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

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 citoesqueleto. 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.

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 numérica (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; SHELTER 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 frequência 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: Pluripotentes, 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 tronco 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 da 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 aneuploidia, 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). Entretanto, 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 progênie 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 entre 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 separase 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 conseqüentemente à aneuploidia. O impacto da perda da coesão em conseqüência de mutações genéticas é ainda pouco conhecido (KIM et al., 2016; TAYLOR et al., 2013).

C. Ligações merotéticas: 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 conseqüência 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 cânceres 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 adquirir 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 progênie 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 merotéticas, 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 aneuploidia e facilitar a tumorigênese (GANEM et al., 2007). Podem surgir por fusão celular, a célula resultante entra no ciclo com dois centrôssomos 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 tetraploidização ativa p53 (GANEM et al., 2014), porém, em ambos foi demonstrado que as células podem continuar proliferando por diferentes mecanismos. Como se dá esse intercâmbio 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 aneuploidia nos estágios do desenvolvimento tumoral, embora seja uma característica predominante em células cancerosas. Considerando que algumas linhas de pesquisas afirmam que a aneuploidia 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 aneuploidia e NCI, sabe-se que ambas se afetam mutuamente. 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 aumenta a taxa de sobrevivência celular, o estudo sugeriu que altas taxas de mutações sofridas nesse processo, favorece a adaptação, mantendo mutações benéficas 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 cânceres 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 consequência a uma elevação na taxa da heterogeneidade cariótica e rearranjos cromossômicos contínuos que favorecem a formação de tumores em camundongos (DAVOLI; DE LANGE 2012; DEWHURST et al., 2014). Altas taxas de alterações cromossômicas implicam 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 cromossômicos pode acontecer. Há décadas 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 heterólogo, 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 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 cascata 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, desencadeiam 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 reprime 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 cânceres 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 oncogênico. Supressora ou oncogênica, 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 cânceres 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 oncogênico. 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.

4 CONSIDERAÇÃO FINAL

A aneuploidia 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*

- 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.
- BAKHOU, 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, Duoqia. 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.