

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
TESE DE DOUTORADO

**O papel da mitose e do tempo na geração de variabilidade de aptidão em
células irmãs**

Julieti Huch Buss
Orientador: Guido Lenz
Co-orientadora: Karine Rech Begnini

PORTO ALEGRE
Março/2023

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
TESE DE DOUTORADO

O papel da mitose e do tempo na geração de variabilidade de aptidão em
células irmãs

Julieti Huch Buss

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

Orientador: Guido Lenz
Co-orientadora: Karine Rech Begnini

PORTO ALEGRE

Março/2023

CIP - Catalogação na Publicação

Buss, Julieti Huch

O papel da mitose e do tempo na geração de
variabilidade de aptidão em células irmãs / Julieti
Huch Buss. -- 2023.

93 f.

Orientador: Guido Lenz.

Coorientadora: Karine Begnini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,
2023.

1. mitose assimétrica. 2. células irmãs. 3.
variabilidade de aptidão. 4. heterogeneidade
intratumoral. 5. cancer. I. Lenz, Guido, orient. II.
Begnini, Karine, coorient. III. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular (LABSINAL), do departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer às agências de fomento por terem possibilitado o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também a UFRGS e ao PPGBCM por nos proporcionar contato com ciência de qualidade. Agradeço ao LabSinal, por ter aberto suas portas e me acolhido.

Em especial, agradeço ao meu orientador Professor Doutor Guido Lenz, pelo aceite da minha orientação e por todo conhecimento que me proporcionou durante o doutorado. Foram os anos mais desafiadores da minha vida, e com certeza, os de maiores aprendizados. Agradeço à Karine Begnini, por acompanhar minha trajetória desde a iniciação científica, amizade e pela co-orientação. Agradeço a todos os colegas do LabSinal, pelas discussões, café e apoio. Agradeço em especial à Luiza Cherobini por ter desenvolvido o Software utilizado nesta tese para análise da atividade de ERK. Agradeço também aqueles colegas que se tornaram grandes amigos e que levarei para a vida. Agradeço à Silvinha, por estar sempre presente, com um sorriso no rosto ou com um e-mail carinhoso, nos auxiliando em todas as questões burocráticas. Agradeço também a minha comissão de acompanhamento formada pelos professores Charley Staats e Eduardo Chiela pelas discussões e por acompanharem todo desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço especialmente a minha família por estarem sempre ao meu lado, me apoiando nos momentos difíceis, e por sempre acreditarem em mim. Por fim, agradeço a todos os meus amigos por estarem sempre ao meu lado e tornarem essa caminhada mais leve e feliz.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	12
1. O câncer e sua característica heterogênea	12
1.1. Níveis e origens da heterogeneidade intratumoral (<i>ITH</i>).....	14
2. Mitose.....	18
2.1. Mitose assimétrica (<i>AM</i>).....	19
2.1.1. Importância da <i>AM</i> durante o desenvolvimento.....	19
2.1.2. Importância da <i>AM</i> na manutenção da aptidão celular.....	21
2.1.3. <i>AM</i> e manutenção da homeostase tecidual.....	25
2.1.4. <i>AM</i> como fonte da <i>ITH</i>	26
3. Ciclo celular.....	28
4. ERK.....	31
4.1. Variabilidades de ERK em células únicas.....	33
Hipótese do trabalho.....	36
OBJETIVOS.....	37
OBJETIVO GERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
CAPÍTULO I.....	38
CAPÍTULO II.....	55
DISCUSSÕES INTEGRADAS.....	68
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
CURRÍCULO VITAE.	90

ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt/PKB - Proteína quinase B (*Protein kinase B*)

AM – Mitose assimétrica (*Asymmetric Mitosis*)

aPKC – Proteína quinase C atípica (*Atypical Protein Kinase C*)

CDK – Quinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)

CDKi – Inibidores de quinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*)

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

eG-P - Cone do genoma-fenoma estendido (*extended Genome–Phenome Cone*)

GBM – Glioblastoma multiforme

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial (*Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GMC - Célula-mãe de gânglio (*Ganglion Mother Cell*)

GPCRs – Receptores associados à Proteína G (*G Protein-Coupled Receptors*)

HER2 – Receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2*)

IMT – Tempo intermitótico (*Intermitotic Time*)

ITH - Heterogeneidade intratumoral (*Intratumoral Heterogeneity*)

KFL4 - Fator do tipo Kruppel 4 (*Krueppel-like Factor 4*)

Klp10A – Proteína cinesina (*Kinesin Protein Klp10A*)

MAPKs – Proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated Protein Kinase*)

MPS-1 - Fuso monopolar 1 (*Monopolar Spindle 1*)

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

p75NTR - Receptor de neurtrofina P75 (*Nerve Growth Factor Receptor*)

PAR- Proteínas PAR (*PAR Protein*)

PDGFRA - Receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor α*).

PI3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase (*Phosphoinositide 3-kinases*)

RCC - Carcinoma de células renais (*Renal Cell Carcinom*)

RTKs – Receptores de tirosina-quinase (*Receptor Tyrosine Kinases*)

SM – Mitose simétrica (*Symmetric Mitosis*)

SMADs - Mães contra decapentaplégico (*Small Mothers Against Decapentaplegic*)

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta (*Transforming Growth Factor Beta*)

TNBC - Câncer de mama triplo negativo (*Triple-Negative Breast Cancer*)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Diferentes níveis de heterogeneidade tumoral.....	12
FIGURA 2. Níveis e origens da <i>ITH</i>	15
FIGURA 3. Ilustração do eG-P <i>map</i> formado pelas características de células clonais ou de uma única célula ao longo do tempo nas diferentes camadas do mapa eG-P.....	17
FIGURA 4. <i>Hallmarks of cancer</i>	17
FIGURA 5. Principais mecanismos de controle dos processos de <i>AM</i> durante o desenvolvimento.....	20
FIGURA 6. Possíveis estratégias de células-tronco para manter um equilíbrio entre células-tronco e célula diferenciada.....	25
FIGURA 7. Mitose simétrica (<i>SM</i>) x Mitose Assimétrica (<i>AM</i>).....	26
FIGURA 8. Sinalização envolvida na passagem de G0/G1 para fase S.....	30

RESUMO

O câncer é uma doença intrinsecamente heterogênea, sendo composto por uma ampla e diversificada variedade de células. A heterogeneidade intratumoral (*ITH*) é crucial para determinar a ineficiência terapêutica e favorecimento da carcinogênese. Uma fonte potencial que contribui com a geração de variabilidades a nível celular é a mitose assimétrica (*AM*), onde logo após a mitose células irmãs já apresentam características diferentes entre si. Além da *AM*, outro fator que contribui com a *ITH* é a capacidade que células únicas apresentam de variar suas características/fenótipos ao longo do tempo, favorecendo o surgimento de células resistentes a tratamentos. Sabendo que o câncer é caracterizado por apresentar proliferação descontrolada, a aptidão celular (*fitness*) pode ser caracterizada como o principal fenótipo associado a biologia tumoral. Compreender os mecanismos que resultam em variabilidades proliferativas, principalmente em câncer, são de extrema relevância para o contexto terapêutico. Nesse sentido, neste trabalho avaliamos o papel da *AM* e do tempo na geração de variabilidade de fenótipos, especialmente de aptidão celular, em células irmãs. Os resultados obtidos demonstram que células já apresentam variabilidades de aptidão. Fenótipos associados à aptidão, tais como, atividade de ERK, tempo intermitótico (*IMT*) e indução de dano ao DNA foram avaliados e mostraram-se assimétricos logo após a mitose. No entanto, embora as células já apresentem variabilidade de ERK logo após a mitose (23%), a variabilidade máxima de ERK observada em células irmãs é principalmente adquirida conforme as células progredem no ciclo (33%). A herdabilidade de fenótipos é a chave para a compreensão da geração de heterogeneidade em células tumorais. Nesse sentido, demonstramos que a *AM* de ERK é herdável, enquanto a variabilidade temporal apresenta influência sobre o *IMT* das células filhas. Além disso, demonstramos que a atividade de ERK da célula mãe, nas últimas 5h que antecedem a mitose, é capaz de influenciar a atividade de ERK e a média de *IMT* em células filhas. Nossos achados demonstram como variabilidades em células irmãs podem ser geradas, contribuindo com a heterogeneidade fenotípica existente em tumores.

ABSTRACT

Cancer is an intrinsically heterogeneous disease composed of a wide and diverse variety of cells. Intratumoral heterogeneity (ITH) is crucial to determine therapeutic inefficiency and favoring carcinogenesis. A potential source that contributes to the generation of variability at the cellular level is asymmetric mitosis (AM), where right after mitosis sister cells already present different characteristics from each other. In addition to AM, another factor that contributes to ITH is the ability of single cells to vary their characteristics/phenotypes over time, favoring the emergence of treatment-resistant cells. Knowing that cancer is characterized by uncontrolled proliferation, cell fitness can be characterized as the main phenotype associated with tumor biology. Understanding the mechanisms that result in proliferative variability, especially in cancer, is extremely relevant for the therapeutic context. In this sense, we evaluated the role of AM and time in generating phenotype variability, especially fitness, in sister cells. The results obtained demonstrate that cells already present fitness variability. Fitness-associated phenotypes such as ERK activity, intermitotic time (IMT), and DNA damage induction were evaluated and showed to be asymmetric right after mitosis. However, although cells already show ERK variability right after mitosis (23%), the maximum ERK variability seen in sister cells is mainly acquired as the cells progress through the cycle (33%). The heritability of phenotypes is the key to understanding the generation of heterogeneity in tumor cells. In this sense, we demonstrated that the AM of ERK is heritable, while temporal variability influences the IMT of daughter cells. Furthermore, we demonstrate that the ERK activity of the mother cell, in the last 5h before mitosis, can influence the ERK activity and the mean IMT in daughter cells. Our findings demonstrate how sister cell variability can be generated, contributing to the phenotypic heterogeneity that exists in tumors.

INTRODUÇÃO

1. O Câncer e sua característica heterogênea

O câncer abrange um conjunto de mais de 100 doenças, que apresentam em comum o crescimento desordenado de células com capacidade de invadir tecidos (disponível em www.inca.com.br, acessado 22/12/22). O câncer é caracterizado como uma doença intrinsecamente heterogênea, sendo composto por uma ampla e diversificada variedade de células a nível genético e epigenético (BURRELL et al., 2013; CARTER; ZHAO, 2021). Sendo assim, a massa tumoral é composta por células que apresentam diferentes níveis de sensibilidade a tratamentos (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). Portanto, compreender os eventos responsáveis por produzir essas variabilidades podem auxiliar na compreensão da natureza do câncer e no desenvolvimento de terapias mais eficazes (MCGRANAHAN; SWANTON, 2017).

Diferentes níveis de heterogeneidades são descritos em tumores, dentre eles, podemos destacar as heterogeneidades: intratumoral, intertumoral e interpaciente (BURRELL et al., 2013; GRZYWA; PASKAL; WŁODARSKI, 2017). A heterogeneidade intratumoral (*ITH*) é definida pela existência de células com características fenotípicas e/ou moleculares distintas dentro de um mesmo tumor (**Figura 1A**). Já a heterogeneidade intertumoral é definida quando cânceres derivados de diferentes tecidos apresentam características diferentes (**Figura 1B**) e, o terceiro nível de heterogeneidade, denominado heterogeneidade interpaciente, caracteriza-se quando existem diferenças entre tumores em diferentes pacientes (**Figura 1C**).

