no número de cromossomos, uma variedade de outros rearranjos cromossomais pode acontecer. Há decádas a aneuploidia vem sendo associada à iniciação e a manutenção tumoral, mas se a aneuploidia é uma causa ou meramente uma consequência secundária, permanecemos sem resposta (DUESBERG et al., 2000; MATZKE et al., 2003).

1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO

Como o tamanho dos órgãos é determinado nos organismos é uma das questões que ainda desafia os pesquisadores na área da biologia celular. Sabe-se que a privação nutricional e deficiências hormonais comprometem o crescimento dos órgãos, porém, na ausência de tais estímulos pouco se sabe como um órgão atinge o tamanho adequado. Mesmo em organismos complexos, o crescimento do tecido se dá ao nível celular, em contraste com o crescimento ao nível do tamanho e forma, que constitui uma propriedade coletiva de um conjunto de células (HARIHARAN et al., 2015). Estudos em *Drosophila* mostraram que estruturas embrionárias transplantadas em adultos, em ambientes heterologo, se desenvolveram de forma normal, mesmo quando a fase larval foi ampliada (BRYANT; LEVINSON 1985; MARTIN; MORATA 2006). O crescimento normal também ocorre independentemente do número de células (HAYNIE; BRYANT 1977). Isso implica que a cessação da proliferação não está limitada pela capacidade proliferativa individual e nem pela localização do órgão. Hoje temos indicação de seis ou sete vias de sinalização envolvidas na regulação do tamanho dos órgãos em *Drosophila* (BACH et al., 2003; LEEVERS et al., 1996; JOHNSTON et al. 1999; PROBER; EDGAR 2000; SAUCEDO et al. 2003), e a via de sinalização HIPPO é uma delas (JUSTICE et al., 1995; XU et al., 1995).

Diferenças de tamanho entre os animais se refletem no tamanho e no número de células. Número de células dependem de proliferação e apoptose que precisam ser cuidadosamente controladas para formar órgãos com número apropriado de células durante o desenvolvimento do tecido, e evitar o crescimento de tumores. Estudos baseados em técnicas de recombinação genica permitiram a identificação de genes que impactam o desenvolvimento de diversos tecidos da *Drosophila melanogaster*, incluindo o tamanho do órgão (CONLON; RAFF 1999; PAN 2007).

Um dos primeiros genes isolado em *Drosophila melanogaster*, associado ao controle do tamanho do órgão foi o warts (wts, também chamado de lats), que codifica uma quinase da família Dbf2(NDR) nuclear. Descrito posteriormente como um supressor tumoral, perda de warts levou a um supercrescimento de órgãos, como: asas, pernas e olhos, além de uma hipertrofia celular, porém sem afetar a determinação do destino da célula no desenvolvimento da *Drosophila* (JUSTICE et al., 1995; PAN 2007).

Por muitos anos, Wts permaneceu sem um regulador a montante ou um um efetor a jusante, esse estado isolado foi alterado pela identificação do gene salvador (sav; também chamado shar-pei) que codifica uma proteína contendo um domínio WW. Mutantes de sav apresentam um fenótipo similares ao de warts (TAPON et al., 2002). Além do aumento da proliferação, perda de warts e sav diminuem a apoptose e aumentam os níveis de reguladores do ciclo celular como a ciclina E e de inibidores de morte como o Diap1 (TAPON et al., 2002).

O maior avanço na elucidação da via Hippo foi a identificação de Hpo, um gene supressor tumoral (PANTALACCI et al., 2003; UDAN et al., 2003; WU et al., 2003) que codifica uma proteína quinase da família Ste-20, cuja perda reflete efeitos similares ao de warts e sav (WU et al., 2003).

O estudo de Wu et al. (2003), identificou os principais genes que compõem a cascata de sinalização que conhecemos hoje, onde Hpo fosforila e ativa Wts, Sav potencializa essa fosforilação e controla os níveis transcricional de Diap1 e não pós-transcricional como havia postulado Tapon et al. (2002) e Pantalacci et al. (2003), representando a primeira explicação do funcionamento da via.

Assim, se a cascata de quinases era capaz de regular a transcrição de genes, deveria existir reguladores transcricionais desempenhando esse papel na cascata. Huang et al. (2005) identificaram o gene do coativador transcricional Yorki (yki), como fosforilado e inativado por wts. Superexpressão de yki levou ao aumento da proliferação celular, enquanto a perda de yki levou a uma atrofia do tecido, completando, assim a cascata proposta por Wu et al. (2003).

O núcleo central de quinases da via de sinalização Hippo possuem componentes altamente conservados durante a evolução e de diversas outras proteínas, já conhecidas, regulando ou sendo reguladas pelos componentes da cascata (JOHNSON; HALDER 2014). A denominação hippo vem do fenótipo resultante da perda da função de componentes da via, responsáveis pelo controle negativo da proliferação celular, gerando um crescimento excessivo que lembra um “hipopótamo”.

A primeira função descrita da via hippo foi a de controlar negativamente o crescimento dos órgãos, contudo, hoje temos evidências que a associam com outros processos, como sobrevivência, diferenciação, manutenção de células tronco e outros (JOHNSON; HALDER 2014; PICCOLO et al., 2014).

A cascada central inicia-se pelas já descritas como supressoras tumorais, as serine/treoninas quinases MST1/2 (homólogo em D. melanogaster, Hpo), Lats1/2 (homólogo em D. melanogaster, Warts) e Salvador (homólogo em D. melanogaster, Sav), uma proteína adaptadora, que interage com MST1/2 e outra adaptadora MOBIA/B (homólogo em D. melanogaster, Mats) quem aciona Lats1/2. Lats1/2 por sua vez fosforila os efetores da cascata, os co-ativadores transcricionais YAP/TAZ (homólogo em *D. melanogaster*, Yki), que são retidos ou degradados por proteossomos no citoplasma, impedidos de translocarem-se para o núcleo e em complexo com TEADs, desencadearem a transcrição de genes alvos. Os TEADs se não estiverem ligados a YAP/TAZ, formam complexos com o cofator transcricional vestigial-like protein 4 (VGLA) que reprimi a expressão de genes que seriam alvos de YAP/TAZ (JOHNSON; HALDER 2014).

Portanto, a via é considerada ativa quando MST1/2 e Lats1/2 estão exercendo sua função quinase e a atividade de YAP/TAZ é inibida (figura 1). Por outro lado, quando a via é inativada, YAP/TAZ acumulam-se no núcleo, onde desencadeiam a expressão de genes, como para a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (figura 1), através da ligação com os fatores transcricionais TEADs (GOULEV et al., 2008; OTA; SASAKI 2008; YU et al., 2015).

Estímulos mecânicos também têm sido associados com a via, como adesão celular, adesão célula-matriz, tensão contrátil e o citoesqueleto de actina, que emerge como um regulador fundamental da via, intermediando forças externas através de proteínas associadas à cascata intracelular (DUPONT et al., 2011; GANEM et al., 2014).

Muitas evidências apontam que a perda da sinalização e/ou a desregulação da via Hippo está presente em muitos canceres humanos (CORDENONSI et al., 2011; HARVEY et al., 2013; STEINHARDT et al., 2008). Estudos realizados em cânceres indicam que os componentes mais upstream da via Hippo agem como supressores tumorais, enquanto o efetor mais downstream teria um papel predominantemente oncogenico. Supressora ou oncogenica, é indiscutível o importante papel da via nos mecanismos envolvidos com o surgimento e o desenvolvimento tumoral (YU et al., 2015).

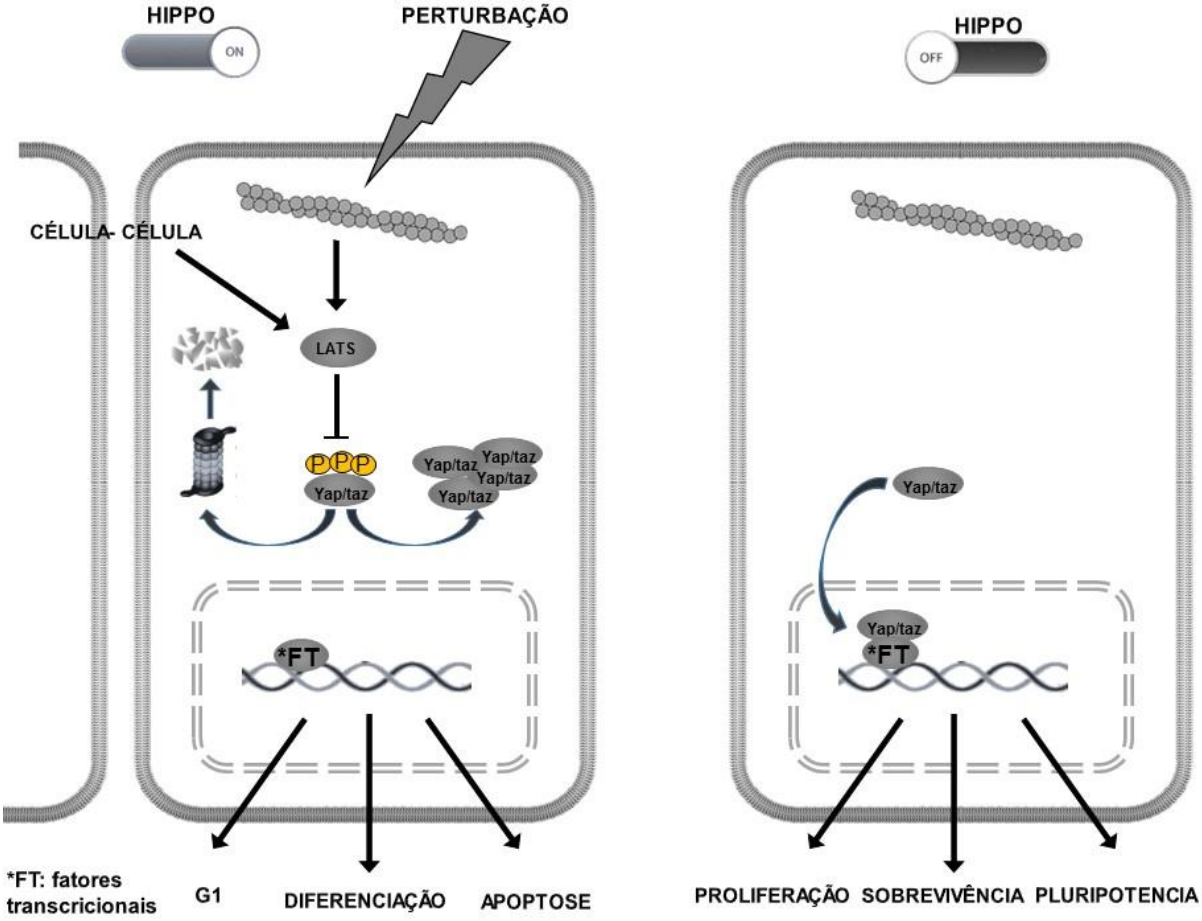


Figura 1 – Esquema simplificado da Via de Sinalização Hippo, baseado na literatura.

1.5 YAP/TAZ NO CÂNCER

YAP/TAZ é o efetor final da via de sinalização Hippo, responsável por promover a transcrição de genes que vão favorecer a proliferação, a manutenção de células tronco e modular a diferenciação (JOHNSON; HALDER 2014). A acumulação nuclear de YAP é determinante para a sua função, porém não depende apenas da fosforilação por Lats, pois YAP fosforilado também pode ser visto no núcleo. Dados sugerem que a fosforilação é uma das vias de exclusão nuclear de YAP/TAZ não necessariamente o primeiro evento, possivelmente dependa de múltiplos fenômenos sua saída do núcleo (WADA et al., 2011)

Diversos estímulos estão sendo associados com a translocação de YAP/TAZ núcleo/citoplasma. Tratamentos com compostos que interferem na polimerização da actina F (Citocalasina ou latrunculina) que reduzem as fibras de estresse, provocam a acumulação nuclear de YAP. O mesmo foi observado com inibidores da miosina II

(blebbistatina). Sugerindo que a conformação das fibras de estresse, através da modificação da estrutura da actina-F regula a atividade de YAP (MANA-CAPELLI et al., 2014; WADA et al., 2011).

Outras evidências apontam que células tetraploides, originadas de falha na citocinese, ativam a via hippo, fazendo com que Lats fosforile YAP/TAZ, obrigando-o a sair do núcleo e interrompendo a proliferação celular. Nesse mesmo cenário celular, outro trabalho recente, mostrou que a ativação de YAP, aumenta a poliploidia, decorrente de falhas na citocinese, isso se deu pelo incremento de p27, regulador desse mecanismo. Em Ambos os casos temos YAP e/ou TAZ envolvidos em mecanismos de indução ou de resposta na formação de células tetraploides, no primeiro caso, foi suficiente a restauração de um antagonista de Lats para as células retomarem a proliferação, no segundo, os ensaios foram realizados em hepatócitos não tumorais, comumente poliploides, estado que favorece a fisiologia do fígado. Esses dados levam a crê que a via está intimamente vinculada no desenvolvimento e manutenção do estado tetraploide, restando estabelecer por quais mecanismos essa atuação ocorre e como é modulado (GANEM et al., 2014; NAKAYAMA et al., 2004; ZHANG et al., 2017).

Muitas evidências apontam que a tetraploidia favorece a iniciação da NCI, está por sua vez, intermedeia a formação de células aneuploides e o desenvolvimento tumoral. Assim como, encontramos YAP/TAZ associado tanto na manutenção tumoral como na tumorigênese. A influência de YAP e/ou TAZ nesses processos não pode ser justificada por mutações nos genes que codificam os componentes da via de sinalização Hippo, com exceção de NF2 (codifica Merlin), mutações somáticas nos componentes principais da via são raras (HARVEY et al., 2013; PICCOLO et al., 2014).

Dados clínicos mostram que altos níveis da expressão de TAZ implicam numa menor sobrevida do paciente e numa maior resistência a quimioterapia (BARTUCCI et al., 2015). Em amostras de mama, a expressão de TAZ foi mais elevada nos tumores mais agressivos, e que seu aumento em cultura celular realça a formação de mamoesferas, cujo injetado promoveu o crescimento tumoral *in vivo*. Esses dados ressaltam que TAZ pode ser um possível candidato a fator de prognóstico e um futuro alvo terapêutico (CORDENONSI et al., 2011). Recentemente outro estudo associou YAP com AMOTL1 em câncer de mama. Estimulado por YAP, AMOTL1 promove a

migração e o crescimento tumoral, sugerindo com isso que a via Hippo pode também influenciar o grau de invasividade tumoral (COUDERC et al., 2016).