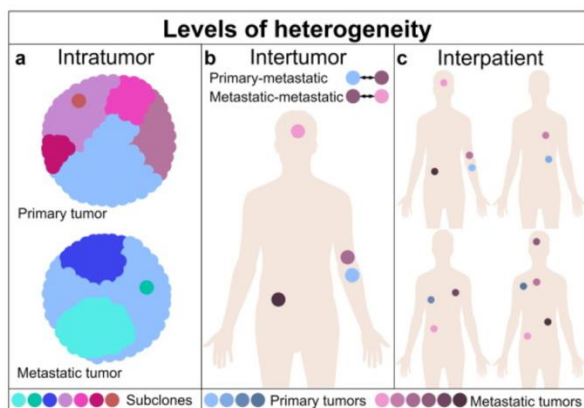


Figura 1: Diferentes níveis de heterogeneidade tumoral. A) Heterogeneidade Intratumoral. B) Heterogeneidade Intertumoral. C) Heterogeneidade Interpaciente. Figura retirada e adaptada de “*Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma*” (Grzywa et al., 2017).

A compreensão das heterogeneidades presentes em tumores pode fornecer informações importantes para auxiliar tanto no diagnóstico, quanto no tratamento (YI et al., 2017). Por exemplo, o câncer de mama é classicamente subdividido de acordo com a presença ou ausência de receptores hormonais e/ou receptores de tirosina quinase (HER2) na superfície das células. Nesse sentido, a *ITH* fornece características específicas do tumor, as quais podem ser utilizadas como biomarcadores para o direcionamento de tratamentos específicos (ROULOT et al., 2016). Sendo assim, cânceres de mama que apresentam superexpressão de receptores do tipo HER2 (HER2+), por exemplo, podem ser tratados com terapias direcionadas a HER2, incluindo os anticorpos anti-HER2 (como trastuzumabe e pertuzumabe) e inibidores de tirosina quinase de pequenas moléculas (como lapatinibe e neratinibe) (VON LINTIG et al., 2000; WOLFF et al., 2013).

Por outro lado, a *ITH* pode fazer com que pacientes sejam submetidos a regimes terapêuticos específicos em situações em que talvez apenas poucas das células tumorais sejam positivas para o alvo considerado. Dessa maneira, as terapias direcionadas levam a regressão do tumor em um primeiro momento, seguido de um subsequente crescimento das populações resistentes que estavam ali presentes, promovendo à recorrência a longo prazo (RAMÓN Y CAJAL et al., 2020).

Dessa maneira, a *ITH* atua como um dos principais determinantes da ineficácia terapêutica e uma das principais razões para a baixa sobrevida global em pacientes com câncer em estágios avançados (GREAVES, 2015). Além disso, cada paciente apresenta uma história evolutiva tumoral única, levando a uma composição clonal complexa, favorecendo a heterogeneidade fenotípica em tumores (LENZ et al., 2021; MARTINEZ et al., 2018). Portanto, métodos que objetivam o estudo de fenótipos em células individuais e suas fontes de variações, são considerados chave para compreender o comportamento de células durante a evolução do tumor e na terapêutica de tumores primários e metástases (Lenz et al., 2021).

1.1. Níveis e origens da *ITH*

A *ITH* é crucial para determinar a ineficiência terapêutica e favorecimento da carcinogênese (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). A *ITH* é tipicamente atribuída à diversidade genética encontrada em populações de células tumorais (RAMÓN Y CAJAL et al., 2020). No entanto, evidências mais recentes sugerem que um tumor é heterogêneo em diferentes características fenotípicas, mostrando que a *ITH* é composta tanto por variabilidades de conteúdos genéticos, quanto epigenéticos (BLACK; MCGRANAHAN, 2021; WANG et al., 2021). Populações subclonais geneticamente distintas de células surgem através de variações genéticas que promovem vantagem fenotípica de um determinado clone no microambiente tumoral, contribuindo com a variabilidade genética e fenotípica encontrada em tumores (BLACK; MCGRANAHAN, 2021; GATENBY; GILLIES; BROWN, 2011).

Dentre os principais níveis de *ITH*, podemos destacar as diferenças genéticas clonais intratumorais; as variabilidades observadas em nível de células únicas e a flutuação unicelular ao longo do tempo e/ou a partir da mitose (**Figura 2**). Inicialmente, alterações neoplásicas geralmente derivam de um único clone, o que significa que o espaço genômico ocupado por essas células é relativamente pequeno. Porém, com o passar do tempo, a instabilidade genômica leva ao acúmulo de diferentes mutações, promovendo o aumento da heterogeneidade entre diferentes clones que compõem a massa tumoral, constituindo as diferenças genéticas clonais intratumorais (MARTINEZ et al., 2018).

Em glioblastomas (GBMs), variações no número de cópias de receptores de tirosina quinases (RTKs), EGFR e PDGFRA, foram identificadas em células do mesmo espécime de tumor através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (LITTLE et al., 2012; SZERLIP et al., 2012). Da mesma maneira, variações genéticas também foram observadas em outros tipos de cânceres, como em carcinoma de células renais (RCC) (GERLINGER et al., 2012) e em câncer de mama (PARK et al., 2010; TORRES et al., 2007). Dentre eles, um estudo envolvendo 21 amostras de câncer de mama observou que, embora cada tumor tenha um tipo de subclone dominante de células tumorais, a diversidade subclonal foi proeminente em todos os tumores (NIK-ZAINAL et al., 2012).

Além disso, cada subclone pode ser composto por uma ampla variedade a nível de células únicas (**Figura 2**). Patel e colaboradores mostraram que células individuais dentro de um tumor apresentam características de diferentes subtipos de glioblastoma (PATEL et al., 2014). Similarmente, a coexistência de vários subtipos de câncer de mama foi observada em células únicas de um mesmo tipo de tumor (GAO et al., 2017). Essa plasticidade e, conseqüente heterogeneidade fenotípica, pode explicar por que pacientes evoluem rapidamente para resistência à quimioterapia (CAREY et al., 2010; CAREY, 2011; SCHNEIDER et al., 2008).

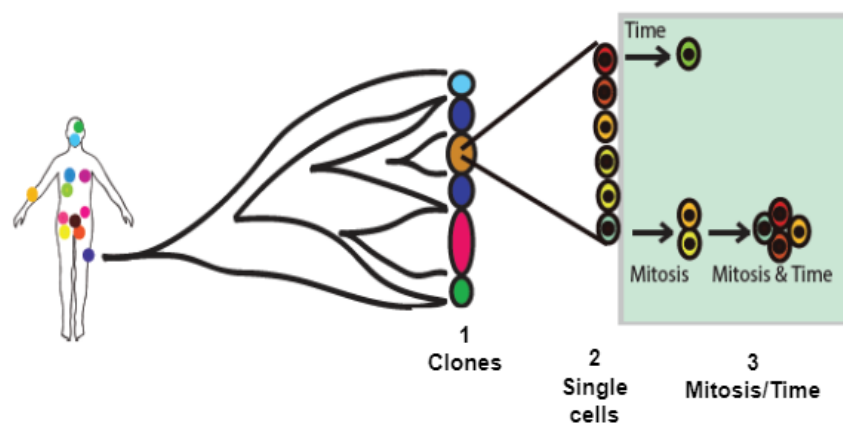


Figura 2: Níveis e origens da ITH. (1) diferenças genéticas clonais intratumorais; (2) variabilidades em nível de células únicas; e (3) flutuação unicelular ao longo do tempo e/ou mitose. Figura retirada e adaptada do artigo: *The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer* (Lenz et al., 2022).

Uma fonte potencial que contribui com a geração de variabilidades a nível celular é a mitose assimétrica (AM), onde logo após a mitose células irmãs já apresentam características diferentes entre si (BUSS et al., 2023). Além da AM, a flutuação celular ao longo do tempo também pode ser responsável por produzir variabilidades em células únicas (GONZALEZ DE CASTRO et al., 2013, BUSS et al., 2023). Nesse sentido, o próprio nível de sinalização celular contribui com a variabilidade unicelular em tumores. Por exemplo, células individuais expostas à mesma dose de radiação ionizante recebem diferentes quantidades de danos de quebra dupla, sugerindo que, mesmo que o microambiente seja semelhante, células individuais podem apresentar respostas diferentes (LOEWER et al., 2013). Em outras palavras, células expostas ao mesmo sinal podem apresentar respostas variadas devido à natureza estocástica das reações bioquímicas que

governam a produção e degradação de moléculas individuais (PAULSSON, 2004).

Além da variação fenotípica estocástica pré-existente, a variação fenotípica unicelular também pode surgir como consequência de como células individuais respondem aos tratamentos. Por exemplo, a exposição de células de câncer de cólon à quimioterapia leva à ativação heterogênea da proteína supressora de tumor pró-apoptótica p53 e de proteínas anti-apoptóticas, promovendo o acúmulo progressivo de proteínas antiapoptóticas e aumento gradual do limiar de p53 necessários para desencadear a morte celular (PAEK et al., 2016).

Similarmente, um mecanismo foi identificado no contexto da apoptose induzida por TRAIL, onde a taxa inicial de atividade da caspase-8 foi capaz de distinguir se uma célula sofrerá apoptose ou sobreviverá após exposição crônica à terapia alvo, resultando em morte celular fracionada (ROUX et al., 2015). Dessa forma, a heterogeneidade de sinalização além de favorecer a variabilidade de resultados celulares imediatos, também é capaz de alterar a distribuição de estados fenotípicos em uma população, influenciando consequentemente, a sensibilidade de células individuais a tratamentos.

Dessa maneira, a plasticidade das células tumorais pode ser considerada característica mediadora da evolução da resistência genética (LIONETTI; FUMAGALLI; LA PORTA, 2020). Sendo assim, a heterogeneidade não-genética tem sido caracterizada como uma fonte de diversidade molecular e fenotípica, que resulta na geração de respostas celulares variadas em populações de células isogênicas (REYES; LAHAV, 2018). Nesse sentido, entender os mecanismos que as células utilizam para adquirir fenótipos resistentes é de extrema relevância para o desenvolvimento de terapias mais eficazes.

Devido à grande relevância da heterogeneidade não-genética, recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs o racional de um mapa G-P estendido (*extended Genome–Phenome Cone*, eG-P) para melhor compreensão da geração de variabilidades em câncer (LENZ et al., 2022). O eG-P *map* apresenta-se em formato de cone, representando células que são inicialmente semelhantes na camada do genoma, mas gradualmente aumentam sua

variabilidade em níveis: epigenômicos, transcriptômicos, proteômicos, metabolômicos e sinalômicos, produzindo por fim, a vasta variabilidade encontrada na camada chamada de *phenome* (Figure 3).

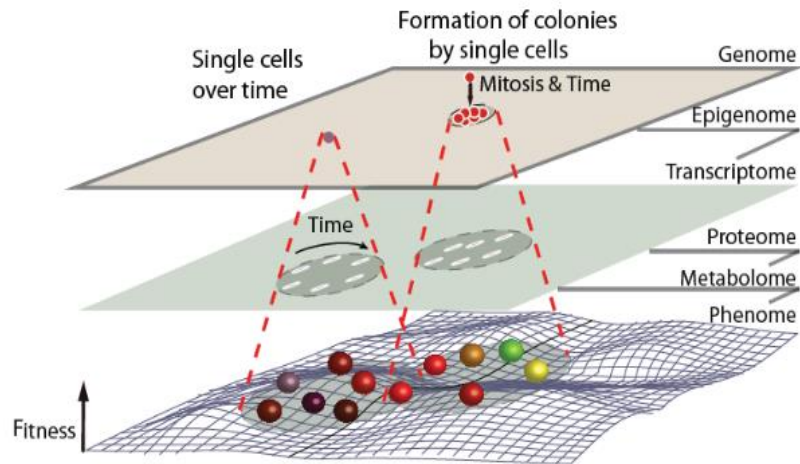


Figura 3: Ilustração do eG-P *map* formado pelas características de células clonais ou de uma única célula ao longo do tempo nas diferentes camadas do mapa eG-P. Figura retirada e adaptada do artigo: “*The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer*” (Lenz et al., 2022).

Além disso, o entendimento de que a heterogeneidade fenotípica é de extrema relevância para a tumorigênese fez com que, recentemente, essa característica fosse adicionada aos *Hallmarks of Cancer* (Figura 4) (HANAHAN, 2022). De maneira geral, os *Hallmarks of Cancer* foram propostos como um conjunto de características funcionais que são cruciais para células humanas atingirem estados de crescimento neoplásico e formar tumores malignos (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011, 2011).

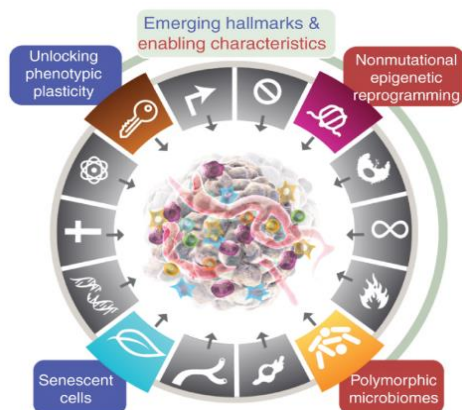


Figura 4. Hallmarks of cancer. Características essenciais para a tumorigênese. A plasticidade fenotípica “*Unlocking phenotypic plasticity*” foi uma das características recentemente adicionada aos *Hallmarks*. Figura retirada e adaptada do artigo: “*Hallmarks of Cancer: New Dimension*” (Hanahan, 2022).

Evidências crescentes de que células são capazes de evadir ou escapar do estado de diferenciação, classicamente conhecido como anti-proliferativo, é um componente crítico da patogênese do câncer (YUAN; NORGDAL; STANGER, 2019). Além disso, a transdiferenciação também pode operar, na qual as células que foram inicialmente comprometidas em uma via de diferenciação mudam para um programa de desenvolvimento totalmente diferente, adquirindo assim características específicas do tecido que não foram pré-ordenadas por suas células de origem normais. A partir dessas constatações, a plasticidade fenotípica (*Unlocking phenotypic plasticity*) foi considerada como um novo *Hallmark of Cancer*.

2. Mitose

A mitose é o processo de divisão celular onde uma célula mãe se divide em duas células filhas. Durante a divisão celular, o fuso mitótico, se estende através dos centrossomos, organela localizada simetricamente em extremidades opostas da célula, facilitando a formação do fuso mitótico (VASQUEZ-LIMETA; LONCAREK, 2021). Dessa maneira, o fuso mitótico e sua organização altamente simétrica, garante a segregação cromossômica simétrica entre duas células filhas (BARRAL; LIAKOPOULOS, 2009).

A mitose simétrica (*SM*) é responsável pela segregação de DNA e de organelas de maneira igualitária entre as células filhas, sendo um processo essencial para o sucesso de qualquer organismo vivo (MCINTOSH, 2016). A simetria existente durante a segregação de cromossomos entre células filhas é um processo extremamente controlado (HARTWELL; SMITH, 1985). Imprecisões durante o processo de *SM*, que resultam em alterações cromossômicas, apresentam consequências letais para organismos unicelulares (MCINTOSH, 2016). Similarmente, em organismos multicelulares, a perda autossômica pode ser incompatível com a vida. Por exemplo, embriões murinos com perda cromossômica morrem significativamente mais cedo quando comparados a embriões com aquele cromossomo extra (CHUNDURI; BARTHEL; STORCHOVA, 2022; MAGNUSON et al., 1985). Além disso, a aneuploidia resultante da segregação desigual de cromossomos é considerada

um fator importante para a carcinogênese (CHUNDURI; BARTHEL; STORCHOVA, 2022). Portanto, podemos inferir que o processo clássico de divisão celular é altamente preciso e controlado para que ocorra de maneira simétrica, ou seja, deve resultar na produção de células filhas geneticamente semelhantes, permitindo assim a existência de vida em diferentes organismos.

2.1. Mitose assimétrica (AM)

A mitose assimétrica (AM) é um processo de divisão celular observado tanto em organismos unicelulares, quanto em organismos complexos, onde ocorre a produção de células filhas com diferentes características entre si, sejam elas morfológicas e/ou funcionais (KNOBLICH, 2010). Nesse sentido, a AM é responsável por garantir a diversidade celular necessária durante o processo de desenvolvimento de diferentes organismos (KNOBLICH, 2001). Além disso, a AM também se mostra essencial para a manutenção da aptidão celular (*fitness*), ou seja, manutenção da capacidade proliferativa em uma de suas células filhas (HIGUCHI-SANABRIA et al., 2014), sendo também um evento responsável pela manutenção da homeostase tecidual em populações de células tronco (SANTORO et al., 2016).

2.1.1. Importância da AM durante o desenvolvimento

O processo de AM é essencial durante a biologia do desenvolvimento, uma vez que através desse processo células com diferentes características são produzidas, garantindo assim a diversidade celular (KNOBLICH, 2001). Grande parte do conhecimento adquirido até o momento sobre AM deve-se a estudos realizados em neuroblastos de *Drosophila melanogaster* (BOSSING et al., 1996; DOE; BOWERMAN, 2001) e durante o desenvolvimento de *Caenorhabditis elegans* (SULSTON et al., 1983), os quais dependem de AMs para se desenvolverem.

Durante o desenvolvimento desses organismos, a AM pode ser dirigida tanto por fatores intrínsecos, quanto por fatores extrínsecos à célula (**Figura 5**). Dentre os mecanismos de controle intrínsecos, podemos destacar a localização assimétrica de reguladores de polaridade celular, como a montagem do

complexo PAR- α PKC em uma das extremidades da célula em divisão, que é responsável por induzir a polarização do zigoto e dirigir a AM em *C. elegans* (CHEEKS et al., 2004).

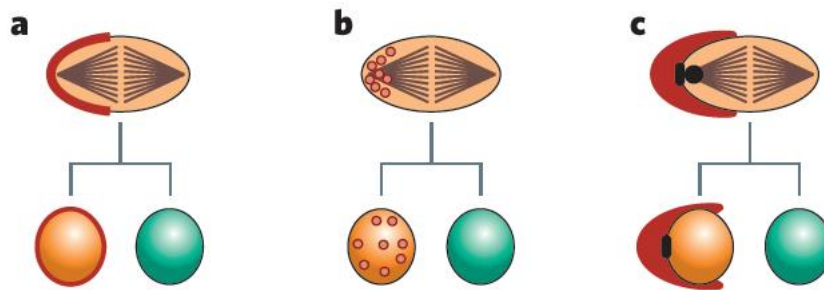


Figura 5. Principais mecanismos de controle dos processos de AM durante o desenvolvimento. **A.** Localização assimétrica dos reguladores de polaridade celular responsáveis por induzir AM. Ilustração da montagem assimétrica do complexo PAR- α PKC em uma extremidade da célula em divisão (vermelho). **B.** Determinantes de destino celular (vermelho) podem ser segregados para o citoplasma de uma célula filha. Ilustração da segregação assimétrica de Numb. **C.** A orientação do fuso mitótico retém apenas uma célula filha no nicho de células-tronco (vermelho), de modo que apenas essa célula-filha tenha acesso a sinais extrínsecos necessários para manter a identidade da célula-tronco. Figura retirada e adaptada do artigo: *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer* (Morrison, et al., 2006).

A polarização celular é um evento crucial para a indução de AM (PREHODA, 2009). Em *C.elegans*, a polaridade celular é induzida através da fecundação, resultando na diferenciação dos eixos anterior e posterior do zigoto a partir da entrada do espermatozóide no oócito. Logo após, a divisão assimétrica se dá ao longo da orientação ântero-posterior, produzindo duas células filhas com tamanhos diferentes, classicamente conhecidas por porção AB e porção P1, as quais produzirão diferentes tipos celulares (CHEEKS et al., 2004; SULSTON et al., 1983).

Já em drosófila, a AM se dá a partir da polarização do eixo apical-basal, produzindo uma célula filha maior, que será responsável por manter características de célula tronco neuronal e, uma célula filha menor, classicamente conhecida por célula-mãe de gânglio (GMC), que será responsável por se dividir mais de uma vez e produzir células neuronais e gliais (BETSCHINGER; KNOBLICH, 2004).

É importante ressaltar que a orientação do fuso mitótico também desempenha um papel essencial durante os processos de *AMs* (BERIKA; ELGAYYAR; EL-HASHASH, 2014). Uma orientação do fuso mitótico de maneira coordenada/paralela ao fator determinante promove uma segregação assimétrica, enquanto que uma orientação do fuso de maneira não coordenada, ou seja, perpendicular ao fator determinante, tende a resultar em uma segregação simétrica (BERIKA; ELGAYYAR; EL-HASHASH, 2014). Por exemplo, a localização de Numb, proteína de membrana identificada pela primeira vez na clivagem de neurônios de *Drosophila*, atua como um importante determinante do destino das células-tronco de *Drosophila* (FRISE et al., 1996; GUO; JAN; JAN, 1996). A proteína Numb, responsável por inibir Notch1, localiza-se assimetricamente em um dos pólos da célula em divisão, de maneira paralela ao fuso mitótico, fazendo com que no momento da divisão, uma das células filhas receba uma concentração muito maior de Numb do que a outra. Sendo assim, após a divisão, a célula que retém maior expressão de Numb é capaz de se diferenciar devido a inibição da sinalização de Notch1, enquanto a outra célula filha permanece com a sinalização de Notch1 ativa, inibindo a diferenciação e permanecendo com identidade de célula tronco (GUO; JAN; JAN, 1996; SHAN et al., 2018). Similarmente, a expressão de Numb atua como determinante de destino celular durante o desenvolvimento cortical de camundongos, sugerindo a conservação dos eventos de *AMs* mediado por Numb em diferentes organismos (SHEN et al., 2002).

Além dos eventos intrínsecos, a *AM* pode ser induzida através da retenção de apenas uma célula filha em determinado nicho do microambiente, de modo que apenas essa célula receba sinais extrínsecos necessários para manter a identidade de célula-tronco, enquanto a outra célula filha é direcionada para diferenciação (MORRISON; KIMBLE, 2006). Um exemplo clássico de *AM* controlada por mecanismos extrínsecos é de células tronco de *Drosophila*, onde a sinalização do nicho de células-tronco desempenha um papel crucial na manutenção da identidade de célula tronco à célula que está retida no nicho (SPRADLING; DRUMMOND-BARBOSA; KAI, 2001; XIE; SPRADLING, 2000; YAMASHITA; FULLER; JONES, 2005).