No entanto, muitas exceções têm sido descritas. YAP é frequentemente deletado em canceres hematopoiéticos, e sua restauração leva a morte celular tanto *in vivo* como *in vitro* (COTTINI et al., 2014). Bem como em linhagens tumorais de mama, onde o knockdown de YAP resultou em sobrevivência, aumento na migração e invasão celular (YUAN et al., 2008). Enquanto, outro componente mais upstream da via, mostrou-se favorecer o crescimento de tumores prostáticos (STAUFFER et al., 2016), contradizendo o modelo proposto inicialmente, que os componentes mais a montante seriam supressores tumorais e o efetor final da via, YAP, teria um papel oncogenico. Muitos eventos podem estar relacionados com o caráter desempenhado pela via, tipo de tecido, microambiente, estágio de desenvolvimento, muitos estímulos podem influenciar o papel representado pela via, bem como outras vias de sinalização podem modular componentes específicos de forma não canônica e favorecer uma resposta ou ação não ainda não esperada, em razão da complexidade de funções, já descritas, que a via pode atuar.

Diante dessa diversidade de mecanismos que envolvem a via de sinalização Hippo, podemos pressupor que a continuidade dos estudos trará novas contribuições para o desenvolvimento de terapias menos invasivas aos pacientes, diagnósticos mais eficientes e ainda mais precoces, e sobretudo informações que promovam o progresso do conhecimento na área da biologia celular.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTURA CELULAR

Neste trabalho foram utilizadas a linhagem MCF-7 (figura 2), proveniente de adenocarcinoma mamário, estabelecida por Soule et al., 1973 e a linhagem A549 (figura 3), estabelecida por D.J. Giard et al, em 1972, ambas obtida atraves da ATCC (American type culture collection cell line and hybridomas, EUA). As células foram mantidas em DMEM – F12 (Dulbecco,s Modified Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), em atmosfera controlada com 95% de ar e 5% de CO2 a 37 ºC. As subculturas serão realizadas a cada 2 ou 3 dias por meio de digestão enzimática contendo solução de tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02%.

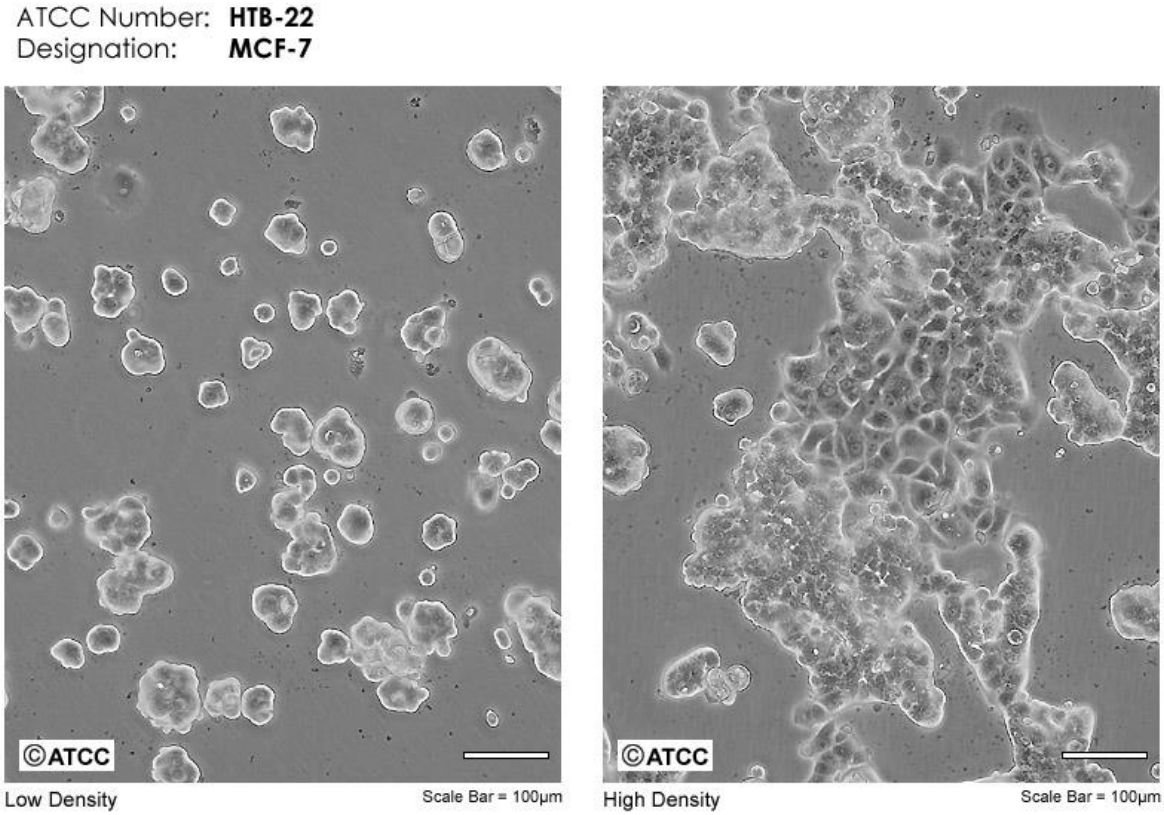


Figura 2 - Imagem da linhagem celular MCF-7, retirada do site da ATCC, fornecedora da linhagem.

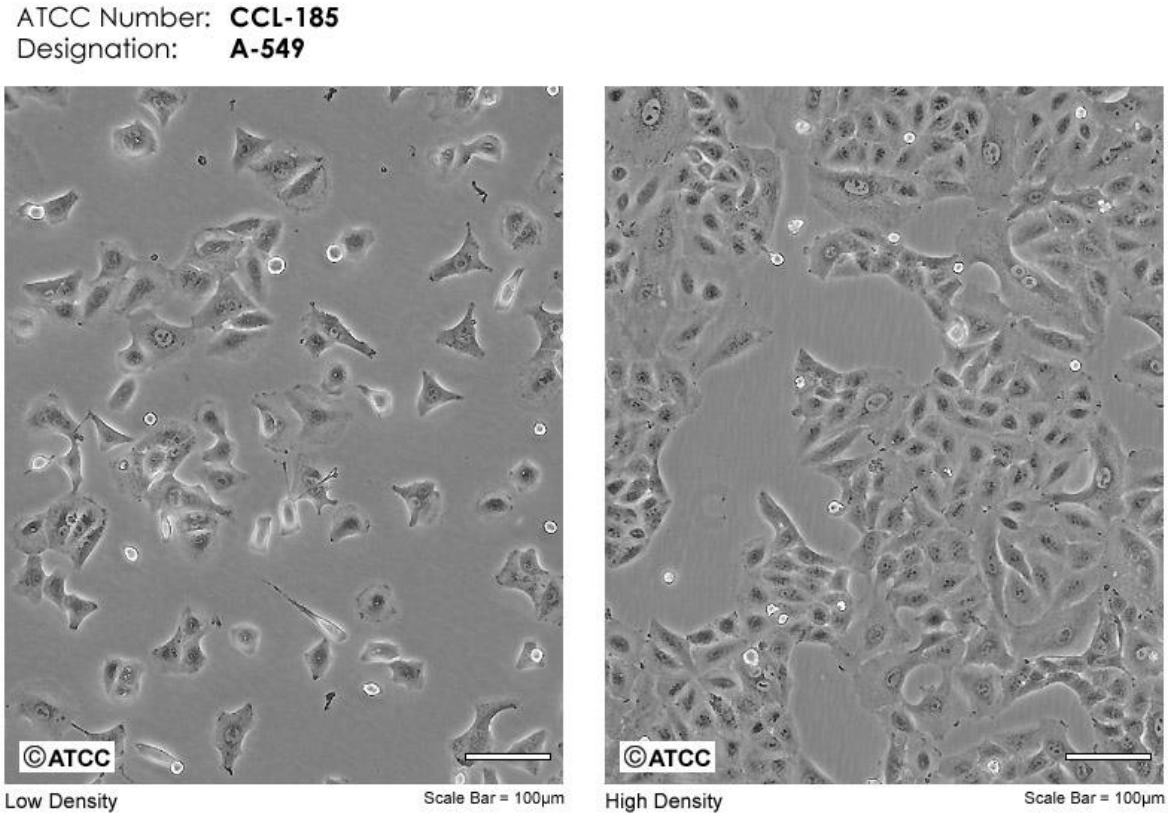


Figura 3 - Imagem da linhagem celular A549, retirada do site da ATCC, fornecedora da linhagem.

2.2 TRATAMENTO SEQUENCIAL DE MONASTROL E BLEBBISTATINA

Para a amplificação da população celular com ganho de ploidia, utilizamos um tratamento, consistindo na administração de Monastrol por 15 horas, que inibe a atividade da proteína Eg5, envolvida na movimentação dos centrossomos e formação do fuso bipolar (KAPOOR et al., 2000; MALIGA et al., 2002). Seguido por Blebbistatina que interage com a miosina II, não muscular, responsável, juntamente com a actina pela formação do anel contrátil durante a citocinese (KOVÁCS et al., 2004). Como resultado do tratamento observamos o aumento da frequência de células com ganho de ploidia, representadas nas fases G2/M do ciclo celular e da hipertetraploide, com >4C (figura 7 e 8). O tratamento foi estabelecido anteriormente por nosso grupo (ROSA et al., 2011).

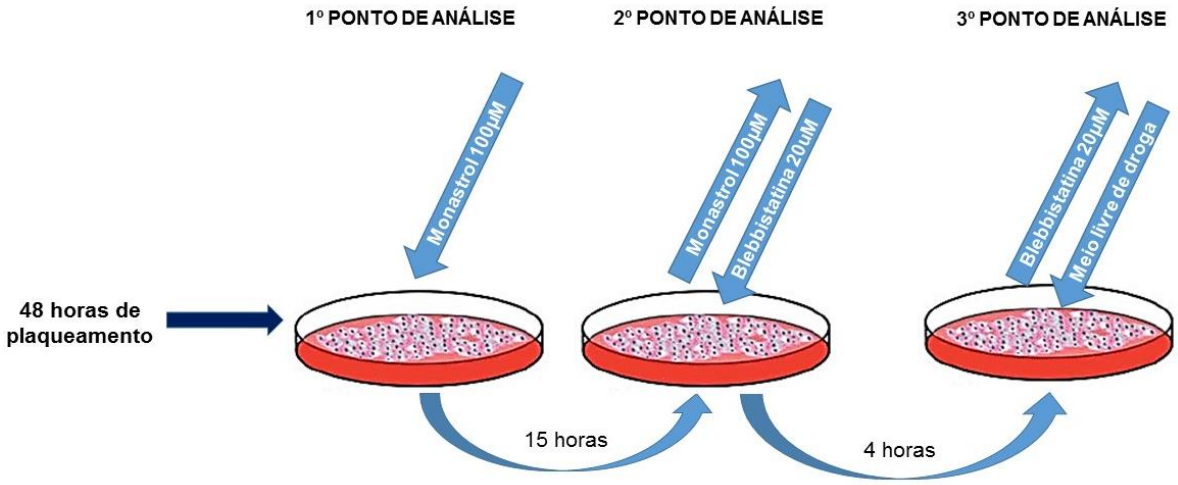


Figura 4 - Esquema do tratamento seqüencial de Monastrol e Blebistatina em células MCF-7 e A549.

2.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

As células foram semeadas na densidade de $1X10^4$ em placas de petri de 35 milímetros, com lamínulas previamente esterilizadas, depois de submetidas ao tratamento sequencial, vide figura 4, foram lavadas 3 vezes com PBSA estéreo e aquecido a 37 ° C, fixadas com paraformaldeído a 3,7% por 20 minutos, novamente as células foram submetidas a 3 lavagens sucessivas com PBSA. Para interromper o efeito do fixador, foram deixadas em BSA por 10 minutos. Ao término do processo de

fixação as células foram armazenadas a 4º C. As imagens foram adquiridas em microscópio de contraste de fase. Nas imagens de fluorescência foi utilizado Iodeto de Propideo para marcação do DNA.

2.4 q-PCR em tempo real

A extração de RNA foi realizada usando ChargeSwitch Total de Kits de RNA. O RNA foi quantificado usando um Espectrofotômetro NanoDrop ND1000. Os níveis de expressão foram determinados por análise q-PCR em tempo real (Corbett Research - Rotor Gene 6000 em tempo real de ciclista). As condições de q-PCR foram Da seguinte forma: 45 °C durante 10 minutos, 95 °C durante 15 minutos e 40 Ciclos 95 °C por 15 segundos; Tm °C por 20 segundos; 72 °C para 30 segundos. Após a derretimento. A normalização foi feita contra ARN total. Os iniciadores utilizados foram os Seguinte:

qAURKA_Right GACCACCCAAAATCTGC	qAURKA_Left TGGAATATGCACCACTTGGA (Tm55 °C)
qCICLINB1_Right AAACATGGCAGTGACACCAA	qCICLINB1_Left CGGGAAGTCACTGGAAACAT (Tm55 °C)
βACTIN_Right CATGAGGTAGTCAGTCAGGT	βACTIN_Left ATGACCCAGATCATGTTTGAG (Tm53 °C)
qhYAP_Right TATTCTGCTGCACTGGTGGA	qhYAP_Left CACAGCTCAGCATCTTCGAC (Tm56 °C)
qhTAZ_Right CCCCTCATTCTCTGCTTGGA	qhTAZ_Left TCCAATCACCAGTCCTGCAT (Tm 56 °C)
qLATS_Right GAGGCTGAGGTGGGGATATA	qLATS_Left CACTGCATCCTCAACCTTGG (Tm 56 °C)

2.5 WESTERN BLOTTING

As células foram semeadas em placas de Petri de 60 milímetros de diâmetro a uma densidade inicial de $5x10^5$ células por placa. Nos dias de interesse, as células foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1,0%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50 mM-HCl, pH=7,5) contendo inibidores de protease (mix da Sigma- Aldrich). Após centrifugação (12000 g) por 5 minutos a 4 ºC, o sobrenadante foi coletado e após quantificadas, através do método BCA. A leitura da absorbância foi realizada por leitor de ELISA utilizando filtro de 595 nanômetros (nm). O fracionamento das proteínas foi realizado em mini-gel de poliacrilamida 12% com SDS (2 horas e 120 V) em tampão de corrida (Tris 0,25 M, Glicina 1,92 M, 2% de SDS - em água miliQ em pH: 8,3). Para tal as amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH= 6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e betamercaptoetanol 1% em água milliQ) e fervidas por 5 minutos a 100 ºC. Em cada poço foram carregados 60 ug de proteína total. O padrão de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Protein Standards – Dual core Bio-Rad.