2.1.2. Importância da *AM* na manutenção da aptidão celular

A capacidade proliferativa das células é comumente avaliada através da aptidão celular (*fitness*), característica associada à capacidade da célula de se reproduzir e deixar descendentes (ORR, 2009). Diversos são os fatores que afetam a aptidão das células, dentre eles, a morfologia das células parece ser um fator capaz de influenciar a frequência com que as células se dividem (LI et al., 2015). Diferentes espécies de bactérias, como por exemplo a *Caulobacter crescentus*, são conhecidas por se dividirem assimetricamente, produzindo células filhas com diferentes características morfológicas e proliferativas (INABA; YAMASHITA, 2012). Antes da divisão celular, a *C. crescentus* desenvolve um pedúnculo que se liga ao substrato, similar a superfície de uma planta. Logo após a divisão, a "mãe" retém esse pedúnculo e permanece no lugar, enquanto a célula "filha" desenvolve flagelos para nadar para longe da célula mãe (GOLEY et al., 2009; LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007). Similarmente, *S. cerevisiae*, produz células filhas morfológicamente diferentes, resultando em uma célula mãe maior e mais velha, e uma célula filha menor e com maior capacidade proliferativa (INABA; YAMASHITA, 2012).

A assimetria morfológica de tamanho é diretamente influenciada pela localização e orientação do fuso mitótico (KALTSCHMIDT; BRAND, 2002). Se o sulco de clivagem está localizado de maneira central na célula, a divisão produzirá células filhas de tamanhos semelhantes. Por outro lado, se o sulco de clivagem não está localizado de maneira central, o processo de divisão ocorrerá de maneira desigual, produzindo células de tamanhos distintos. A localização do sulco mitótico pode ser influenciada por diferentes fatores, por exemplo, deficiências na cinesina Klp10A, proteína que atua na despolimerização dos microtúbulos, resultam no deslocamento do sulco mitótico e produção de células filhas de diferentes tamanhos (CHEN et al., 2016; DELGEHYR et al., 2012; KALTSCHMIDT; BRAND, 2002).

Em *C. elegans*, a entrada do espermatozóide no oócito desencadeia uma série de eventos que resultam em uma subdivisão do córtex celular em um domínio anterior (AB) e posterior (P1), resultando em uma capacidade mais forte do córtex posterior para exercer força sobre o fuso mitótico. Dessa maneira, o fuso é deslocado em direção a extremidade posterior e, portanto, o sulco de divisão se forma de maneira assimétrica, produzindo um blastômero maior (AB)

e um blastômero menor (P1) (ROSE; GÖNCZY, 2018). O blastômero AB resultante, cerca de 25% maior do que o blastômero P1, produz 389 células de um total de 558 células (SULSTON et al., 1983). Similarmente, durante a neurogênese em *Drosophila*, as células precursoras neuronais (neuroblastos) dividem-se assimetricamente e o neuroblasto recém-nascido e, aproximadamente 75% maior, divide-se até 30 vezes mais quando comparado a sua GMC (BOSSING et al., 1996).

Além de assimetrias morfológicas, o acúmulo de estruturas e/ou componentes subcelulares envelhecidos estão associados a diminuição de aptidão em diferentes tipos celulares (AGUILANIU et al., 2003; MCFALINE-FIGUEROA et al., 2011). Nesse contexto, o processo de *AM* atua mantendo a capacidade proliferativa de uma das células filhas, uma vez que permite com que conteúdos maléficos ou danosos sejam distribuídos de maneira assimétrica à somente uma de suas descendentes. Organismos unicelulares, como bactérias e leveduras, segregam assimetricamente fatores associados ao envelhecimento, visando manter a capacidade proliferativa das células filhas (HIGUCHI-SANABRIA et al., 2014; LINDNER et al., 2008).

Durante o brotamento de *S. cerevisiae*, agregados proteicos, proteínas danificadas e/ou mal dobradas, assim como organelas associadas ao envelhecimento, são retidos na célula mãe, priorizando a capacidade proliferativa da célula filha (HIGUCHI-SANABRIA et al., 2014). Similarmente ao que acontece em levedura, a presença de agregados proteicos em células de *E. coli* que herdam o pólo da célula mãe, está significativamente correlacionada com taxas de crescimento diminuídas (LINDNER et al., 2008). Em ambas as situações, a *AM* ocorre visando excluir componentes deletérios e nocivos à célula filha, visando manter a célula mais jovem com maior aptidão celular. Embora a natureza estocástica ou determinística desses eventos seja pouco abordada na literatura, em *E. coli*, 47% da segregação assimétrica de danos ao DNA em uma das células filhas parece ocorrer de maneira determinística (CHAO et al., 2016). Além disso, esse estudo sugere que a natureza determinística, nesses casos, tenha sido uma evolução de eventos estocásticos mais eficientes (CHAO et al., 2016).

Ao longo dos processos de divisão e, conseqüente envelhecimento, é possível que células-tronco, durante a regulação da homeostase tecidual, sofram danos cumulativos que podem levar a sua exaustão e, eventualmente, comprometer sua função no tecido (ROSSI et al., 2007). Portanto, células tronco de mamíferos também utilizam dos processos de *AM* visando segregar diferencialmente componentes subcelulares envelhecidos e/ou potencialmente danificados entre células filhas. Por exemplo, células tronco epiteliais mamárias humanas segregam assimetricamente mitocôndrias envelhecidas em apenas uma de suas células filhas, garantindo maior capacidade proliferativa e reprodutiva à célula que retém mitocôndrias mais jovens (KATAJISTO et al., 2015).

Em mamíferos, durante a maturação do oócito e extrusão do corpúsculo polar, o percentual de área ocupada pelas mitocôndrias em torno do polo direcionado para o oócito é significativamente maior ($23,7 \pm 1\%$) quando comparado ao percentual de área ocupada pelas mitocôndrias no corpo polar emergente ($4,8 \pm 1\%$), sugerindo a existência de um mecanismo de retenção das mitocôndrias no oócito, garantindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) (DALTON; CARROLL, 2013). Similarmente, em leveduras, a maquinaria de herança mitocondrial promove a retenção de mitocôndrias de mal funcionamento nas células-mãe, enquanto as células filhas são enriquecidas com mitocôndrias de maior qualidade, garantindo maior aptidão as células filhas (MCFALINE-FIGUEROA et al., 2011). Além de organelas, leveduras também distribuem assimetricamente proteínas danificadas oxidativamente, garantindo a capacidade proliferativa da célula filha em brotamento (AGUILANIU et al., 2003; SPOKOINI et al., 2012).

Durante o brotamento de leveduras, fatores de retenção de peroxissomos também se associam seletivamente às organelas mais velhas, proporcionando um aumento de aptidão populacional (KUMAR; DE BOER; VAN DER KLEI, 2018). Em células tronco de mamíferos também foi demonstrado que a perda da proteína de membrana peroxissômica (PEX11b), que previne a localização peroxissomal em ambos os pólos do fuso, promove a segregação assimétrica dos peroxissomos e falha na diferenciação, sugerindo um papel fundamental da

herança dessa organela no equilíbrio entre proliferação e diferenciação (ASARE; LEVORSE; FUCHS, 2017).

Além de mitocôndrias e peroxissomos, a segregação assimétrica de retículo endoplasmático (BABOUR et al., 2010) e DNA ribossomal circular extra-cromossômicos (ERCs) (SINCLAIR; GUARENTE, 1997) também está associada com a manutenção da viabilidade celular de leveduras, destacando o importante papel da segregação assimétrica na manutenção de propriedades proliferativas em diferentes organismos.

2.1.3. *AM* e manutenção da homeostase tecidual

A *AM* também é considerada um importante mecanismo para a manutenção da homeostase celular, onde a partir de uma única divisão, ocorre a geração de uma célula com propriedades de células tronco, simultaneamente à geração de uma célula com potencial altamente especializado (YAMASHITA et al., 2010). Durante a *AM* de células tronco, uma célula mãe se divide assimetricamente produzindo uma célula filha com características altamente proliferativas, responsável por garantir a manutenção da população, enquanto a outra é capaz de se diferenciar em diferentes tipos celulares, garantindo a diversidade celular (**Figura 6A**). No entanto, células tronco também utilizam de *SM* (**Figura 6B**) para produzir duas células filhas com características proliferativas ou produzindo duas células filhas com características de células tronco (MORRISON; KIMBLE, 2006). Além destas, células-tronco também podem realizar *AM* produzindo uma combinação de células tronco e células diferenciadas através de uma única divisão (**Figura 6C**).

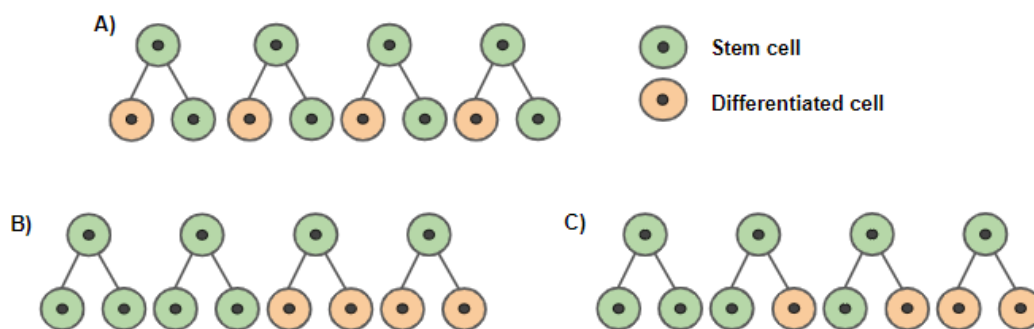


Figura 6: Possíveis estratégias de células-tronco para manter um equilíbrio entre células-tronco e célula diferenciada. **A.** Divisão celular assimétrica: cada célula-tronco

gera uma célula-tronco e uma célula destinada à diferenciação. **B.** Divisão celular simétrica: cada célula pode se dividir simetricamente para gerar duas células-tronco ou duas células diferenciadas. **C.** Combinação de divisões celulares simétricas e assimétricas em populações de células-tronco.

O controle no balanço entre a proporção de *SM* e *AM* é considerado essencial para a manutenção da homeostase em tecidos saudáveis. Uma vez que a proporção de *AM* diminui, enquanto a proporção de *SM* aumenta, produzindo em excesso células com alta capacidade proliferativa, ocorre o crescimento desordenado no tecido, favorecendo o surgimento de displasias (**Figura 7**). Dessa maneira, podemos afirmar que o equilíbrio entre a capacidade de autorrenovação e diferenciação de células-tronco deve ser precisamente controlado, uma vez que alterações nessa proporção podem estar associadas inclusive à carcinogênese (CAUSSINUS; GONZALEZ, 2005).

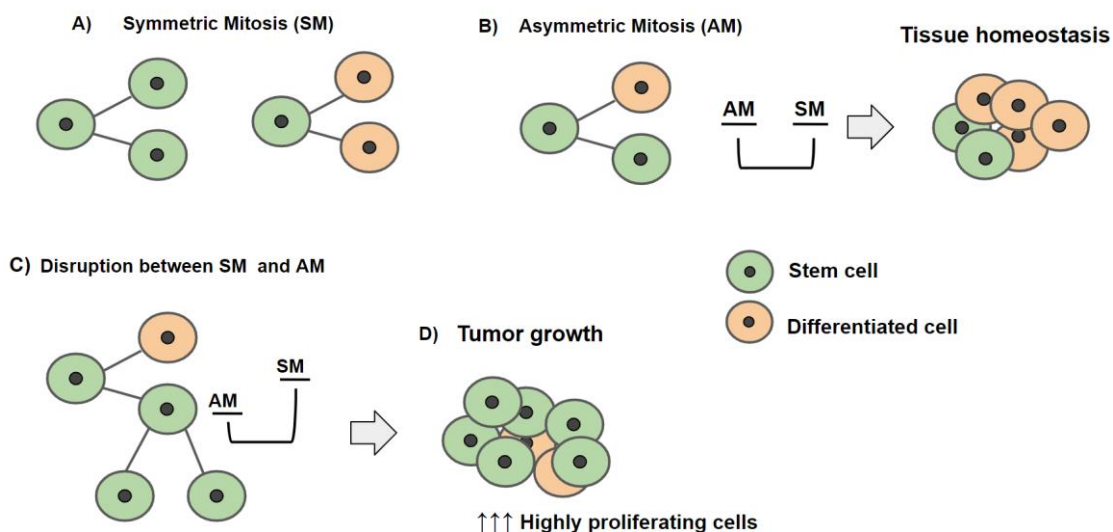


Figura 7. Mitose simétrica (SM) x Mitose Assimétrica (AM). Ilustração da importância do balanço entre os processos de mitoses simétricas e assimétricas na manutenção da homeostase tecidual.

2.1.4. AM como fonte da *ITH*

Cânceres são caracterizados por apresentarem heterogeneidades de diferentes fenótipos, especialmente proliferativos (LENZ et al., 2022). Além disso, sabendo que o câncer é uma doença que apresenta proliferação desregulada (disponível em www.inca.com.br, acessado 22/12/22), a aptidão pode ser considerada o fenótipo mais importante para a biologia do câncer.

Conforme já mencionado, a *AM* é descrita tanto em procariotos, quanto em eucariotos, estando associada principalmente a produção de células filhas com diferentes capacidades proliferativas (HIGUCHI-SANABRIA et al., 2014; LINDNER et al., 2008). Da maneira forma, o processo de *AM* descrito em células tronco, atua produzindo células filhas com diferentes fenótipos proliferativos (INABA; YAMASHITA, 2012). Nesse sentido, é possível inferir que os processos de *AMs*, que resultam em maior aptidão à uma de suas células filhas, contribuam com a variabilidade proliferativa observada em tumores (LIU et al., 2018).

Além disso, a *AM* é descrita em células tumorais tanto resultando na produção de células filhas com diferenças morfológicas (TSE; WEAVER; CARLO, 2012; ZHANG et al., 2014), quanto na segregação diferencial de componentes subcelulares (LE ROY et al., 2010; LIU et al., 2013). Células de glioblastoma co-segregam assimetricamente o receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR) e o receptor de neurotrofina P75 (p75NTR), e o enriquecimento desses receptores em uma célula filha foi associada a resistência a inibidores de EGFR (HITOMI et al., 2021).

Variabilidades de sobrevivência também foram observadas em células gigantes poliplóides cancerígenas (PGCCs), que, sob condições de estresse, são capazes de se dividir assimetricamente gerando células filhas de diferentes tamanhos e com diferentes capacidades de sobrevivência (ZHANG et al., 2014). Dessa maneira, a *AM* também é responsável pela geração de diferentes fenótipos celulares, favorecendo o surgimento de células filhas com diferentes níveis de tolerância a tratamentos.

Conforme já mencionado, fatores externos e/ou internos são capazes de influenciar a indução de *AMs*. Nesse sentido, o microambiente tumoral desempenha um importante papel na alteração de fenótipos celulares e indução de *AMs* (PINE et al., 2010). Em condições de hipóxia e redução de soro, células tumorais tendem a perder características de células diferenciadas, permanecendo com fenótipo de células tronco. Além disso, variabilidades nas taxas de *AMs* foram associadas à confluência de células de câncer de pulmão, onde maiores densidades foram associadas a maiores taxas de *AMs* (PINE et al., 2010).

Além de influências externas, influências intrínsecas também são responsáveis por favorecer *AMs*. Células de glioblastoma segregam assimetricamente a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um dos principais filamentos astrocitários, influenciando a regulação de destino de CSCs (CUSULIN et al., 2015; GUICHET et al., 2016). Filamentos intracelulares desempenham um importante papel na organização do citoplasma. Dessa maneira, podemos inferir que a segregação simétrica desses componentes é crucial para promover a segregação igualitária dos diferentes componentes subcelulares entre células filhas.

Variabilidades estocásticas derivadas de reações bioquímicas e/ou moleculares são responsáveis por produzir grande parte da heterogeneidade observada em tumores (HUH; PAULSSON, 2011). No entanto, embora *AMs* sejam cruciais para a geração de diversidade em tumores, é importante mencionar que as *AMs* nem sempre são eventos pró-tumorais. Células de câncer colorretal (HCT116), após serem tratadas com inibidor da proteína do fuso monopolar 1 (MPS-1), proteína importante durante a verificação de montagem do fuso, resultam na segregação assimétrica de cromossomos, produzindo células filhas não viáveis (JEMAÀ et al., 2013). Portanto, podemos sugerir que o processo de *AM* nem sempre resulta no aumento de aptidão em células tumorais. Eventos de *AMs* gerando variabilidade de fenótipos em células irmãs, exclusivamente em células tumorais, serão abordados com mais detalhes no capítulo II desta tese. Além disso, discutimos o quanto os eventos de *AM* são específicos de células tronco tumorais e seu impacto sobre a aptidão das células filhas.

3. Ciclo celular

O ciclo celular é composto por uma série de etapas que culminam na divisão celular. Dentre as principais etapas do ciclo celular estão a fase S, onde ocorre a síntese de DNA e a fase M, onde ocorre a mitose. Essas duas fases principais são conectadas pelas fases G – *growth*, onde ocorre o crescimento e produção de componentes subcelulares (SURYADINATA; SADOWSKI; SARCEVIC, 2010). Anteriormente a fase S, ocorre o crescimento da célula e

produção de componentes necessários para a síntese de DNA (fase G₁). Da mesma maneira, anteriormente a mitose, ocorre a duplicação de organelas e de componentes que serão divididos entre as duas células filhas (fase G₂) (OUELLET; BARRAL, 2012).

A progressão do ciclo celular é um evento extremamente controlado, e, esse controle, se dá através da fosforilação e desfosforilação de proteínas envolvidas em cada etapa do ciclo, garantindo assim a sua unidirecionalidade (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013). De maneira geral, as principais proteínas envolvidas durante a progressão do ciclo celular são as ciclinas e as quinases dependente de ciclinas (CDKs), que formam complexos específicos, conhecidos por ciclina/CDK (MALUMBRES, 2014; MALUMBRES et al., 2009; MALUMBRES; BARBACID, 2005). Por exemplo, durante a transição entre as fases G₁ e S, as CDK4/6 e CDK2 são ativadas através da sua ligação com as ciclinas D e E, respectivamente. Da mesma maneira, a CDK1 é ativada através da sua ligação com a ciclina B durante a fase G₂, permanecendo ativada até o final da fase M (GAVET; PINES, 2010; HARBOUR; DEAN, 2000). A principal função desses complexos é fosforilar substratos associados à progressão do ciclo celular, como por exemplo, a proteína do retinoblastoma (proteína Rb), responsável por translocar o fator de transcrição E2F do citoplasma para o núcleo da célula, ativando a expressão de genes responsáveis pela progressão do ciclo (DYSON, 1998; SEVER-CHRONEOS et al., 2001).

Durante a progressão do ciclo celular, as CDKs podem ser inibidas por proteínas inibidoras de CDKs (CDKis) (CROSBY, 2007; JEFFREY; TONG; PAVLETICH, 2000). Dessa maneira, podemos dizer que a atividade das CDKs pode ser regulada positivamente através da ligação com ciclinas e negativamente através da ligação com CDKis (LIM; KALDIS, 2013). Além destas, proteínas quinases e fosfatases são responsáveis por regular as três classes de proteínas envolvidas durante a progressão do ciclo, garantindo assim a sua unidirecionalidade (SURYADINATA; SADOWSKI; SARCEVIC, 2010).

Além disso, o ciclo celular apresenta regulação ao longo de suas diferentes fases. Dentre elas, as três principais etapas de controle (*checkpoints*) ocorrem durante a passagem de G₀/G₁ para S de G₂ para M e durante a anáfase da mitose (MURRAY, 1994). Inicialmente, a entrada das células em fase S depende

de sinais mitogênicos extracelulares (LIMAS; COOK, 2019). Nesse contexto, diferentes sinais extracelulares estão envolvidos na passagem de G₀/G₁ para a fase S, como por exemplo o fator de crescimento EGF, responsável por atuar na via das MAPKs e PI3K/Akt, e o TGF- β que atua através de SMADs (**Figura 8**) (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013). A via das MAPKs, mais especificadamente a via da ERK, será abordada com mais detalhes no próximo capítulo desta tese.

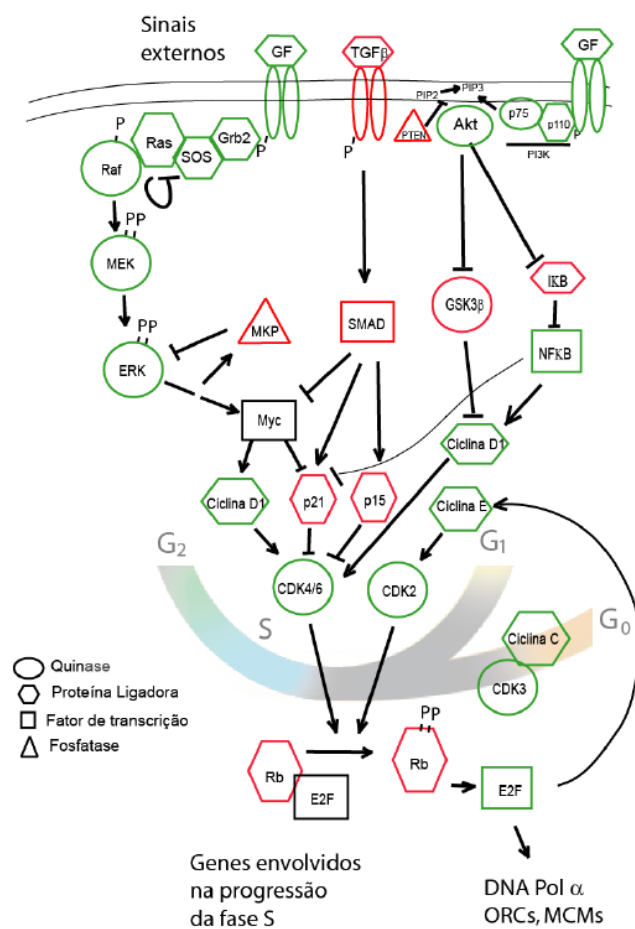


Figura 8: Sinalização envolvida na passagem de G₀/G₁ para fase S. Ilustração das vias das MAPKs, PI3K/Akt, e TGF- β ativadas por sinais extracelulares. Figura retirada do Capítulo 20, Ciclo celular, do livro de Genética Molecular Básica, de Menck e colaboradores, publicado no ano de 2017.

Durante a fase S, a duplicação do DNA deve ser completa e precisa, uma vez que falhas nesse processo reduzem a sobrevivência celular e podem resultar no desenvolvimento de neoplasias (FRIEDBERG, 2003; HOEIJMAKERS, 2001). Portanto, durante a síntese de DNA, complexos ciclinas/CDKs são responsáveis por fosforilar o complexo de reconhecimento de origem de replicação (ORC), garantindo que novos complexos não sejam formados (Menck et al., 2017). Além

disso, sugere-se que exista um ponto de verificação interno da S, responsável por desativar a CDK2 em resposta a danos ao DNA ou após estresse replicativo, que bloqueia a montagem da ORC evitando a replicação do DNA danificado (CIARDO; GOLDAR; MARHEINEKE, 2019). Dessa maneira, a transição da fase S para a fase G2 é regulada pela quinase ATR (ataxia-telangiectasia e relacionado a Rad3) que promove a parada no ciclo celular até o reparo do DNA possivelmente comprometido (SALDIVAR et al., 2018).