A transferência para membrana de PVDF (Amersham Pharmacia) foi realizada por 2 horas a 200 mA em tampão de transferência (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20% em água destilada). A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana em solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada em TBS 0,02 M por 3 vezes de 10 minutos cada. O bloqueio foi realizado com TBS 0,02M contendo 1% de albumina e Tween 20 (Pharmacia) 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio os anticorpos primários de interesse foram diluídos em TBS 0,02 M e 1% de albumina, incubados overnight a 4 ºC sob agitação. Após as sucessivas lavagens com TBS e TTBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (1:1000) (Kit ECL, Amersham Pharmacia) e revelada por quimioluminescência (ECL, Amersham Pharmacia), utilizando-se o sistema ChemiDoc™ XRS+ imaging, disponibilizado pelo Prof. Dr. Luís Mário Janini (UNIFESP), conforme especificações do fabricante, os resultados foram registrados em imagens. Para o controle da concentração de proteínas carregadas por poço foi utilizada GAPDH (1:1000, Sigma – Aldrich) e αTubulina (1:1000, Sigma – Aldrich).

2.6 CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise do ciclo celular foi realizada através da detecção do conteúdo de DNA das células após coloração por iodeto de propídio. Para tanto as células foram destacadas por tripsina, centrifugadas a 1200 rpm por 8 minutos, lavadas com 1 mililitro de PBSA e novamente centrifugadas. Ao final fixadas em metanol gelado diluído em PSBA (3:1) por 1 hora, lavadas com PBS e centrifugadas, ressuspendidas em uma mistura de 200 µL de PBS + 20 µL de RNAse (10mg/mL) + 20 µL de Iodeto de Propídeo. Após 1 hora as amostras foram adquiridas através do sistema Guava (GE), onde foram analisados 5.000 eventos a cada leitura em três experimentos independentes.

2.7 FUCCI (indicador de ciclo celular à base de ubiquitinação)

As células foram transfectadas utilizando o kit Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor Works (Life Technology), que consiste em um sistema baseado em proteínas fluorescentes (vermelho–RFP e verde-GFP) fundidas com cdt1 e geminina, respectivamente (SAKAUE-SAWANO et al., 2008). Dois substratos diretos dos complexos APC^{Cdh1} e SCF^{Skp2}. Geminin e Cdt1, estão envolvidos na regulação do complexo pré-replicativo (NISHITANI et al., 2000), a proteólise e a inibição mediada pela Geminina de Cdt1 são essenciais para prevenir a replicação. Devido à ubiquitinação dependente do ciclo celular, os níveis da proteína Geminin e Cdt1 oscilam inversamente. Os níveis de Cdt1 são mais elevados durante a fase G1, enquanto os níveis de Geminina são mais altos durante as fases S, G2 e M (NISHITANI et al., 2004). A ubiquitinação de Cdt1 expressa a fluorescência vermelha, indicando a fase G1 do ciclo celular. Geminina, indicadora da fase G2/M, será expressa em verde. A fase S será possível verificar pela sobreposição de ambas fluorescências, expressa em amarelo (figura 5).

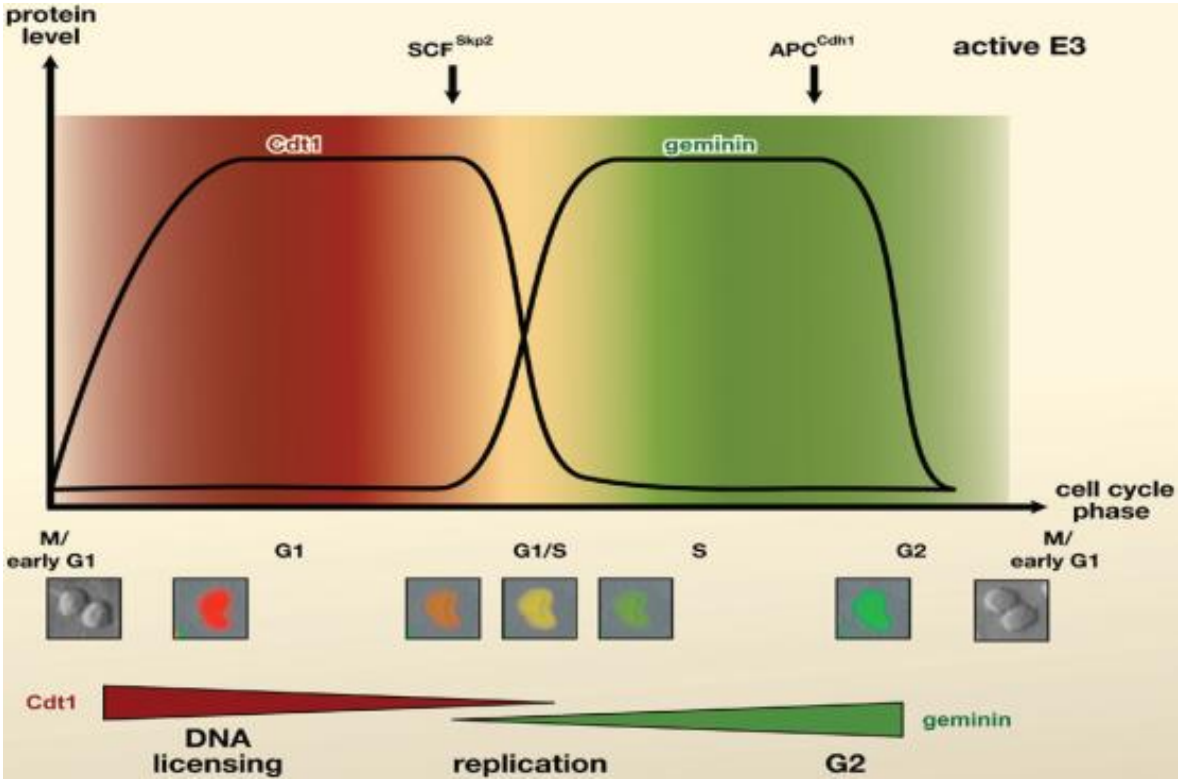


Figura 5 – Esquema explicativo da técnica FUCCI, utilizando-se o Kit™ FUCCI Cell Cycle Sensor Works (Life Technology) (MÉCHALI; LUTZMANN 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 TRATAMENTO COM MONASTROL

Aneuploidia é uma condição celular intrigante, encontra-se presente o desenvolvimento normal e a sáude do organimo, mas intrinsicamente associada a condições patológicas. Diante da dificuldade da manutenção de células com perda de DNA em cultura, a maioria dos estudos concentram-se no ganho de material genético. No entanto, um estudo recente demonstrou que ambas condições, ganho ou perda, leva a efeitos bastantes similares (BEACH et al., 2017). Tendo em vista a necessidade do estudo de células aneuploides, propomos neste trabalho um esquema de tratamento capaz de produzir populações celulares nessas condições. O primeiro composto utilizado foi o monastrol, que tem como alvo a proteína motora Eg5, responsável pela separação dos centrossomos na formação do fuso mitótico. O monastrol não interfere na replicação dos centríolos, nem na organização centrossomal, no entando, pode levar a formação de ligações sintélicas (KAPOOR et al., 2000), nas quais ambas cromátides irmãs apresentam-se ligadas a microtúbulos do mesmo pólo. A inibição da separação dos centrossomos na mitose leva a formação de fusos mitóticos monopolares e consequentemente pode acarretar numa população com ganho ou perda de material genético, durante a migração dos cromossomos, como observado na citometria de fluxo realizada neste trabalho (figura 6A).

Determinamos o período de 48 horas após o plaqueamento para iniciarmos o procedimento (figura 6), no qual obtivemos maior aumento da população G2/M, aproximadamente 20%. A quantidade do composto e o tempo de exposição já havia sido definido anteriormente por nosso grupo (ROSA et al., 2011).

O tratamento com monastrol resultou em formações semelhantes às células em mitose (figura 7B). Estas figuras mitóticas foram confirmadas em preparações coradas por iodeto de propideo e observadas ao microscópio de fluorescência. É interessante observar que eram raras as figuras de anafase e telófase nestas culturas, ao contrario dos controles (figura 7D). Estruturas em forma de “roseta” (figura 7D, E) foram mais frequentes em relação aos controles (figura 7C), formação típica observada após o tratamento com monastrol (KAPOOR et al., 2000).

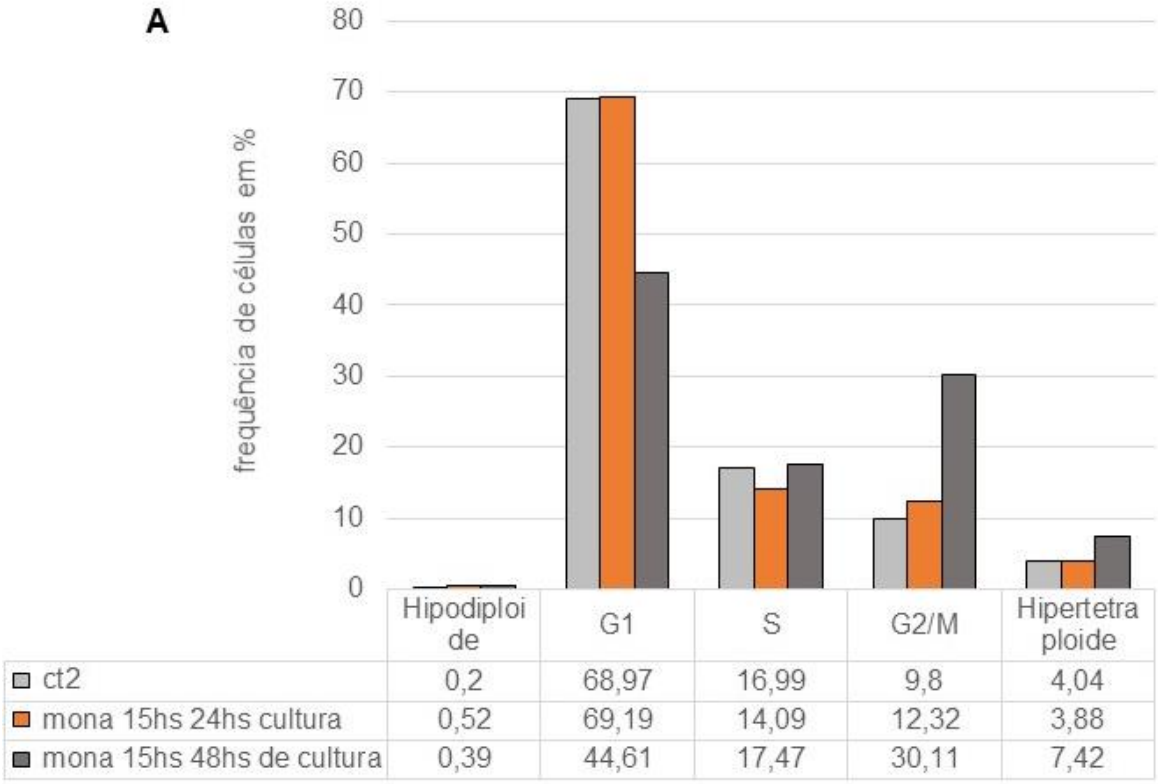


Figura 6 – Gráfico e imagens do tratamento com Monastrol. (A) gráfico da distribuição celular segundo a quantidade de DNA, corado com iodeto de propídeo.

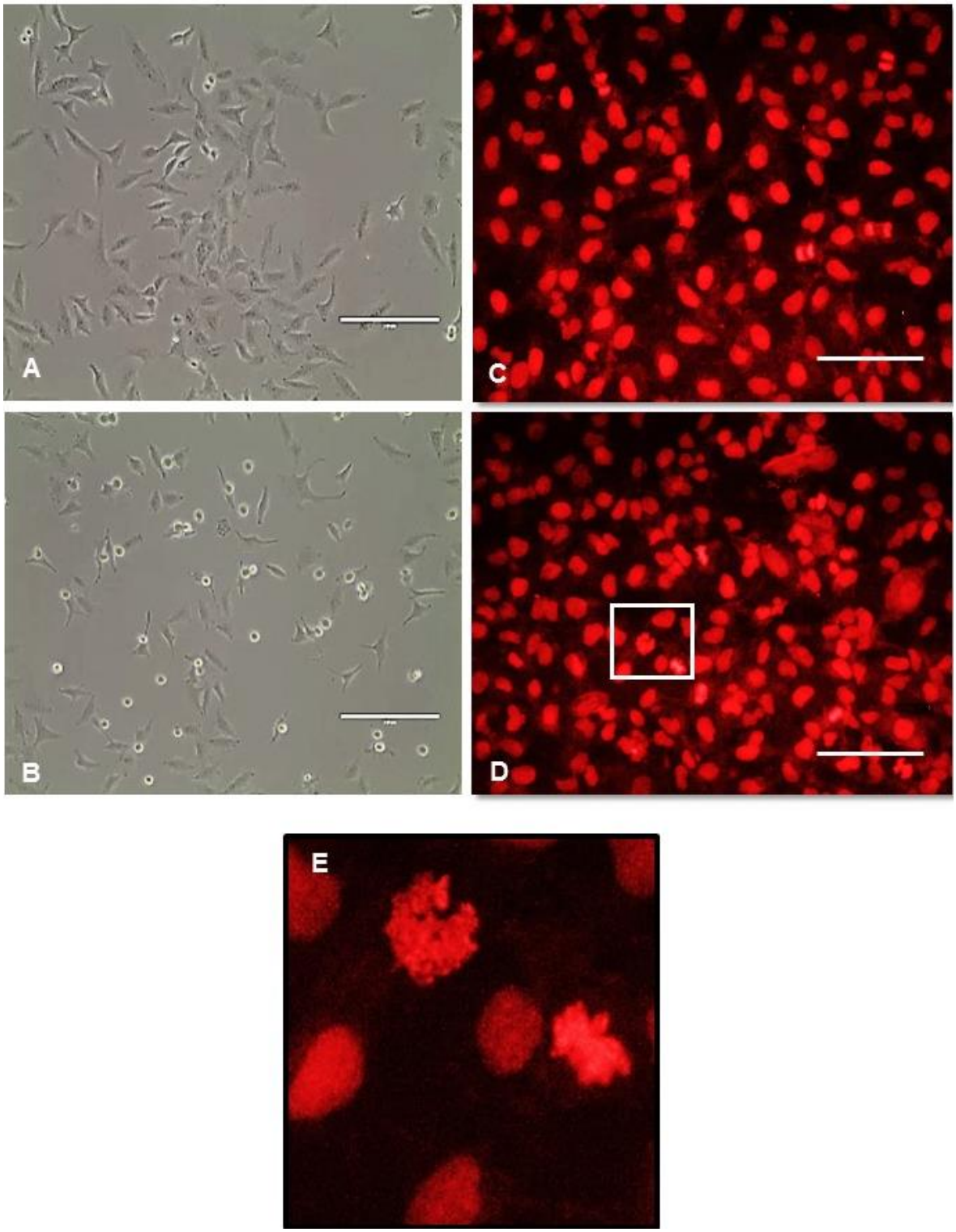
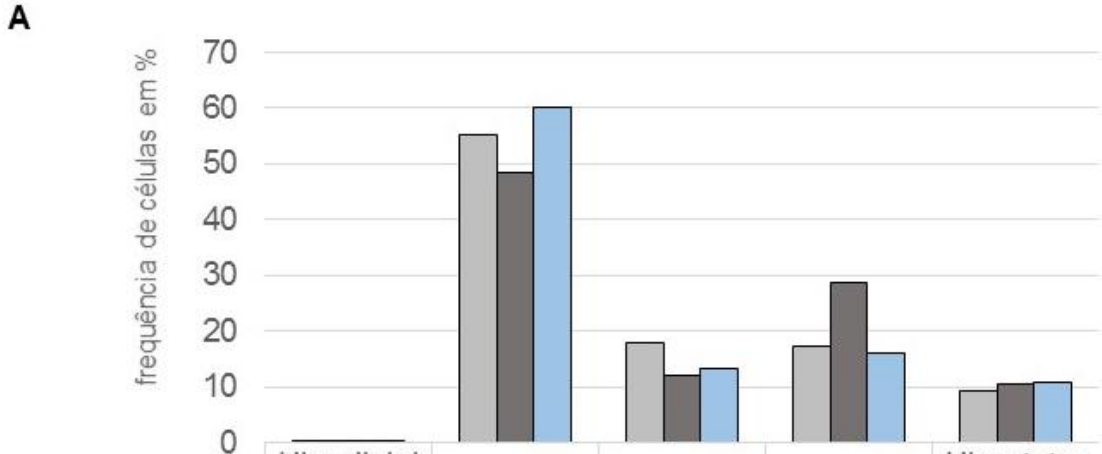