Similarmente, quebras de fita dupla no DNA ocorridas durante a fase S tendem a se acumular e, portanto, precisam ser reparadas antes que a célula progrida no ciclo (AFONSO et al., 2014; WEINERT; HARTWELL, 1988). Sendo assim, durante a passagem de G2 para M, o DNA recém replicado precisa estar intacto para que ocorra a mitose. Portanto, durante a passagem de G2 para M, ocorre a verificação da qualidade do DNA antes da separação em duas células filhas (Menck et al., 2017). Nesse sentido, danos ao DNA são responsáveis por ativar uma série de proteínas quinases, dentre elas a ATM (*Ataxia Telangiectasia – Mutated*) que promovem parada no ciclo celular e, por fim, culminam em catástrofe mitótica, caso o dano não seja reparado (LIMAS; COOK, 2019). Dessa maneira, podemos dizer que os pontos de controle, existentes nas diferentes fases do ciclo, garantem a integridade genômica e progressão ordenada do ciclo celular (POON, 2016).

4. ERK

A proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) é responsável por regular uma série de processos celulares como a proliferação, a diferenciação e a apoptose. Conforme mencionado, a via da ERK é uma das principais vias ativadas por sinais extracelulares que promovem a entrada das células em fase S do ciclo celular (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013; LIMAS; COOK, 2019). A ERK é pertencente à família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (*MAPKs*) (GUO et al., 2020), cuja ativação sequencial se dá através de um mecanismo de transdução intracelular de sinal altamente conservado (KESHET; SEGER, 2010).

As MAPKs são responsáveis por fosforilar serinas e treoninas específicas de substratos de proteínas alvo. Dentre os principais substratos de MAPKs estão: proteínas quinases, fosfolipases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (JOHNSON; LAPADAT, 2002). A regulação das MAPKs se dá através de proteínas fosfatases, que são responsáveis por remover o fosfato adicionado pelas MAPKs à proteína alvo. Dessa maneira, o comportamento da célula pode ser modulado em resposta a fatores associados ao microambiente, através da adição e remoção de fosfatos, por MAPKs e fosfatases, respectivamente.

As vias principais das MAPKs são usualmente nomeadas pelo componente central da via de sinalização, dentre as principais vias de MAPKs identificadas, encontram-se: quinase c-Jun N-Terminal (JNK), p38 e quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) (JOHNSON; LAPADAT, 2002), sendo esta última comumente associada a carcinogênese. A via de sinalização de ERK 1/2 é inicialmente ativada por estímulos extracelulares, seguido da ativação intracelular de Ras/Raf/MEK, sendo responsável por traduzir sinais do meio extracelular para interior da célula, onde genes específicos são ativados, desencadeando diferentes respostas (MOLINA; ADJEI, 2006).

A via da ERK é classicamente conhecida por regular a proliferação e a sobrevivência celular (JACQUES-SILVA et al., 2004; LENZ et al., 2000). Além disso, a ativação de ERK é de extrema importância no controle entre pluripotência e diferenciação de células embrionárias (KUNATH et al., 2007; STAVRIDIS et al., 2007), onde sua atividade tem sido associada à regulação de múltiplos fatores envolvidos na transição de pluripotência (DHALIWAL et al., 2018; HAMAZAKI et al., 2006).

Por outro lado, a via de Ras/Raf/MEK/ERK também é comumente associada à transformação celular e tumorigênese (JINESH et al., 2018). Mutações em KRAS, uma isoforma da proteína Ras, associadas à ativação constante de ERK e consequente aumento da proliferação, estão presentes em 15-50% dos cânceres de pulmão (MASCAUX et al., 2005) e em 72–90% dos cânceres pancreáticos (DERGHAM et al., 1997). Além disso, cerca de 40% dos cânceres de esôfago (GALIANA et al., 1995) e 50% dos cânceres de mama

(VON LINTIG et al., 2000) apresentam amplificação do gene KRAS. A via de sinalização de Ras-ERK também encontra-se ativada em câncer colorretal (TAI et al., 2012), onde está associada à promoção da angiogênese, através da alteração da expressão de genes envolvidos na formação de novos vasos sanguíneos (KRANENBURG; GEBBINK; VOEST, 2004). Embora mutações em BRAF sejam de menor frequência em cânceres humanos, 66% dos melanomas malignos apresentam mutações somáticas missense em BRAF, resultando na superativação de BRAF e da via BRAF/MEK/ERK, destacando a importância da via de sinalização de ERK no desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de câncer (DAVIES et al., 2002).

4.1. Variabilidades de ERK em células únicas

Tecnologias que permitem o acompanhamento de ERK em células vivas (BLUM et al., 2017; KUDO et al., 2018; REGOT et al., 2014) têm mostrado que a atividade de ERK é altamente dinâmica em células únicas (CHAVEZ-ABIEGA et al., 2022). Além disso, a modulação da atividade de ERK tem sido associada à diversidade de desfechos celulares (RYU et al., 2016). Nesse contexto, a dinâmica de ERK é associada a diferenciação de células do endoderma e epiblasto, durante a embriogênese (POKRASS et al., 2020). Durante a diferenciação de células embrionárias, a atividade de ERK é altamente variada e diferentes sinais de diferenciação são capazes de induzir perfis distintos de atividades de ERK (DEATHRIDGE et al., 2019).

Além disso, alterações em vias de sinalização que estão associadas a processos que afetam a aptidão da célula são consideradas fontes importantes de *ITH*. Nesse sentido, variabilidades na dinâmica de ERK são essenciais para execução de processos fisiológicos associados a aptidão, como proliferação e diferenciação (ALBECK; MILLS; BRUGGE, 2013; AOKI et al., 2017). Por exemplo, variabilidades na dinâmica de pulso de ERK estão associadas a decisão de entrada da célula tumoral em fase S, fazendo com que células irmãs já apresentem diferenças em termos de ciclo celular e assim, contribuindo com a variabilidade proliferativa da população (Albeck et al., 2013).

Além das variabilidades de ERK estarem principalmente associadas aos processos de proliferação e diferenciação, a dinâmica de ERK também é responsável por influenciar os processos de migração celular. A migração é um processo fundamental tanto em contextos fisiológicos quanto patológicos. De maneira geral, existe a migração de células únicas e a migração coletiva das células (FRIEDL; GILMOUR, 2009). Nesse sentido, a ativação de ERK através de ondas intercelulares é capaz de promover a migração coletiva de células epiteliais, fazendo com que as células migrem coletivamente em direção oposta à onda de ativação de ERK (Friedl and Gilmour, 2009). Além disso, a frequência de pulsos de ERK tem sido associada a capacidade de coordenar as decisões de destino em células de tecido mamário (ENDER et al., 2022). Similarmente, a variabilidade na dinâmica de sinalização de ERK foi associada ao destino de células durante o desenvolvimento de *Drosophila* (JOHNSON; TOETTCHER, 2019), sugerindo que a influência da dinâmica e das variabilidades de ERK em processos celulares não é exclusiva de mamíferos.

Embora as causas da variabilidade na dinâmica de ERK em células individuais seja pouco elucidada na literatura, alguns autores sugerem que os microRNAs sejam os principais responsáveis pela regulação e variabilidade de ERK, sugerindo que, variabilidades na via de ERK sejam desenvolvidas principalmente por mecanismos determinísticos e não estocásticos (ALBECK; MILLS; BRUGGE, 2013; ZHOU et al., 2018). Além disso, a inibição de receptores associados a proteína G (GPCRs) resulta na diminuição da heterogeneidade na dinâmica de ERK, sugerindo um importante papel dos GPCRs na geração de variabilidades de atividade de ERK (CHAVEZ-ABIEGA et al., 2022). No entanto, é importante ressaltar que a ativação de ERK pode ocorrer através de outras maneiras que não envolvam GPCRs, como a partir da sinalização mediada por β -arrestina (JEAN-CHARLES; KAUR; SHENOY, 2017) e transativação de um receptor de tirosina quinases por um GPCR levando à fosforilação de ERK e Akt (CATTANEO et al., 2014).

A AM pode contribuir com as variabilidades observadas em células irmãs através da segregação assimétrica de componentes subcelulares (KASEB et al., 2016; LIU et al., 2013). Nesse sentido, variabilidades em níveis de ERK já foram observadas em células tumorais logo após a mitose, onde foi observado que,

uma célula filha pode apresentar até 9x mais expressão de erbB-2 quando comparado à sua célula irmã (CZERNIAK et al., 1992). Ademais, a segregação assimétrica de receptores associados a ativação da via da ERK, como por exemplo a ativação de EGFR (MCCUBREY et al., 2007), é responsável por promover resistência terapêutica em células-tronco de glioblastoma (HITOMI et al., 2021). Portanto, é importante considerar que os eventos de *AMs* podem atuar como mecanismos geradores de variabilidades em populações tumorais.

Hipótese do trabalho

O entendimento de que o câncer é uma doença dinâmica, onde células únicas são capazes de desenvolver alterações fenotípicas que promovem resistência é crucial para o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Nesse contexto, assumindo que a *AM* é um evento que contribui com a variabilidade de fenótipos em células irmãs, a hipótese desta tese é que células irmãs apresentam variabilidades, especialmente de aptidão, sejam elas produzidas a partir de *AMs* ou desenvolvidas conforme progridem no ciclo celular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da mitose e do tempo na geração de variabilidades de aptidão em células irmãs.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a existência de *AMs* de fenótipos associados a aptidão celular em células tumorais;
- II. Avaliar a variabilidade de ERK em células irmãs como fonte de variabilidade de aptidão em células irmãs;
- III. Avaliar o impacto da mitose e do tempo sobre a variabilidade de ERK em células irmãs;
- IV. Avaliar o impacto da herdabilidade de ERK e *IMT* das células mãe para células filhas.

CAPÍTULO I

APRESENTAÇÃO

A *AM* é um evento classicamente descrito em populações de células tronco, onde resulta na produção de uma célula diferenciada simultaneamente a produção de uma célula tronco, garantindo assim a homeostase tecidual. Nesse contexto, podemos dizer que essa *AM* fisiológica atua como um evento antitumoral, uma vez que o excesso de mitoses simétricas resulta no excesso de células tronco em tecidos inicialmente saudáveis, favorecendo um crescimento desordenado. Por outro lado, sabendo que a *AM* é responsável por produzir células com diferentes características, podemos dizer que a *AM* também pode atuar como um evento pró-tumoral, favorecendo a geração de variabilidades de fenótipos em tumores.

No manuscrito “***The contribution of asymmetric mitosis in the generation of phenotypic heterogeneity in cancer***”, capítulo I desta tese, discutimos a relevância da *AM* promovendo variabilidade em câncer. Nesta revisão, abordamos como a perda do controle da *AM* fisiológica, necessária para o controle da homeostase tecidual, e o surgimento da *AM* patológicas, responsável por gerar variabilidade de fenótipos, contribuem para a carcinogênese. Este manuscrito será submetido ao periódico “*Journal of Cell Science*”, e reforça ainda mais a importância de entender o papel da *AM* em câncer, focando principalmente na geração de heterogeneidade de fenótipos que impactam a biologia da doença e, conseqüentemente, na resposta à terapia.