Figura 7 – Fotomicrografia em microscopia da linhagem celular A549, (A) Controle (objetiva de 20X); escala: 200 µM. (B) População tratada com monastrol por 15 horas (objetiva de 20X); escala: 200 µM. (C, D, E) Fluorescência da linhagem celular A549 submetidas ao tratamento com Monastrol, obtidas por microscopia fluorescente, evidenciando núcleo em vermelho. (C) controle; (D) tratada com monastrol; (E) detalhe: cromossomos distribuídos em formatos de “rosetas”.

3.2 EFEITO DO TRATAMENTO SEQUENCIAL DE MONASTROL E BLEBBISTATINA NO CICLO CELULAR

Uma vez que os efeitos com monastrol foram confirmados, amento da frequência de células em G2/M. Iniciamos as avaliações por citometria de fluxo do procedimento completo, já estabelecido anteriormente pelo nosso grupo (ROSA et al. 2011). Primeiramente as populações celulares foram tratadas com o monastrol por 15 horas, seguido por blebbistatina por 4 horas. A blebbistatina tem como alvo a inibição da miosina II, impedindo a formação do anel contrátil e consequentemente o bloqueio da citocinese, favorecendo assim, a formação de células com duplicação do DNA. Na linhagem MCF-7, observamos nos histogramas de citometria de fluxo (figura 8C), a ampliação da população em G2/M, que representa a população com duplicação de DNA, de aproximadamente 13%, em relação ao controle e a fase G1(figura 8A), não foi observada alterações significativas nas populações recuperadas por 48 horas (figura 8A).

Adotamos outra linhagem A549, em razão da impossibilidade de transfectar a linhagem MCF-7 com a técnica FUCCI. Ampliamos o tempo de recuperação para 72 horas (figura 9A) e acrescentamos mais um ponto para a análise (figura 9A, C). Ao final do tratamento sequencial, com ambos os compostos, observamos um incremento de aproximadamente 6% na população G2/M (figura 9A, D) e na população recuperada de 10%, em relação ao controle (figura 9A, E). Na população hipertetraploide, obtivemos os seguintes resultados: tratamento com o monastrol e blebbistatina de 10% e na população recuperada 26% (figura 9A), em relação aos respectivos controles. Assim, o tratamento se mostrou eficaz na expansão de células com ganho de DNA em ambas as linhagens, sobretudo, na população submetida a maior tempo de recuperação, sugerindo que o tratamento utilizado, promova a iniciação e o estabelecimento de uma NCI nas populações tratadas, condição observada na exposição ao maior tempo de recuperação (figura 9D). Esses dados confirmam a literatura, relacionando a NCI, ou de outro modo, o contínuo ganho ou perda de material genético, na promoção de células aneuploides ao longo das sucessivas divisões celulares (GANEM et al., 2007; SHENK; GANEM 2017). Indicando, assim, que o tratamento pode ser um mecanismo eficiente no estudo da NCI por tempo prolongado em cultura.



	Hipodiploide	G1	S	G2/M	Hipertetraploide
controle	0,08	55,27	18,00	17,29	9,36
monastrol 15hs e blebbistatina 4hs	0,26	48,35	12,15	28,81	10,43
Recuperação 48hs	0,29	60,18	13,21	15,92	10,82

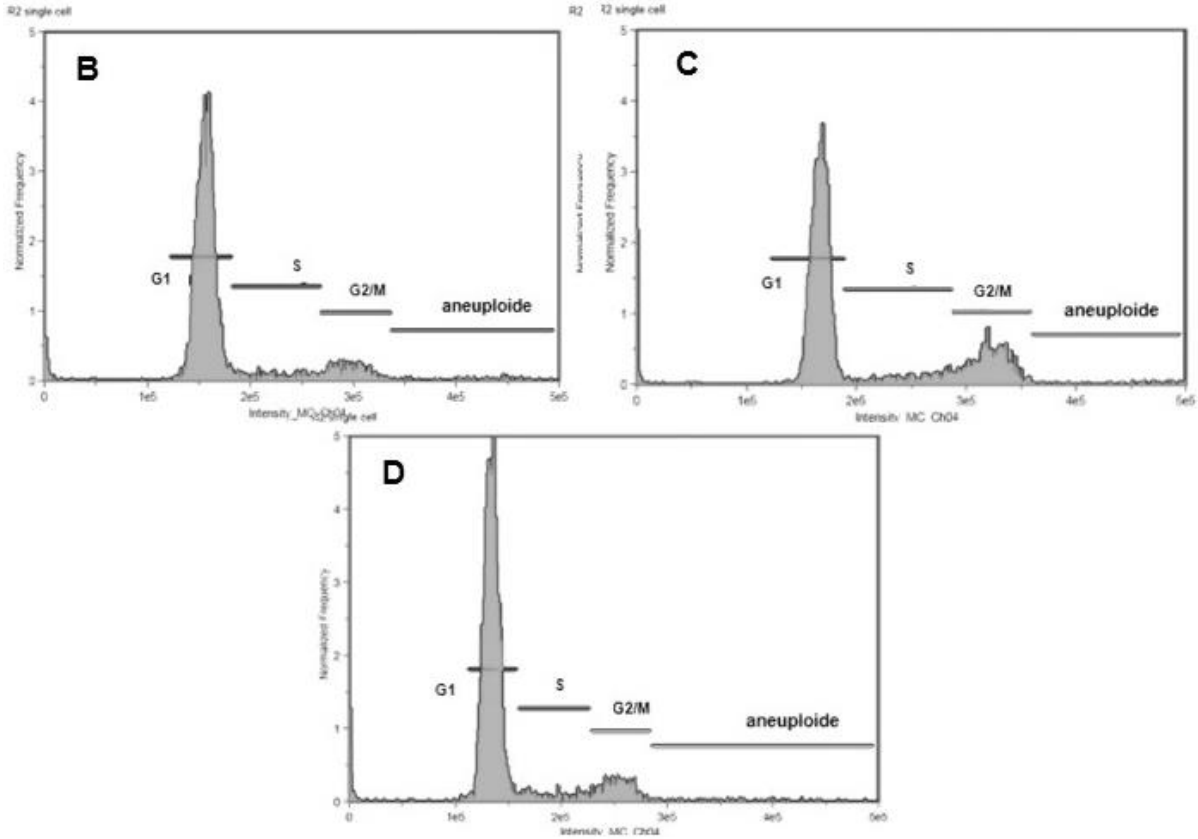
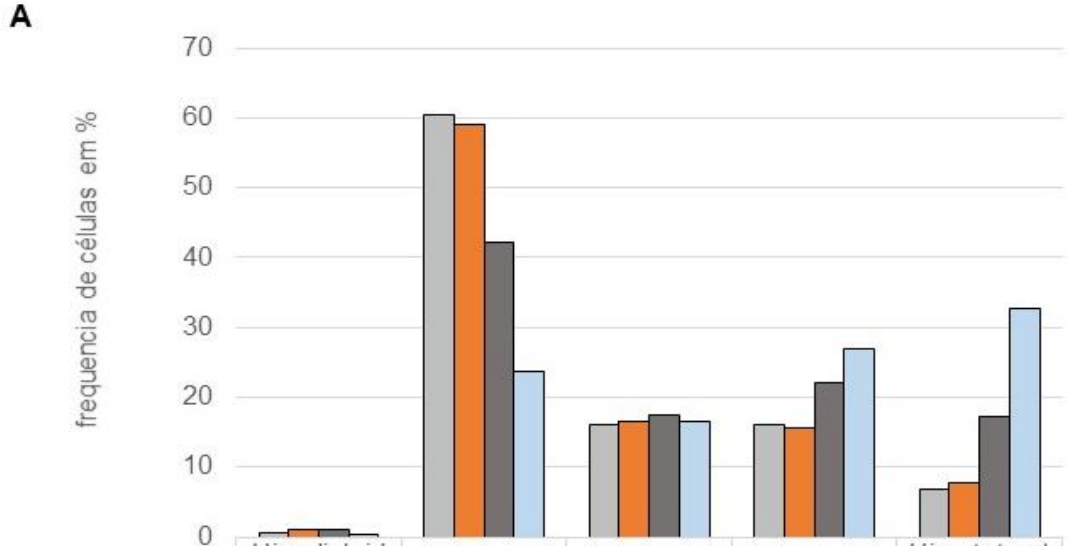


Figura 8 - Ciclo celular da linhagem MCF-7. A: distribuição celular segundo a quantidade de DNA, corado com iodeto de propídeo, analise realizada no Microsoft Excel. B: população controle. C: População tratada com monastrol 100 µM por 15 horas, seguida por blebbistatina 20 µM por 4 horas. D: população recuperada por 48 horas. Histogramas obtidos a partir de amostras analisadas e adquiridas em citometria de fluxo AMNIS.



	Hipodiploide	G1	S	G2/M	Hipertetraploide
controle	0,63	60,47	16,14	16	6,77
monastrol 15hs	1,12	59,06	16,55	15,5	7,76
monastrol 15hs e blebbistatina 4hs	0,94	42,25	17,45	22,12	17,25
recuperacao 72hs	0,35	23,59	16,61	26,81	32,64

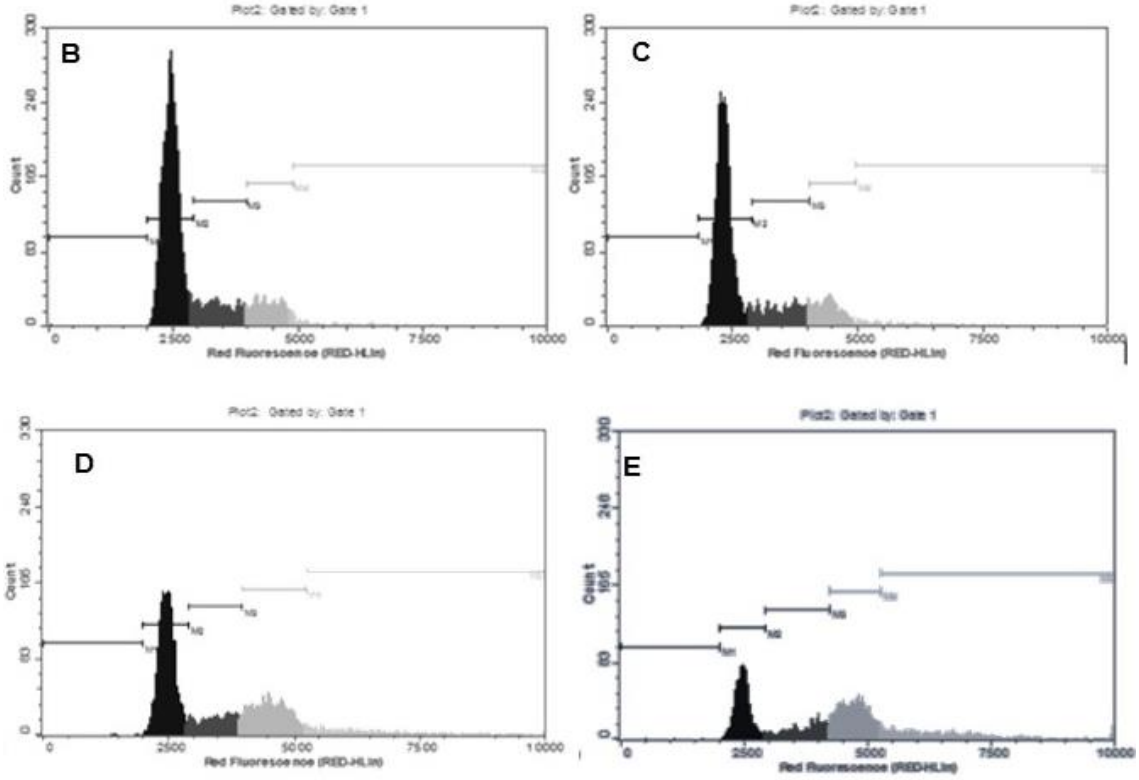


Figura 9 – Ciclo celular da linhagem A549. A: gráfico da distribuição celular segundo a quantidade de DNA, corado com iodeto de propídeo, analise realizada no Microsoft Excel. B: controle. C: tratamento com monastrol 100µM por 15 horas. D: tratamento com monastrol 100µM, seguido por blebbistatina 20µM 4 horas. G: população recuperada por 72 horas, gráficos obtidos a partir de amostras adquiridas em citometria de fluxo GUAVA.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS COM + DE 1 NÚCLEO

Afim de qualificar a população com aumento de ploidia, realizamos a quantificação das células com + de 1 núcleo, especificamente das fases de interesse G2/M e hipertetraploide, ambas com aumento nos ensaios de ciclo celular em relação ao controle (figura 8, 9). Para determinarmos se as populações em G2/M e hipertetraploide, representavam populações com aumento no número de núcleos ou com ganho de material genético, quantificamos os núcleos nas imagens produzidas na citometria de fluxo AMNIS (figura 10). Nesses ensaios foram adquiridos 5000 eventos de cada amostra, a partir das imagens de cada evento, as células foram separadas em monucleadas e com + de 1 de núcleo (figura 10). Observamos na quantificação, que o tratamento utilizado não amplia a quantidade de núcleos e sim o ganho de material genético, provavelmente de cromátides inteiras, decorrentes das ligações sintélicas (figura 10, 11), decorrente do tratamento com monastrol, assim o sistema se mostrou específico para o estudo da instabilidade genética *in vitro*, sem a necessidade de promover a formação inicial de células tetraploides binucleadas (GANEM et al., 2007; SHENK et al., 2016).

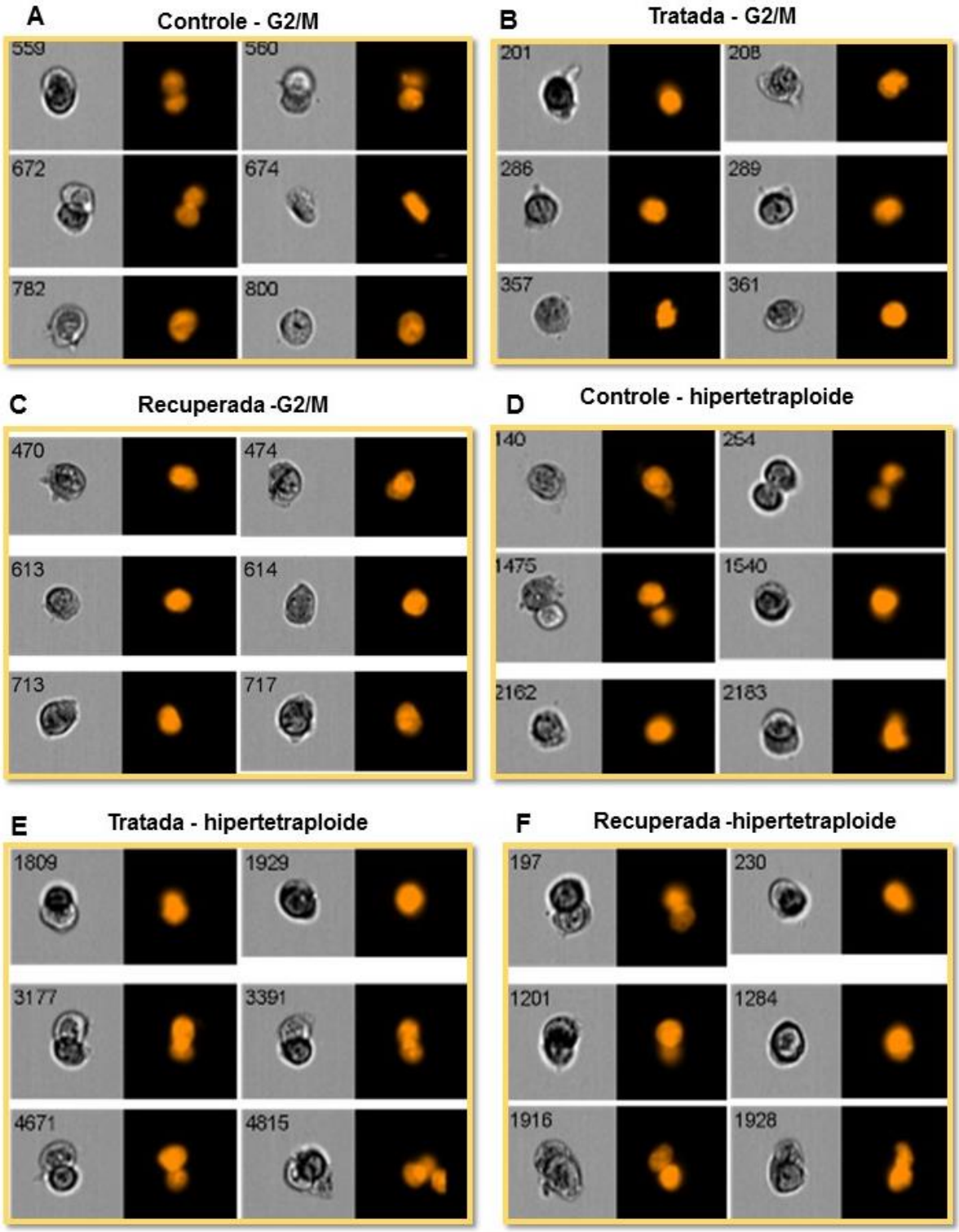


Figura 10 - Imagens de citometria de fluxo Amnis. A: população controle, pico G2/M. B: população tratada com monastrol 15 horas e blebbistatina 4 horas, pico G2/M; C: população recuperada por 48 horas, pico G2/M. D: população controle, pico aneuploide. E: população tratada com monastrol 15 horas e blebbistatina 4 horas pico aneuploide. F: população recuperada por 48 horas, pico aneuploide. Imagens obtidas a partir de amostras analisadas e adquiridas uma a uma em citometria de fluxo AMNIS, das quais foram quantificadas as células.

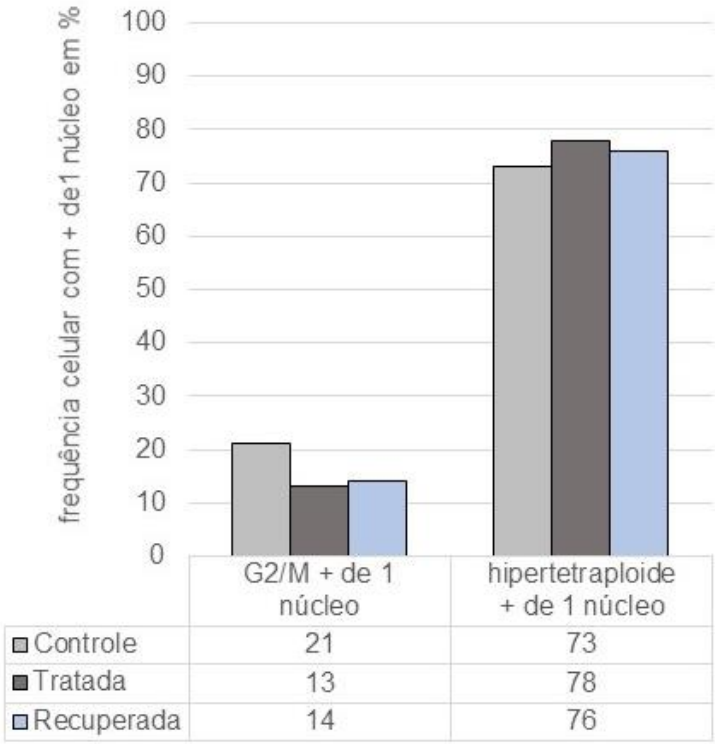


Figura 11 – Quantificação de núcleos. A: quantificação de células com + de 1 núcleo em G2/M e hipertetraploide. Grágico obtido a partir de amostras adquiridas em citometria de fluxo AMNIS.

3.4 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO CELULAR (FUCCI)

A fase do ciclo celular foi avaliada após o tratamento sequencial. Utilizamos a técnica (FUCCI), indicador de ciclo celular por ubiquitinação fluorescente, na qual proteínas específicas de fases distintas do ciclo expressam uma cor correspondente, vermelho ou verde, à medida que são ubiquitinadas. A Cdt1(fluorescência em vermelho), está associada à montagem do complexo pré-replicativo, indicativa da fase G1, e a proteína geminina (fluorescência em verde), indicativa da fase G2/M. As populações celulares foram plaqueadas, transfectadas, segundo especificações do kit Premo™ FUCCI Cell Cycle Sensor Works, e submetidas ao tratamento sequencial. Ao término do tratamento, o meio foi substituído por meio livre de drogas. As populações foram mantidas sob condições de cultura no equipamento INCELL (CEFAP-multiusuário) e acompanhandas por 48 horas, as imagens foram adquiridas a cada uma hora. Nas primeiras horas de recuperação, não observamos indicação fluorescente, sugerindo que as células submetidas ao tratamento sequencial estivessem em G0, ou que a expressão da fluorescência ainda fosse baixa para ser

detectada. Após 12 horas de recuperação, vê-se que a fluorescência em vermelho começa a ser visível (figura 12). Acompanhando a sequência de imagens, observamos que a população transfectada progride no ciclo, às 23 horas de recuperação, observamos a maior expressão da fluorescência verde, indicando que a maioria das células, que efetivamente foram transfectadas, estejam em G2/M, neste momento, aparentemente sincronizadas (figura 12). Na imagem seguinte, vemos células em distintas fases do ciclo. Em vermelho, indicação de G1, amarelo onde ambas fluorescências se sobrepõem, indicando a fase S e em verde, em G2/M (figura 12). Como só foi possível observarmos fluorescência após 12 horas de recuperação, não temos dados suficientes para afirmar a fase do ciclo celular logo após o término no tratamento, sugerimos G0, por não haver fluorescência visível, indicando que o tratamento geraria uma parada no ciclo, que foi retomado após a interrupção por meio de cultura sem os compostos. O ensaio aqui realizado exigiria uma maior disponibilidade do equipamento, situação complicada num equipamento multiusuário. Seria interessante acompanhar as populações celulares do início ao final do tratamento, para determinarmos em qual momento o tratamento efetivamente interferiu no destino celular e induziu a parada em G0. Como seria mais dispendioso, optamos por acompanhar somente o período de recuperação de 48 horas. Com relação à população controle, observamos a fluorescência em verde, fase G2/M, após 12 horas de recuperação aumentando nas imagens subsequentes (figura 13), sugerindo que o tratamento interfere no destino celular e a contínua exposição aos compostos, poderia levar a morte celular, situação observada quando expusemos as células por 24 horas sob o tratamento com monastrol (dados não mostrados). Sabe-se que a morfologia, decorrente da alteração da densidade *in vitro*, pode afetar a sinalização que determina o destino da célula, de progredir ou não no ciclo (MAMMOTO; INGBER 2009), no entanto, o estímulo gerado pelos compostos influenciou de algum modo essa sinalização. Notamos que mesmo em baixa densidade, a população tratada encontra-se parada em G0, contudo, com a supressão do tratamento, as células foram estimuladas a voltar e a progredirem no ciclo, conforme vemos na figura 12, fluorescência verde, após 23 horas de recuperação, indicando que as interferências nos eventos mitóticos não foram suficientes para desencadear a morte celular e que as alterações de ploidia não afetaram a proliferação (figura 12).

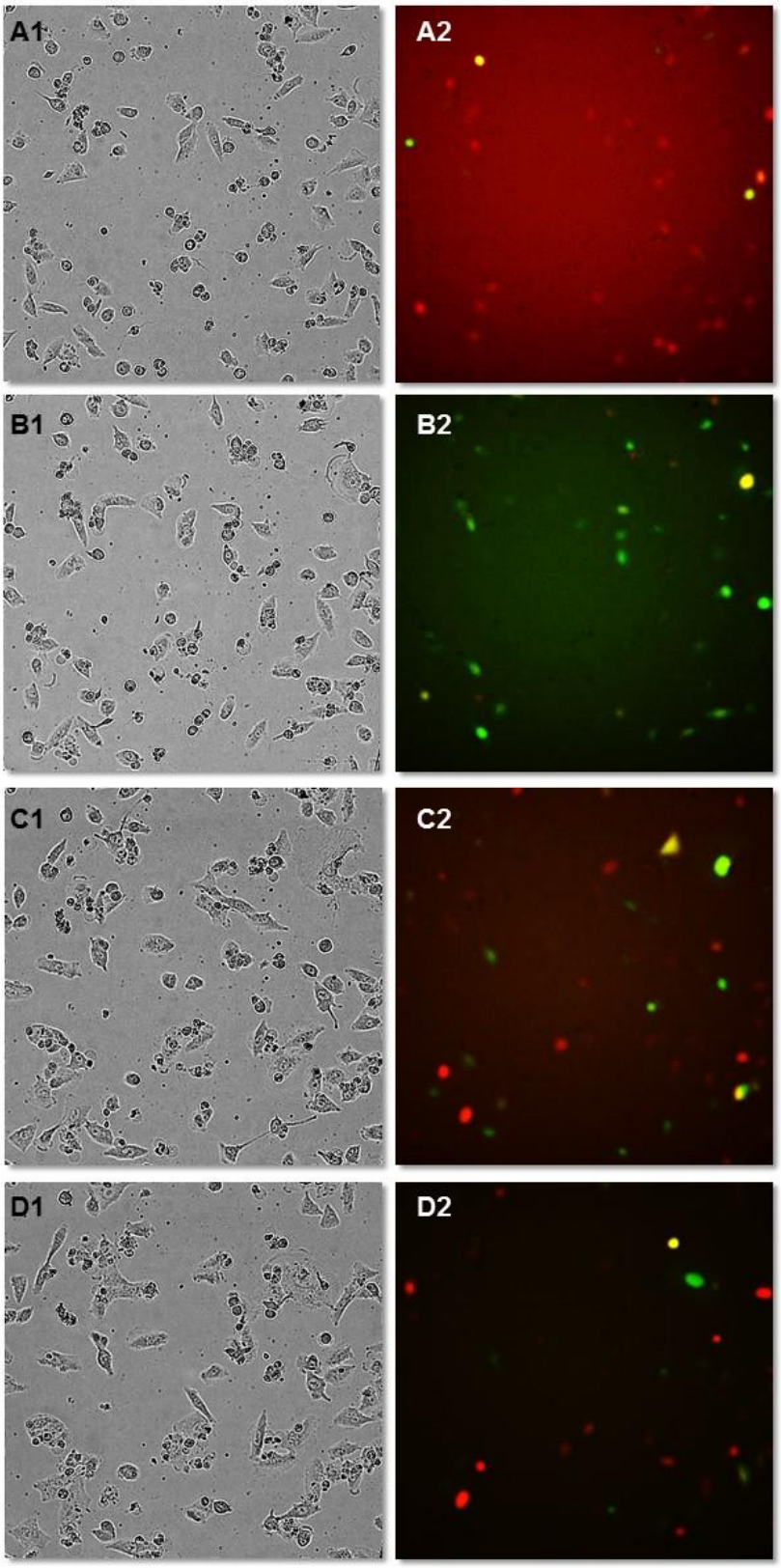


Figura 12 – Imagens em tempo real, população submetida ao tratamento sequencial e recuperada por 48 horas. Células transfectadas com a técnica FUCCI. (A1, B1, C1, D1) imagens de contraste de fase. (A2, B2, C2, D2), imagens fluorescentes. Linha A: recuperação 12 horas. Linha (B): recuperação 23 horas. Linha C: recuperação 37 horas. Linha D: recuperação 46 horas. Imagens adquiridas no sistema InCell Analyzer 2200 GE. Escala: 200 µM.