The contribution of asymmetric mitosis in the generation of phenotypic heterogeneity in cancer

Julieti Huch Buss^{1,2}, Karine Rech Begnini^{1,2,3*} and Guido Lenz^{1,2*}

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

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

3 – Instituto do Cérebro (INSCER), Pontifícia Universidade Católica RS (PUC-RS) Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding authors: lenz@ufrgs.br and karine.begnini@pucrs.br

Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Bento Gonçalves, 9500

Prédio 43431 – Lab. 115

91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Keywords:

Asymmetric mitosis, sister cells, heterogeneity, cancer, cell division, fitness

Abstract

Cells evolved intricate mechanisms for dividing in the most symmetric way. However, a small proportion of mitosis asymmetrically segregate cellular components, leading to differences in several features of the sister cells. Asymmetric mitosis (AM) in pluripotency is classically attributed to stem cells that generate one differentiated cell and one stem cell, but in several other instances AM play roles in physiological conditions. In pathology, cancer is not only impacted by asymmetric segregation of genetic material but also other components leading to differences in fitness and response to therapy. Defining the contribution of AM in generating heterogeneity of key features relevant for cancer biology is essential for advancing in the understanding of the causes of heterogeneity and forms to modulate its generation.

Introduction

Mitosis evolved to be symmetric in most cases, as indicated by the complex machinery that segregates chromosomes equally to daughter cells. All other components are divided by the mitotic furrow that produces close to symmetric partitioning if the cells have homogeneous distribution of these components (Duan and Sun, 2019; Leonard and Grimwade, 2009; Pajpach et al., 2021). However, in some specific cases, cells actively target specific components to one side, which evolved to produce the asymmetric mitosis (AM) essential for development, starting with the first mitosis in which animal and vegetal pole contains very different proteins and RNAs to produce highly asymmetric sister cells (Beddington and Robertson, 1999; Chen et al., 2018; Cooke, 2004). In between these two extremes of symmetric (SM) and asymmetric mitosis (AM), several other cases of AM are being discovered in physiology and pathology.

In physiology, AM is present in multiple organisms from prokaryotes to multicellular eukaryotes (Betschinger and Knoblich, 2004; Chao et al., 2016), being essential for maintaining fitness (Knoblich, 2001) and for development (Lerit et al., 2013). In *Saccharomyces cerevisiae*, AM is mediated by targeting young structures and organelles to one daughter cell with one sister receiving more new organelles, thus maintaining high fitness (Higuchi-Sanabria et al., 2014). Similarly, *Escherichia coli* cells that inherit more protein aggregates have decreased proliferative growth rates (Lindner et al., 2008). During the development of *Caenorhabditis elegans*, asymmetric segregation of the PAR-complex is responsible for directing the zygote's first division (Cheeks et al., 2004). In the same way, asymmetric segregation of determinant proteins such as NUMB is responsible for directing AM during the development of the *Drosophila* nervous system (Bossing et al., 1996).

Among the physiological processes, AM is also an important mechanism for maintaining tissue homeostasis in stem cell populations (Terskikh et al., 2009). In multicellular organisms, AM is mostly linked to stem cells, which produce one stem cell and one cell that differentiates (Knoblich, 2001). In this way, a mother cell is able to divide symmetrically, generating just stem cells or differentiated cells (**Fig 1A**), or asymmetrically, generating a stem cell and a differentiated cell (**Fig 1B**). The plasticity of stem cells in switching division mode

is crucial to ensure tissue homeostasis and regeneration (Simons and Clevers, 2011). In this sense, AM can be considered as a natural control mechanism in healthy tissue, because once there is a decrease in the number of AM and an increase in the number of SM, producing stem cells in excess, an initially healthy tissue will have a disordered growth, leading to dysplasia (**Fig 1C**). In this context, the absence of AM can be considered essential for carcinogenesis and there is a wide and consistent literature addressing AM in stem cells and its importance in controlling homeostasis and preventing carcinogenesis (Mannino et al., 2022; Simons and Clevers, 2011). However, the role of AM as a pro-tumor event, that is, contributing to cancer heterogeneity, especially in fitness, remains unclear. The occurrence of AM has been described in different types of cancer (**Table 1**), suggesting that AM is important not only for physiological but also for pathological conditions. So, in this review, we will address AM in cancer cells, assessing whether asymmetrically dividing cancer cells are stem cells or non-stem cells and how this event may favor the variability of phenotypes observed in cancer cells (**Fig 1D**).

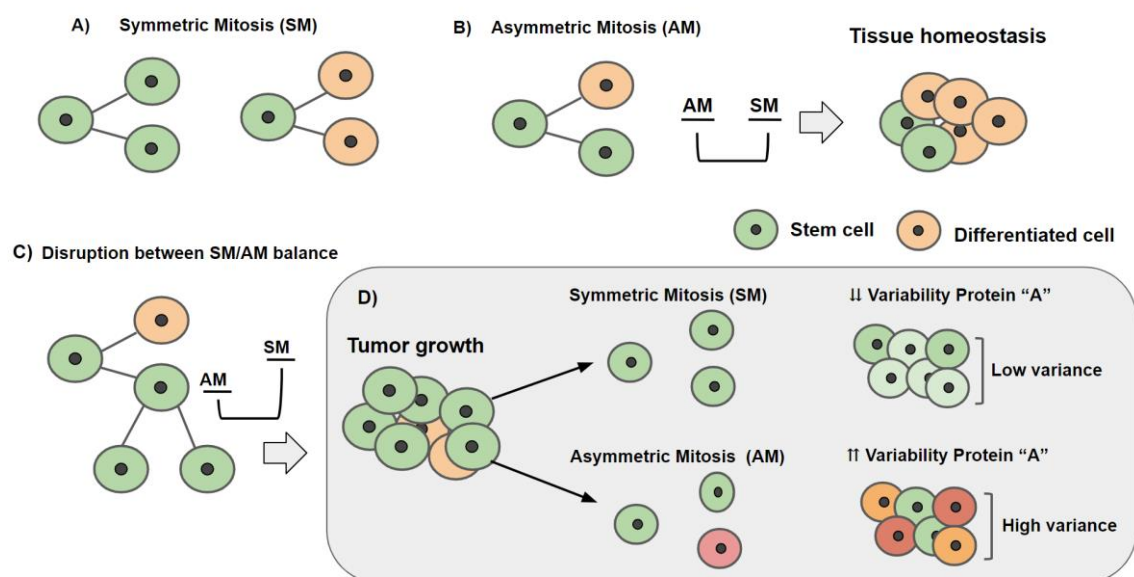


Figure 1. Illustration of the processes of symmetric (**A**) and asymmetric mitosis (**B**) which are essential for maintaining tissue homeostasis. (**C**) Dysregulation between the proportion of symmetric mitosis (SM) and asymmetric mitosis (AM) resulting in the excessive production of stem cells, which have a high proliferative capacity, favoring the appearance of tumors. (**D**) Contribution of AM to intratumoral variability.

AM and phenotype heterogeneity in cancer

Genetic instability is a hallmark of cancer associated with tumor evolution and interpatient variability (Black and McGranahan, 2021; Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011). In healthy tissues, microtubules play an important role during mitotic spindle organization and symmetrical segregation of chromosomes among daughter cells (Jordan and Wilson, 2004). However, in cancer cells, the dynamics of microtubule formation can be altered, promoting abnormal chromosomal disaggregation and favoring the chromosomal aneuploidies commonly observed in cancer (Sansregret and Swanton, 2017).

Centrosome amplification is a common feature of cancer cells, which causes chromosome instability and changes the mitotic spindle bipolarity, altering the number of centrosomes in one of the daughter cells (Fukasawa, 2005; Gisselsson, 2005). Cancer cells can asymmetrically inherit centrosomes which are associated with asymmetric localization of NuMA in neuroblastoma cells without MYC amplification, where one daughter cell inherits the young centrosome while the other inherits the centrosome from the mother cells (Izumi and Kaneko, 2012). In this way, the asymmetric segregation of structures responsible for maintaining symmetry in sister cells can promote asymmetries of different subcellular components in cells.

AM of different cellular structures occurs in several types of cancer (**Table 1**), which increases the variability in multiple phenotypes. Non-genetic heterogeneity has recently been added as a hallmark of cancers (Hanahan, 2022) and has been associated with the promotion of carcinogenesis and intratumoral variability (Guo et al., 2019). In this context, AM can be considered an important source of intratumoral heterogeneity since it creates favorable conditions for different phenotypes to emerge.

Asymmetric DNA template segregation, for example, is associated with the emergence of more aggressive molecular subtypes of triple-negative breast cancer, increasing migration and invasion, responsible for promoting tumorigenesis (Liu et al., 2013). Cancer populations with greater expression of CD44 on the cell's surface, also had greater asymmetry in DNA segregation, showing a correlation between AM and stem cell phenotype (Liu et al., 2013).

However, asymmetric segregation of extrachromosomal fragments is also directly associated with tumor progression in non-CSCs and the elimination of fragments with amplified oncogenes is able to reduce the tumorigenic potential of the cells (Kanda et al., 1998; Von Hoff et al., 1992).

Table 1. AM of different subcellular components in cancer cells.

CSCs marker	Stress	Asymmetric mitosis of:	Cells	Main Results	Reference
(+)	(+)	CD133 marker in a fraction of GSCs.	Glioma stem cells derived from glioma surgical tissues from patients newly diagnosed (T4302) or recurrent (T4121) glioma.	Under growth factor withdrawal conditions, the proportion of asymmetric CD133 divisions increased.	Lathia et al., 2011
(+)	(+)	EGFR and p75NTR.	Glioblastoma stem cells	EGFR and p75NTR were coenriched in one of the daughter cells and it would benefit the daughter cells to maintain self-renewal capacity.	Hitomi et al., 2021
(+)	(-)	SOX2 and size	OSCC (Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line): CSLC and non-CSLC	Asymmetric distribution of SOX2 in ≈25% of the mitosis analyzed and 40% of this pairs showed size differences.	Kaseb et al., 2016
(+)	(-)	Daughter cells with different sizes and distribution of chromosomes	GBM primary culture and neural stem cell cultures	CD133+ cells divide by budding, producing daughter cells of different sizes and with asymmetries in the distribution of chromosomes.	Jiang et al., 2015
(+)	(-)	DNA template and CD133	Human lung cancer cells (A549 and H441)	Lung cancer cells can asymmetrically divide their template DNA which can be increased by cell-cell contact.	Pine et al., 2010
(+)	(-)	DNA template and CD44	Breast cancer cell lines	It was found a positive correlation between asymmetric segregation of template DNA and the breast cancer basal-like and claudin-low subtypes.	Liu et al., 2013
(+)	(-)	PGCC generated small-sized daughter cells via budding and bursting.	Polyploid giant cancer cells (PGCCs) of HEY and MDA-MB-231	It was observed two asymmetric cell division patterns in PGCCs: budding and bursting, individually or in combination producing cells of different sizes.	Zhang et al., 2014
(+)	(-)	EGFR	Squamous cell carcinoma (A431) and primary basal cell carcinoma	Normal and cancer keratinocyte fate was linked to the asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) during mitosis.	Le Roy et al., 2010
(+)	(-)	microRNA miR-34a	Colon cancer stem cells	miR-34a and Numb were present in the same daughter cells in 82% of the divided pairs acting as stem fate determinants.	Bu et al., 2016
(+)	(-)	SSEA-1, a marker for CSCs in human and mouse brain tumors	Thyroid cancer cell lines (T238)	Asymmetric cell division of SSEA-1 was correlated with CSCs markers and promoted resistance after chemotherapy	Ma et al., 2014
(+)	(-)	MYCN is accumulated at spindle poles during mitosis and recruits Trim32	Human Neuroblastoma Cells	Trim32 Facilitates Degradation of MYCN on Spindle Poles and Induces Asymmetric Cell Division in Human Neuroblastoma Cells	Izumi and Kaneko et al., 2014
(+)	(-)	Asymmetric heritability of centrosomes	Neuroblastoma cells (SH-SY5Y)	Cells with a single copy of MYCN showed significantly higher percentages of ACD than those with MYCN amplification.	Izumi and Kaneko et al., 2012