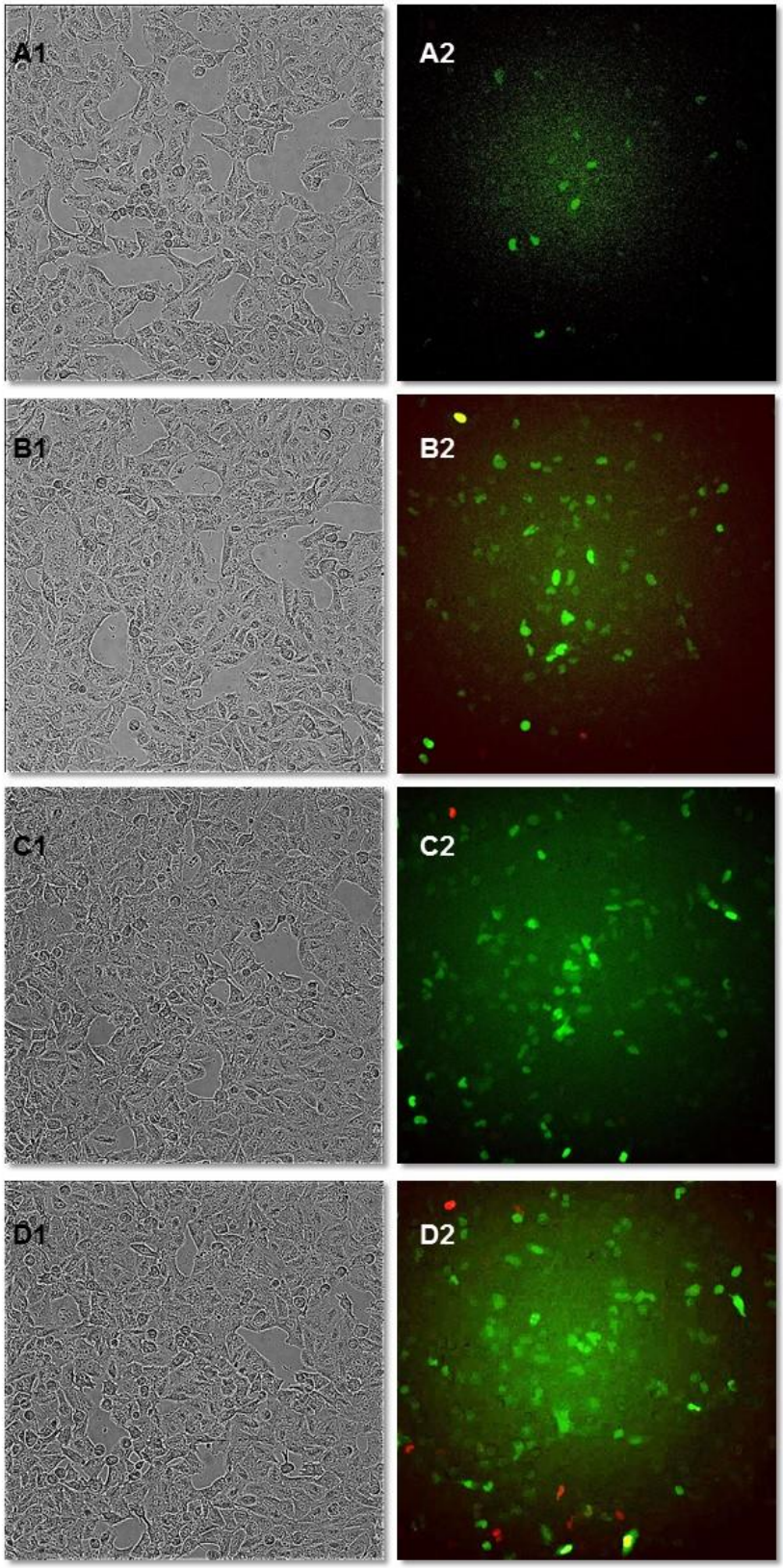


Figura 13 – Imagens em tempo real, população controle, recuperada por 48 horas. Células transfectadas com a técnica FUCCI. (A1, B1, C1, D1) imagens de contraste de fase. (A2, B2, C2, D2), imagens fluorescentes. Linha A: recuperação 12 horas. Linha (B): recuperação 23 horas. Linha C: recuperação 37 horas. Linha D: recuperação 46 horas. Imagens adquiridas no sistema InCell Analyzer 2200 GE. Escala: 200 µM.

3.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

As avaliações morfológicas foram realizadas em microscópia de contraste de fase. O tratamento com blebbistatina levou a expressivas modificações na morfologia celular, como protrusões de membrana, afuniladas e mais alongadas que o corpo celular (figura 14). Inibição da miosina II gera alterações nas fibras de estresse e consequentemente afeta a conformação do citoesqueleto (AYALA et al., 2017), resultando nas alterações morfológicas observadas (figura 14, 15). Essas modificações foram recuperadas após a retirada do tratamento, demonstrando que o tratamento efetivamente induziu as alterações (figura 14).

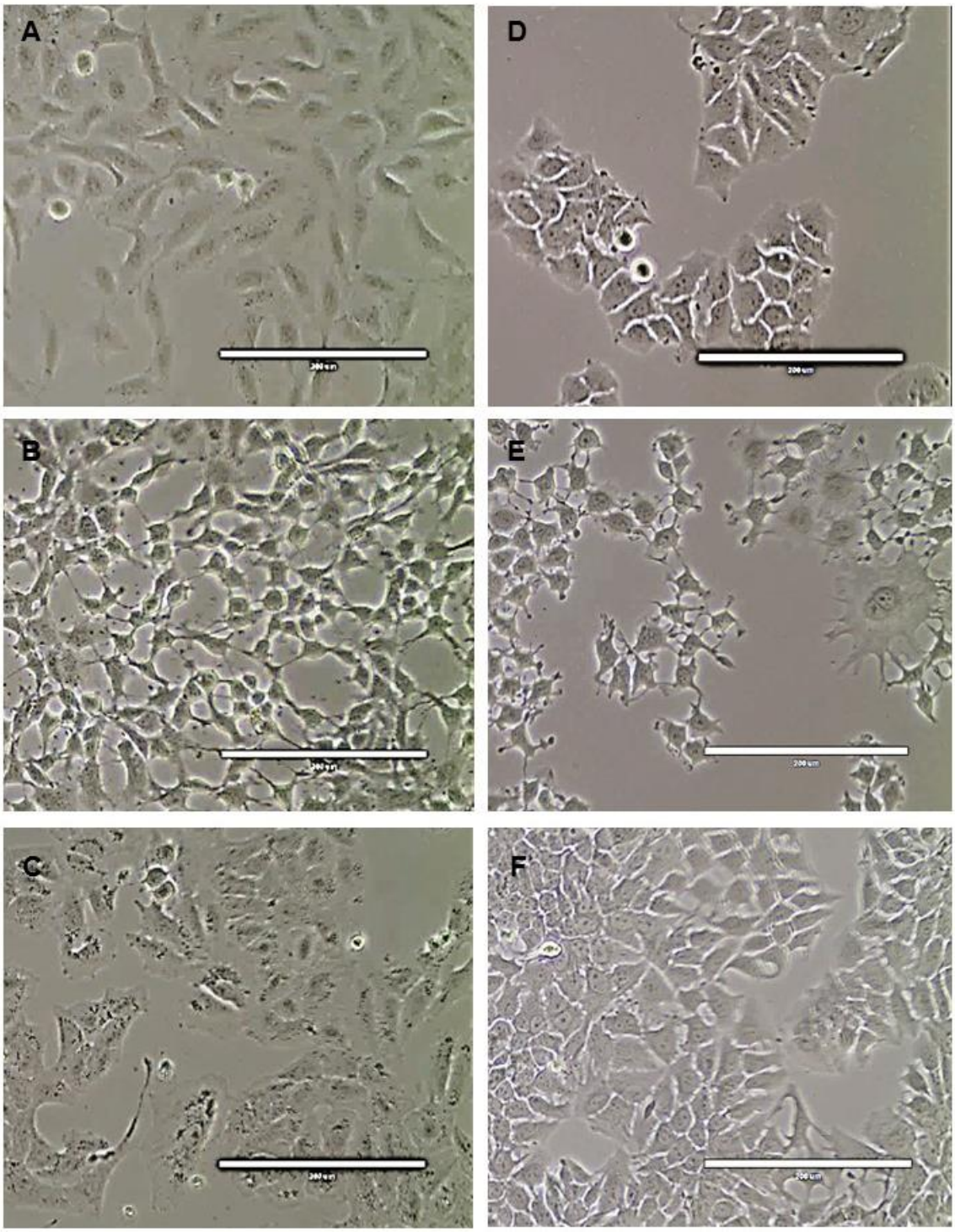


Figura 14 - Alterações morfológicas. Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase (IVOS), mostrando o aspecto morfológico. (A) A549, controle, (B) A549, tratada com monastrol 100µm E blebbistatina 20µm, (C), A549, recuperação 72 horas. (D) MCF-7, controle, (E) MCF-7, tratada com monastrol 100µm E blebbistatina 20µm, (F), MCF-7, recuperação 48 horas. Linhagens em cultura. Escala: 200 µM.

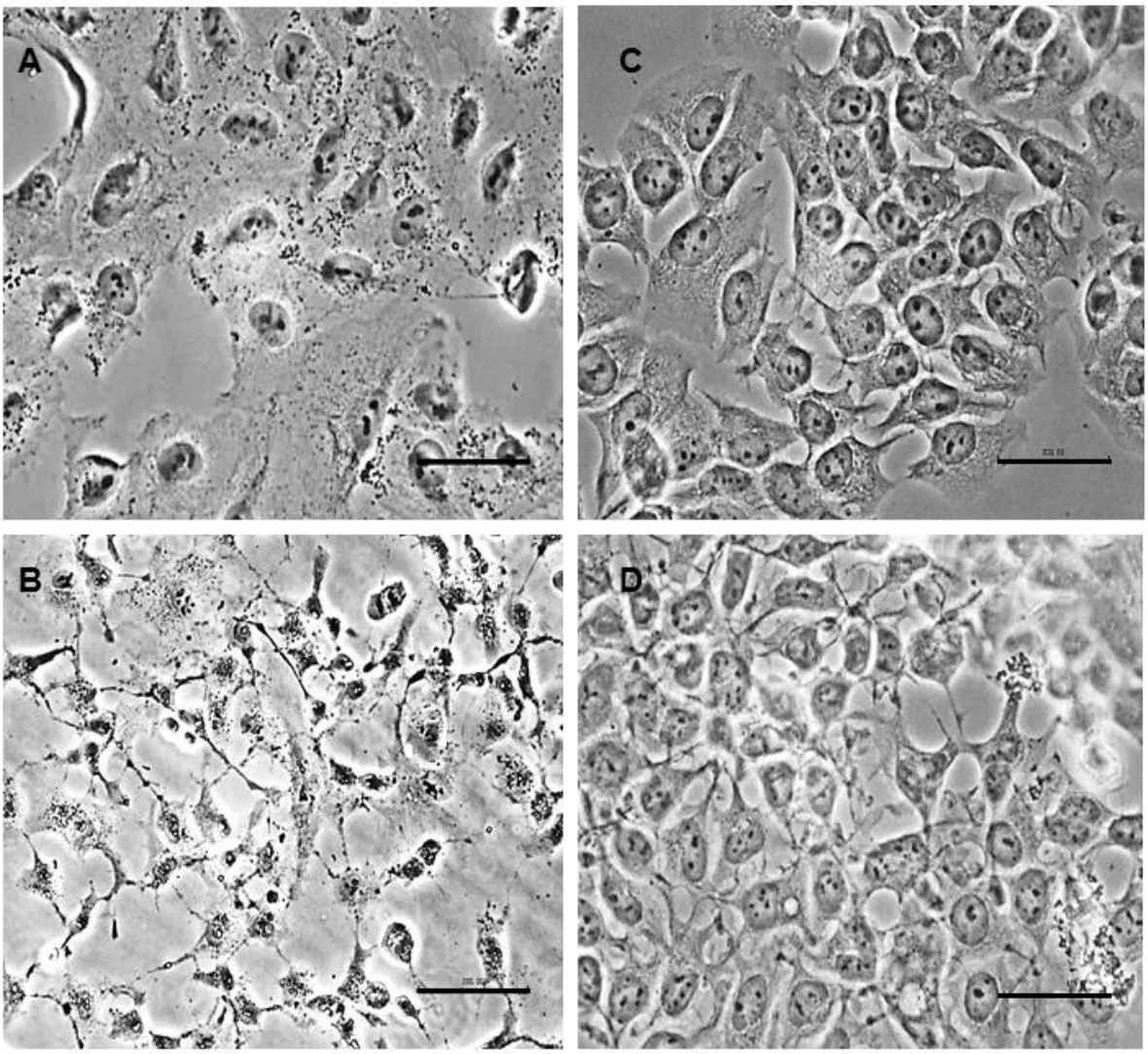


Figura 15 - Alterações morfológicas. Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico das linhagens A549 e MCF-7. (A) A549, controle, (B) A549, tratamento com monastrol 100µM e blebbistatina 20µM. (C) MCF-7, controle, (D) MCF-7, tratamento com monastrol 100µM e blebbistatina 20µM Escala: 200 µM.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS mRNAS

O tratamento realizado teve como alvos eventos distintos do ciclo celular, desta maneira, selecionamos genes relacionados com a formação e maturação do fuso mitótico, como a Aurora A, e com eventos iniciais da mitose, como a Ciclina B. Na busca por um gene normalizador para os ensaios, identificamos que o mRNA da actina sofria significantes alterações ao longo do tratamento. Desta maneira, optamos por avaliar o citoesqueleto de actina. Os ensaios monstraram que as populações submetidas ao tratamento não se encaminharam para apoptose (figura 8, 9), e sim à proliferação, após a supressão do mesmo, desde modo optamos por avaliar dois componentes da Via de Sinalização Hippo, Lats e YAP/TAZ. A superexpressão e ativação de Lats, inativaria a proliferação, enquanto a superexpressão de YAP/TAZ e sua localização no núcleo, a promoveria (GANEM et al., 2014). A quantificação foi realizada por q-PCR. No primeiro ponto de análise, após o tratamento com monastrol, observamos expressivo aumento na expressão dos genes da Aurora A, Ciclina B (figura 16), indicando que as células estavam, neste momento, prontas para iniciar a mitose. No segundo ponto de análise, ao final do tratamento sequencial, tivemos um maior aumento na expressão do mRNA da actina e YAP/TAZ (figura 16). YAP/TAZ é descrito como sensor para estímulos mecânicos, incluindo rigidez do substrato, densidade celular e alterações morfológicas (DUPONT et al., 2011). Também estão relacionados na promoção de genes envolvidos no remodelamento do citoesqueleto e na ligação entre a actina e a matriz extracelular (MORIKAWA ET AL. 2015). Blebbistatina ao inibir a miosina II, interfere na formação das fibras de estresse, estimulando a localização nuclear de YAP (WADA et al., 2011), esse aumento da expressão do mRNA de YAP pode estar se refletindo na expressão proteica (dados sugestivos de Western Blotting não mostrados), que com Lats pouco expresso (figura 16), teríamos o favorececimento da sobrevivência celular e posterior proliferação, o que realmente ocorreu após a supressão do tratamento. O mRNA da actina sofreu maior aumento, assim como YAP/TAZ, após o tratamento com a blebbistatina (figura 16), que afetou a formação das fibras de estresse (AYALA et al., 2017), tanto nas células em mitose, como nas células em interfáse. Efeito, provavelmente, seria o responsável pelo aumento da degradação da actina nas fibras de estresse, e consequentemente a diminuição da expressão proteica, como observado neste ponto (figura 17).

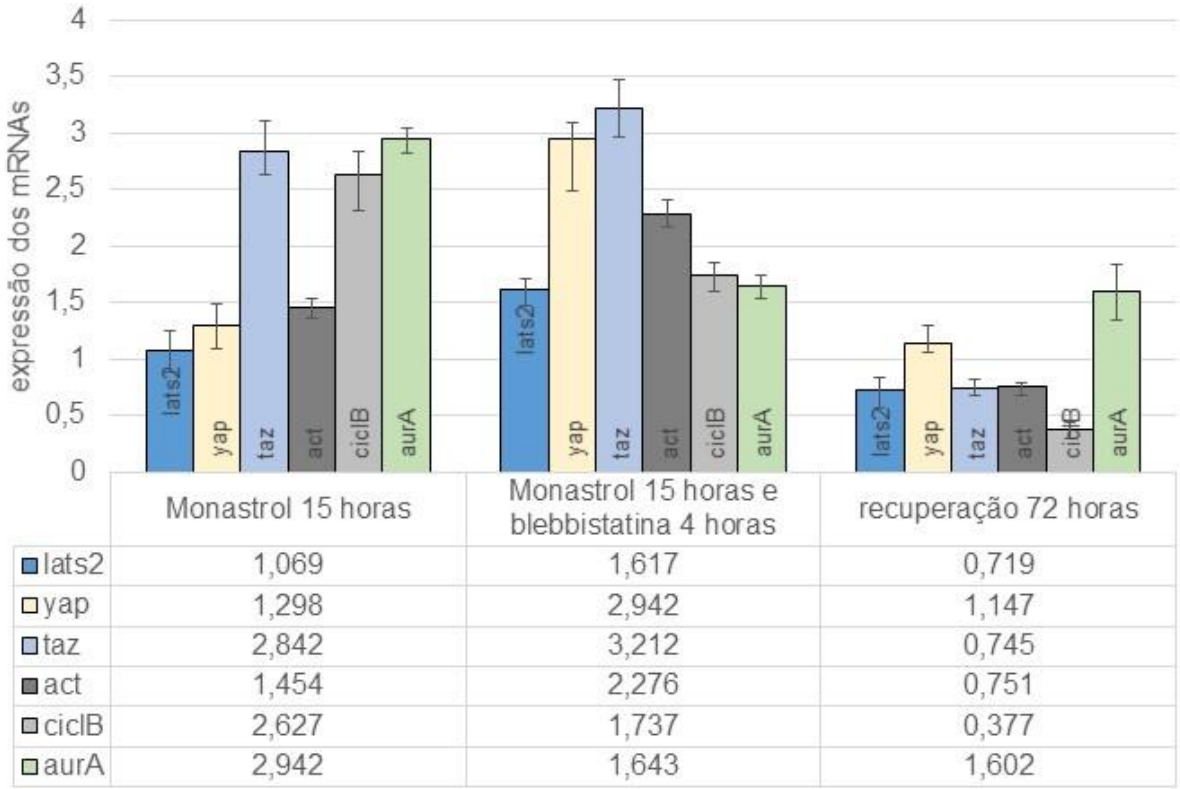


Figura 16 - Quantificação de mRNAs, das populações submetidas ao tratamento sequencial e da população controle. Sistema q-PCR, linhagem A549. Gráfico de massa total de mRNAs, produzido no Microsoft Excel.

3.7 EXPRESSÃO PROTEÍCA

Nos ensaios de Western Blotting, encontramos a maior expressão da actina posterior ao tratamento com monastrol (figura 17). Sugerimos que esse dado, seja decorrente da condição celular, na qual teria material e estrutura equivalente para duas células filhas, ou da duplicação dos centrossomos, gerados pela inibição da separação do fuso mitótico, que podem ser os responsáveis pelo aumento expressivo da proteína actina, visto terem sido descritos como centros nucleadores de novos filamentos para a formação do citoesqueleto (FARINA et al., 2016; WORDERMAN; DECARREAU 2016). Para obtermos outros dados que indicasse esse fenômeno, de nucleação dos filamentos de actina pelos centrossomos, teríamos que analisar o momento inicial, onde se deu a parada da população em condições de mitose e compararmos com o final do tratamento, se a expressão proteica da actina

aumentasse nesse intervalo, poderia ser um indicativo a mais do papel dos centrossomos na formação de novos filamentos no mecanismo estudado aqui.

A maior expressão de mRNA da actina, ocorreu posterior ao tratamento com blebbistatina, o que não se refletindo na expressão proteica. Esse efeito é, provavelmente, decorrente da perturbação gerada nas fibras de estresse, pela inibição da miosina II, que induziria maior degradação dos filamentos, refletida na baixa expressão proteica neste ponto (figura 17), e a alta na taxa transcricional, seria uma tentativa de recompor o citoesqueleto degradado das células interfásicas afetadas pelo tratamento.

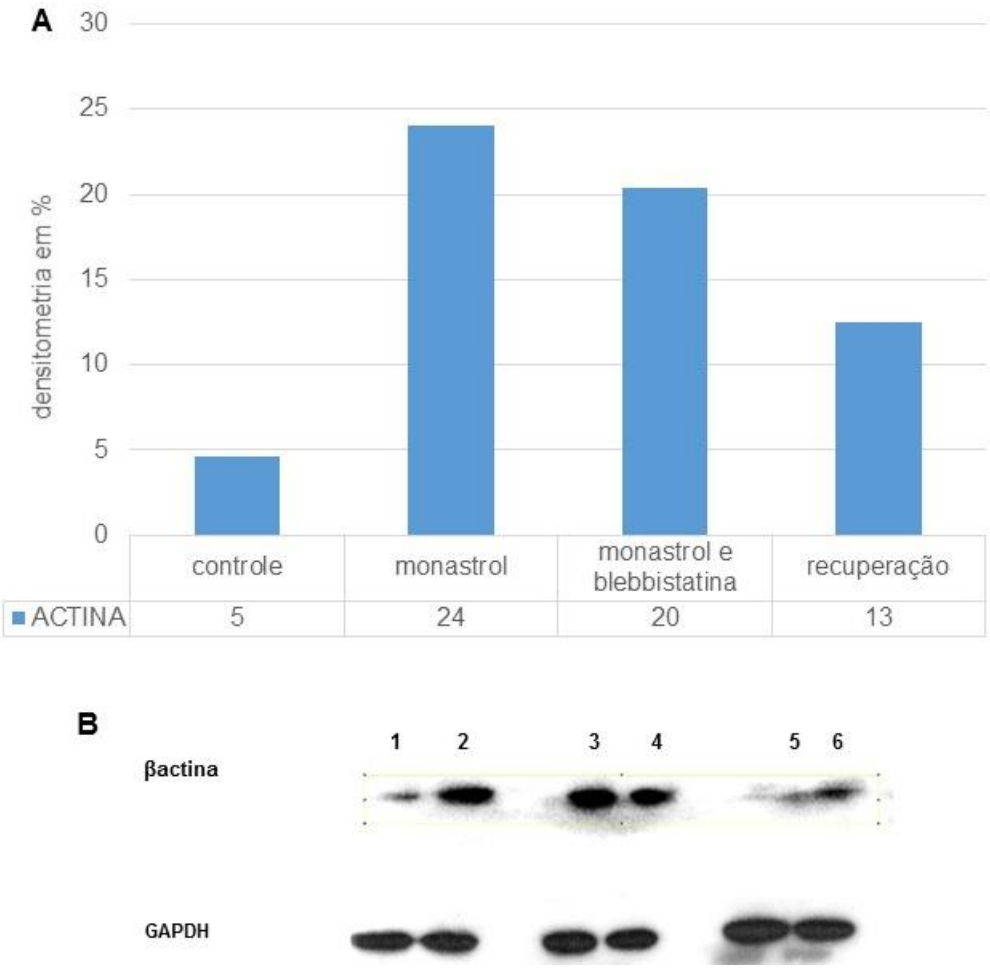


Figura 17 - Expressão proteica. Densitometria da expressão proteica, a partir do tratamento com Monastrol 15 horas, monastrol 15 horas e blebbistatina 4 horas e recuperação por 72 horas da linhagem celular A549. A: quantificação da densitometria da actina, gráfico por Microsoft Excel. B: expressão proteica. 1: controle do tratamento com monastrol. 2: tratamento com monastrol por 15 horas. 3: controle do tratamento com monastrol 15 horas e blebbistatina 4 horas. 4: tratamento com monastrol 15 horas e blebbistatina 4 horas. 5: controle da recuperação. 6: recuperação. Quantificação da densitometria realizada no software IMAGEj.

CONSIDERAÇÃO FINAL

4 CONSIDERAÇÃO FINAL

A aneuplodia está associada a diferentes condições celulares, favorecendo a sobrevivência, seja para a manutenção e o desenvolvimento saudável do organismo ou como iniciadora e apoiando processos patológicos diversos. É fato, que essa característica leva a uma seleção, dentro da população celular, condição que favorece a resistência aos tratamentos, em casos patológicos, e a sobrevivência em ambos os casos, patológicos ou não. No câncer, está presente em tumores mais agressivos e envolvida na menor sobrevida dos pacientes.

O trabalho apresentado aqui, demonstrou um método eficiente para o estudo de células aneuploides, com ganho de DNA, *in vitro*. Sugerindo, também, que os mecanismos bloqueados com o tratamento, já descritos como meios de formação de células com instabilidade cromossômica, podem influenciar eventos moleculares envolvidos com a sobrevivência celular. O mecanismo completo envolvido nesses eventos ainda é desconhecido, porém, podemos supor, considerando os resultados alcançados aqui, que a inativação da via de sinalização Hippo seja um dos modos responsáveis por fornecer às células os meios necessários para a sobrevivência, como o remodelamento do citoesqueleto de actina, a fim de adequar a célula ao aumento do material genético e para compensar a provável degradação da actina, decorrente da desestruturação das fibras de estresse pela inibição da miosina II.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AYALA, Yareni A. et al. Effects of cytoskeletal drugs on actin cortex elasticity. **Experimental Cell Research**, v. 351, n. 2, p. 173-181, 2017.

BACH, Erika A. et al. A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the *Drosophila* janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. **Genetics**, v. 165, n. 3, p. 1149-1166, 2003.

BAKER, Darren J. et al. BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice**. Nature Genetics**, v. 36, n. 7, p. 744, 2004.

BAKER, Darren J. et al. Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 96, 2013.

BAKKER, Bjorn et al. How to count chromosomes in a cell: An overview of current and novel technologies. **BioEssays**, v. 37, n. 5, p. 570-577, 2015.

BAKHOUM, Samuel F. et al. Chromosomal instability substantiates poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 24, p. 7704-7711, 2011.

BALABAN, Gloria B. et al. Karyotypic evolution in human malignant melanoma. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 19, n. 1-2, p. 113-122, 1986.

BARRETT, Michael T. et al. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. **Nature Genetics**, v. 22, n. 1, p. 106, 1999.

BARTUCCI, M. et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. **Oncogene**, v. 34, n. 6, p. 681, 2015.

BEACH, Rebecca R. et al. Aneuploidy Causes Non-genetic Individuality. **Cell,** v. 169, n. 2, p. 229-242. e21, 2017.

BIRKBAK, Nicolai J. et al. Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 10, p. 3447-3452, 2011.

BOVERI, Theodor. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. Supplement 1, p. 1-84, 2008.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRYANT, Peter J.; LEVINSON, Patrice. Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. **Developmental Biology**, v. 107, n. 2, p. 355-363, 1985.

CARBONE, Lucia; CHAVEZ, Shawn L. Mammalian pre-implantation chromosomal instability: species comparison, evolutionary considerations, and pathological correlations. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 6, p. 321-335, 2015.

CARTER, Scott L. et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 413-421, 2012.

CARTER, Scott L. et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 413-421, 2012.

CHEN, Guangbo et al. Targeting the adaptability of heterogeneous aneuploids. **Cell**, v. 160, n. 4, p. 771-784, 2015.

CIMINI, Daniela et al. Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 20, p. 4213-4225, 2003.

CIMINI, Daniela. Merotelic kinetochore orientation, aneuploidy, and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1786, n. 1, p. 32-40, 2008.

CIMINI, Daniela; TANZARELLA, Caterina; DEGRASSI, Francesca. Differences in malsegregation rates obtained by scoring ana-telophases or binucleate cells. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 563-568, 1999.

COELHO, Paula A. et al. Over-expression of Plk4 induces centrosome amplification, loss of primary cilia and associated tissue hyperplasia in the mouse. **Open Biology**, v. 5, n. 12, p. 150209, 2015.

CONLON, Ian; RAFF, Martin. Size control in animal development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 235-244, 1999.

CORDENONSI, Michelangelo et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 759-772, 2011.

COTTINI, Francesca et al. Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. **Nature Medicine**, v. 20, n. 6, p. 599-606, 2014.

COUDERC, Christophe et al. AMOTL1 promotes breast cancer progression and is antagonized by merlin. **Neoplasia**, v. 18, n. 1, p. 10-24, 2016.

DAVOLI, Teresa et al. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. **Science**, v. 355, n. 6322, p. eaaf8399, 2017.

DAVOLI, Teresa; DE LANGE, Titia. Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. **Cancer Cell**, v. 21, n. 6, p. 765-776, 2012.

DEAVEN, L. L.; KREIZINGER, J. D. Cell fusion as a mechanism for the origin of polyploid cells in vitro. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 27, n. 3, p. 311-313, 1971.

DEWHURST, Sally M. et al. Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. **Cancer Discovery**, v. 4, n. 2, p. 175-185, 2014.

DUESBERG, Peter et al. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. In: **Infection and Inflammation: Impacts on Oncogenesis**. Karger Publishers, 2006. p. 16-44.

DUESBERG, Peter et al. Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 119, n. 2, p. 83-93, 2000.

DUESBERG, Peter et al. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 23, p. 13692-13697, 1998.

DUIJF, Pascal HG; SCHULTZ, Nikolaus; BENEZRA, Robert. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 10, p. 2316-2326, 2013.

DUNCAN, Andrew W. et al. Aneuploidy as a mechanism for stress-induced liver adaptation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3307, 2012.

DUNCAN, Andrew W. et al. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. **Gastroenterology**, v. 142, n. 1, p. 25-28, 2012.

DUPONT, Sirio et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. 179, 2011.

ERTYCH, Norman et al. Increased microtubule assembly rates mediate chromosomal instability in colorectal cancer cells. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 8, p. 779, 2014.

FAGGIOLI, Francesca et al. Chromosome-specific accumulation of aneuploidy in the aging mouse brain. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 24, p. 5246-5253, 2012.

FARINA, Francesca et al. The centrosome is an actin-organizing center. **Nature Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. 65, 2016.

FOIJER, Floris et al. Spindle checkpoint deficiency is tolerated by murine epidermal cells but not hair follicle stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2928-2933, 2013.

FUJIWARA, Takeshi et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1043, 2005.

GANEM, Neil J. et al. Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. **Cell**, v. 158, n. 4, p. 833-848, 2014.

GANEM, Neil J.; GODINHO, Susana A.; PELLMAN, David. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 278, 2009.

GANEM, Neil J.; PELLMAN, David. Limiting the proliferation of polyploid cells. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 437-440, 2007.

GOULEV, Youlian et al. SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in Drosophila. **Current Biology**, v. 18, n. 6, p. 435-441, 2008.

GREGAN, Juraj et al. Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. **Trends in Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 374-381, 2011.

HAHN, William C. et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 464, 1999.

HANKS, Sandra et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. **Nature Genetics**, v. 36, n. 11, p. 1159, 2004.

HARIHARAN, Iswar K. Organ size control: lessons from *Drosophila*. **Developmental Cell**, v. 34, n. 3, p. 255-265, 2015.

HARVEY, Kieran F.; ZHANG, Xiaomeng; THOMAS, David M. The Hippo pathway and human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 4, p. 246-257, 2013.

HAYNIE, John L.; BRYANT, Peter J. The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. **Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology**, v. 183, n. 2, p. 85-100, 1977.

HOLLAND, Andrew J.; CLEVELAND, Don W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 478-487, 2009.

IOUROV, Ivan Y. et al. Aneuploidy in the normal, Alzheimer's disease and ataxia-telangiectasia brain: differential expression and pathological meaning. **Neurobiology of Disease**, v. 34, n. 2, p. 212-220, 2009.

JACOBS, Patricia A. et al. Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex differences. **Nature**, v. 197, p. 1080-1081, 1963.

JAIN, Abhinav K. et al. p53 regulates cell cycle and microRNAs to promote differentiation of human embryonic stem cells. **PLoS Biology**, v. 10, n. 2, p. e1001268, 2012.

JOHNSON, Randy; HALDER, Georg. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 1, p. 63-79, 2014.

JOHNSTON, Laura A. et al. *Drosophila* myc regulates cellular growth during development. **Cell**, v. 98, n. 6, p. 779-790, 1999.

JUSTICE, Robin W. et al. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, n. 5, p. 534-546, 1995.

KAPOOR, Tarun M. et al. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 5, p. 975-988, 2000.

KATO, Tatsuya et al. Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. **Lung Cancer**, v. 74, n. 1, p. 124-131, 2011.

KIM, Jung-Sik et al. Intact cohesion, anaphase, and chromosome segregation in human cells harboring tumor-derived mutations in STAG2. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 2, p. e1005865, 2016.

KNOUSE, Kristin A. et al. Single cell sequencing reveals low levels of aneuploidy across mammalian tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 37, p. 13409-13414, 2014.

KOVÁCS, Mihály et al. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35557-35563, 2004.

KUZNETSOVA, Anastasia Y. et al. Chromosomal instability, tolerance of mitotic errors and multidrug resistance are promoted by tetraploidization in human cells. **Cell Cycle**, v. 14, n. 17, p. 2810-2820, 2015.

LEEVERS, S. J. et al. The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 23, p. 6584, 1996.

LENGAUER, Christoph; KINZLER, Kenneth W.; VOGELSTEIN, Bert. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, n. 6625, p. 623, 1997.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; MORI, L.; PEREIRA, C. A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Analytical cellular pathology: the journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology**, v. 7, n. 4, p. 321-334, 1994.

MALIGA, Zoltan; KAPOOR, Tarun M.; MITCHISON, Timothy J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 9, p. 989-996, 2002.

MAMMOTO, Akiko; INGBER, Donald E. Cytoskeletal control of growth and cell fate switching. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 6, p. 864-870, 2009.

MANA-CAPELLI, Sebastian et al. Angiomotins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 10, p. 1676-1685, 2014

MARTIN, Carol-Anne et al. Mutations in PLK4, encoding a master regulator of centriole biogenesis, cause microcephaly, growth failure and retinopathy. **Nature Genetics**, v. 46, n. 12, p. 1283-1292, 2014.

MARTÍN, Francisco A.; MORATA, Ginés. Compartments and the control of growth in the *Drosophila* wing imaginal disc. **Development**, v. 133, n. 22, p. 4421-4426, 2006.

MATZKE, Marjori A. et al. Does the intrinsic instability of aneuploid genomes have a causal role in cancer?. **Trends in Genetics**, v. 19, n. 5, p. 253-256, 2003.

MAYNARD, Scott et al. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2266-2274, 2008.

MCCONNELL, Michael J. et al. Mosaic copy number variation in human neurons. **Science**, v. 342, n. 6158, p. 632-637, 2013.

MÉCHALI, Marcel; LUTZMANN, Malik. The cell cycle: now live and in color. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 341-343, 2008.

MILUNOVIĆ-JEVTIĆ, A. et al. Centrosomal clustering contributes to chromosomal instability and cancer. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 40, p. 113-118, 2016.

MORIKAWA, Yuka et al. Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo-deficient mice. **Science Signaling**, v. 8, n. 375, p. ra41, 2015.

MUOTRI, Alysson R.; GAGE, Fred H. Generation of neuronal variability and complexity. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1087, 2006.

MUSACCHIO, Andrea; SALMON, Edward D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 379, 2007.

NAKAYAMA, Keiko et al. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. **Developmental Cell**, v. 6, n. 5, p. 661-672, 2004.

NICHOLSON, Joshua M.; CIMINI, Daniela. Cancer karyotypes: survival of the fittest. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.

NISHITANI, Hideo; LYGEROU, Zoi; NISHIMOTO, Takeharu. Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of geminin through its N-terminal region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30807-30816, 2004.

OTA, Mitsunori; SASAKI, Hiroshi. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. **Development**, v. 135, n. 24, p. 4059-4069, 2008.

OTTO, Sarah P.; WHITTON, Jeannette. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, n. 1, p. 401-437, 2000.

OZERY-FLATO, Michal et al. Large-scale analysis of chromosomal aberrations in cancer karyotypes reveals two distinct paths to aneuploidy. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. R61, 2011.

PAN, Duojia. Hippo signaling in organ size control. **Genes & Development**, v. 21, n. 8, p. 886-897, 2007.

PANTALACCI, Sophie; TAPON, Nicolas; LÉOPOLD, Pierre. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 921, 2003.

PERA, F.; RAINER, B. Studies of multipolar mitoses in euploid tissue cultures. **Chromosoma**, v. 42, n. 1, p. 71-86, 1973.

PICCOLO, Stefano; DUPONT, Sirio; CORDENONSI, Michelangelo. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1287-1312, 2014.

PIERRE, Robert V.; HOAGLAND, H. Clark. Age-associated aneuploidy: Loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging. **Cancer**, v. 30, n. 4, p. 889-894, 1972.

PROBER, David A.; EDGAR, Bruce A. Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing. **Cell**, v. 100, n. 4, p. 435-446, 2000.

RANCATI, Giulia et al. Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. **Cell**, v. 135, n. 5, p. 879-893, 2008.

REHEN, Stevens Kastrup et al. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 23, p. 13361-13366, 2001.

REISH, Orit et al. Sporadic aneuploidy in PHA-stimulated lymphocytes of trisomies 21, 18, and 13. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 133, n. 2-4, p. 184-189, 2011.

REISH, Orit et al. Sporadic aneuploidy in PHA-stimulated lymphocytes of Turner's syndrome patients. **Chromosome Research**, v. 14, n. 5, p. 527, 2006.

RICKE, Robin M.; VAN DEURSEN, Jan M. Aneuploidy in health, disease, and aging. **J Cell Biol**, v. 201, n. 1, p. 11-21, 2013.

RING, David; HUBBLE, Richard; KIRSCHNER, Marc. Mitosis in a cell with multiple centrioles. **The Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 3, p. 549-556, 1982.

SACOTO, C. Di Capua et al. In vivo aneuploidization during the expansion of renal adenocarcinoma. **Urologia Internationalis**, v. 86, n. 4, p. 466-469, 2011.

SAKAUE-SAWANO, Asako et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 487-498, 2008.

SANSREGRET, Laurent; SWANTON, Charles. The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. a028373, 2017.

SAUCEDO, Leslie J. et al. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 6, p. 566, 2003.

SELMECKI, Anna et al. Polyploidy can drive rapid adaptation in yeast. **Nature**, v. 519, n. 7543, p. 349, 2015.

SHELTZER, Jason M. et al. Transcriptional consequences of aneuploidy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12644-12649, 2012.

SHENK, Elizabeth M.; GANEM, Neil J. Generation and Purification of Tetraploid Cells. **The Mitotic Spindle: Methods and Protocols**, p. 393-401, 2016.

SOTILLO, Rocío et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. **Cancer Cell**, v. 11, n. 1, p. 9-23, 2007.

STAUFFER, Seth et al. KIBRA promotes prostate cancer cell proliferation and motility. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 10, p. 1800-1811, 2016.

STEINHARDT, Angela A. et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. **Human Pathology**, v. 39, n. 11, p. 1582-1589, 2008.

TAKAHASHI, Kazutoshi et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

TAPON, Nicolas et al. salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 467-478, 2002.

TAYLOR, Claire F. et al. Frequent inactivating mutations of STAG2 in bladder cancer are associated with low tumour grade and stage and inversely related to chromosomal copy number changes. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 8, p. 1964-1974, 2013.

THOMPSON, Sarah L.; COMPTON, Duane A. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. **J Cell Biol**, v. 180, n. 4, p. 665-672, 2008.

TORRES, Eduardo M.; WILLIAMS, Bret R.; AMON, Angelika. Aneuploidy: cells losing their balance. **Genetics**, v. 179, n. 2, p. 737-746, 2008.

UDAN, Ryan S. et al. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 914, 2003.

VAN DEN BOS, Hilda et al. Single-cell whole genome sequencing reveals no evidence for common aneuploidy in normal and Alzheimer's disease neurons. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 116, 2016.

WADA, Ken-Ichi et al. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. **Development**, v. 138, n. 18, p. 3907-3914, 2011.

WEAVER, Beth AA; CLEVELAND, Don W. The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 6, p. 935-937, 2009.

WESTRA, Jurjen W. et al. Aneuploid mosaicism in the developing and adult cerebellar cortex. **Journal of Comparative Neurology**, v. 507, n. 6, p. 1944-1951, 2008.

WILLIAMS, Bret R. et al. Aneuploidy affects proliferation and spontaneous immortalization in mammalian cells. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 703-709, 2008.

WORDEMAN, Linda; DECARREAU, Justin. Revisiting Actin's role in early centrosome separation. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 15, n. 2, p. 162-163, 2016.

WU, Shian et al. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. **Cell**, v. 114, n. 4, p. 445-456, 2003.

XU, Tian et al. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* lats gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v. 121, n. 4, p. 1053-1063, 1995.

YU, Fa-Xing; ZHAO, Bin; GUAN, Kun-Liang. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. **Cell**, v. 163, n. 4, p. 811-828, 2015.

YUAN, M. et al. Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 11, p. 1752, 2008.

ZHANG, Nenggang et al. Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 35, p. 13033-13038, 2008.

ZHANG, Shihao et al. Hippo Signaling Suppresses Cell Ploidy and Tumorigenesis through Skp2. **Cancer Cell**, v. 31, n. 5, p. 669-684. e7, 2017.

ZHU, Jin et al. Karyotypic determinants of chromosome instability in aneuploid budding yeast. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 5, p. e1002719, 2012.

ZIMONJIC, Drazen et al. Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. **Cancer Research**, v. 61, n. 24, p. 8838-8844, 2001.