(+)	(-)	GFAP (intermediate filaments responsible for cytoplasm organization)	GBM primary culture and neural stem cell cultures	GFAP can segregate asymmetrically (at a frequency less than 10% of division) in multipotent GBM and non-tumoral neural cell division.	Guichet et al., 2016
(+)	(-)	NUMB, EGFR, NESTIN, and GFAP	Brain tumor initiating cells (BTIC lines)	It was observed asymmetric cell division of EGFR, NUMB, NESTIN, and GFAP in BTIC lines.	Cusulin et al., 2015
(+)	(-)	miR-34a	Human colon cancer stem cell lines (Colo205, SW480, HT29, SW620, LS174T, DLD1, Caco-2)	Lnc34a promotes CCSC self-renewal, and Lnc34a asymmetry leads to cell fate asymmetry in CCSC division.	Wang et al., 2016
(+)	(-)	CD53, CD62L/L-selectin, CD63/lamp-3, and CD71/transferrin receptor	Hematopoietic stem cells (HSCs) and hematopoietic progenitor cells (HPCs)	It was identified that CD53, CD62L/L-selectin, CD63/lamp-3, and CD71/transferrin receptor can segregate differentially in about 20% of primitive human hematopoietic cells in stroma-free cultures.	Beckmann et al., 2017

The distribution of molecular determinants in mother cells before mitosis also can influence the asymmetric distribution among daughter cells. PKC protein which is associated with the polarity of T cells and cell fate (Gérard et al., 2007; Lin et al., 2009; Ludford-Menting et al., 2005) is asymmetrically distributed in leukemia cells division and can also influence the outcome of non-CSCs (Filby et al., 2011). Similarly, asymmetric distribution of NUMB is classically known as a cell fate determinant in cancer stem cells (O'Brien et al., 2012) and more recently it was demonstrated that NUMB suppression in one of the daughter cells is mediated by miR-34a in intestine and colon cancer (Bu et al., 2016).

The interactions between cancer cells and the microenvironment may explain, at least in part, why cells with non-stem cell phenotypes can acquire stem cell properties and then perform AM. Normally, cells with stem phenotypes maintain their percentage of AM, no greater than 30%, to ensure the maintenance of the stemness of the cell population (Beckmann et al., 2007; Izumi and Kaneko, 2012). However, glioblastoma stem cells are able to increase the percentage of AM when EGF is removed from the culture medium, ensuring tumor heterogeneity and producing cells with high stemness (Lathia et al., 2011). In the same way, the asymmetric segregation of DNA template in lung cancer cells can be increased according to the increase in cell density (Liu et al., 2013), pointing out the influence of cell-to-cell contact on AM induction.

This evidence supports the notion that AM can be modulated by changes in the microenvironment in vitro or under stress conditions which raises the possibility that AM may be a mechanism by which tumor cells adapt and survive

under unfavorable conditions. In this context, changes in the microenvironment favor the generation of heterogeneity in cancer cells. In addition, it is important to consider that the occurrence of AM in tumors is probably underestimated, since cells in 2D culture tend to be more symmetrical after division, when compared to cells in 3D culture (Tse et al., 2012). Taking together, these data suggest that in addition to the loss of physiological AM, which controls the balance between stem and non-stem cells in a population, the increase in pathological AM, responsible for generating phenotypic variability in cancer cells, may eventually favor cell survival under unfavorable conditions.

AM induced by stress in non-CSCs

Tumors can start in cell subpopulations classically known as cancer stem cells (CSCs), which are described as able to repopulate the tumor through their ability to switch their division mode (Knoblich, 2001; Le Roy et al., 2010). However, it is important to consider that AM is not always linked to CSCs state. In this way, we compiled some examples of AM performed by non-CSCs (**Table 2**). Antitumoral therapies can affect the balance between symmetrical and asymmetrical divisions in non-CSCs. Microtubule-inhibiting agents, for instance, are described to generate AM, producing 3 to 4 daughter cells with different sizes (Levrier et al., 2018). After inhibition of the mitotic kinesin Eg5/KIF11, cancer cells increase their rate of microtubule assembly, which was directly associated with a higher rate of AM spindle formation as well as when the rate of microtubule proliferation was reduced, the asymmetry in spindle formation was also decreased (Stolz et al., 2015). Similarly, in multiple myeloma, disturbances in the mitotic spindle by the combination of TP53 knockout and NEK2 overexpression induced asymmetric spindle division *in vitro* and *in vivo* (Feng et al., 2022).

The disruption of the mitotic spindle producing two or more daughter cells usually results in apoptosis by mitotic catastrophe (Levrier et al., 2017). In this way, therapies targeting the mitotic kinesin Eg5 which affect tetraploid cells, induce AM and apoptosis of one or both daughter cells (Rello-Varona et al., 2009). In the same way, the inhibition of spindle assembly checkpoint (SAC) associated proteins, as monopolar spindle 1 (MPS1) promote asymmetric

segregation of chromosomes which were associated with the production of non-viable daughter cells (Jemaà et al., 2013). After treatment with DNA Alkylation Damage, lymphoma cells present centrosome amplification followed by multipolar spindles organization which also results in abnormal mitosis and consequent death of one or more of its daughter cells (Robinson et al., 2007).

Therefore, we can infer that the ability of cancer cells to divide asymmetrically is not exclusive to CSCs. However, the AM carried out by non-CSCs mainly occur after some type of stress (stress +) (**Table 2**). Although the abnormal mitosis induced by the treatment or stress can promote apoptosis in some scenarios (Jemaà et al., 2013; Robinson et al., 2007), it is essential to note that the asymmetric segregation of chromosomes, for instance, can also favor the enrichment of anti-apoptotic genes in one of the daughter cells (Czerniak et al., 1992), promoting the resistance to death eventually

Table 2. AM performed by non-CSCs after stress.

CSCs marker	Stress	Asymmetric mitosis of:	Cells	Main Results	Reference
(-)	(+)	Daughter cells of different sizes	Human cervical carcinoma (HeLa)	Abnormal multi-daughter division induced by increasing the confinement and the substrate stiffness	Tse et al., 2012
(-)	(+)	Abnormal alignment of chromosomes and daughter cells of different sizes.	LNCaP and HeLa cells	Cells have an increase of asymmetric divisions (mostly 3 or 4 daughter cells) after treatment.	Levrier et al., 2018
(-)	(+)	Number of daughter cells	LNCaP, PC-3 (prostate cancer) cells and HeLa	The treatment induced severe defects on mitotic spindle and asymmetric cell divisions, leading to mitotic catastrophe accompanied by cell death through apoptosis.	Levrier et al., 2017
(-)	(-)	Abnormal mitosis (asymmetric spindle division, multipolar division, and nuclear condensation)	HEK293 and H929 cells	The combination of <i>TP53</i> knockout and <i>NEK2</i> overexpression induces asymmetric spindle division in vitro and in vivo.	Feng et al., 2022
(-)	(+)	Asymmetric organization of mitotic spindle after Eg5/KIF11 inhibition	Colorectal cancer cell lines (HCT116)	It was found a robust causal relationship between increased mitotic microtubule polymerization rates and asymmetric monopolar spindle formation.	Stolz et al., 2015
(-)	(+)	DNA content producing tetraploid cells with abnormal karyokinesis and cytokinesis	Human colon carcinoma (HCT116) tetraploid tumor cells	Tetraploid cells divide asymmetrically after a shorter mitotic arrest and both daughter cells finally succumb to apoptosis.	Rello-Varona et al., 2009
(-)	(+)	Asymmetric chromosome distributions	Colorectal cancer cell lines (HCT116)	HCT 116 cells that were cultured in the presence of Mps-BAY1 or Mps-BAY2a exhibited a major disorganization of mitoses and asymmetric chromosome distributions.	Jemaà et al., 2013
(-)	(+)	Centrosome	DT40 B-lymphoma cell line	Multi-polar mitoses are frequently resolved by asymmetric cell divisions causing unequal segregation of genetic material and cell death in one or both daughter products.	Robinson et al., 2007

(-)	(+)	Replication fork speed	U-2OS and HeLa cells	Tpr deficiency results in a highly abnormal function of replication forks under replication stress	Kosar et al., 2021
-----	-----	------------------------	----------------------	--	--------------------

AM can promote fitness heterogeneity in cancer cells

Cancers are characterized by their phenotypic heterogeneity, especially in fitness, which can be an important barrier to therapy (Lenz et al., 2022). Changes in cell fitness mediated by epigenetic modulators can alter the pattern of fractional killing of glioblastoma cells after Temozolomide treatment (Lenz et al., 2021). Asymmetric segregation of oncogenic products associated with cell cycle progression, such as *erbB-2* and *ras* has already been described in cancer cells (Czerniak et al., 1992). In agree, in a recent study, we also observed that phenotypes related to fitness, such as ERK activity, DNA damage and nuclear morphological phenotypes were asymmetric at mitosis or turned asymmetric over the course of the cell cycle (Buss et al., 2023).

It is classically known that yeasts asymmetrically segregate defective proteins during the budding process and the mother cell which retains the defective proteins has a shorter lifespan when compared to the daughter which has inherited young proteins (Higuchi-Sanabria et al., 2014). Cancer cells have the same ability to preserve the proliferative capacity of one of their daughter cells. Pheochromocytoma cells preferentially secrete inclusion bodies, associated with damaged proteins, to one of their daughter cells, which has a longer cell cycle and more stress resistance (Bufalino and van der Kooy, 2014).

Contributing to proliferative variability, 20% of the lung cancer cells can also asymmetrically co-segregate the DNA template and the stem cell marker CD133, directing one daughter cell to a differentiated fate and another to a stem one (Pine et al., 2010). Highly proliferative cells are more affected by most treatments that target the cell cycle, while cells with lower proliferative rates or dormant cells are generally less sensitive to these treatments (Sosa et al., 2015). Polyploid Giant Cancer Cells (PGCCs) are dormant cells found in different tumor types, which under certain conditions are able to divide asymmetrically by budding, generating daughter cells of different sizes in order to favor tumor growth (Zhang et al., 2014). This suggests the potential of PGCCS cells to divide asymmetrically and more than that, the ability of giant cells with greater stemness

to be more likely to escape the dormant state and divide asymmetrically, as classically observed in the process of stem cell division.

Similarly, squamous cell carcinoma (A431) and primary basal cell carcinoma can perform AM of EGRF producing EGFR- and EGFR+ daughter cells, which are associated with phenotypes of stem cells and differentiated cells respectively, pointing to the importance of AM on proliferative fates (Le Roy et al., 2010). In this way, we can infer that AM events can be an important source to promote heterogeneity variability, especially in fitness in cancer cells (**Fig 2**).

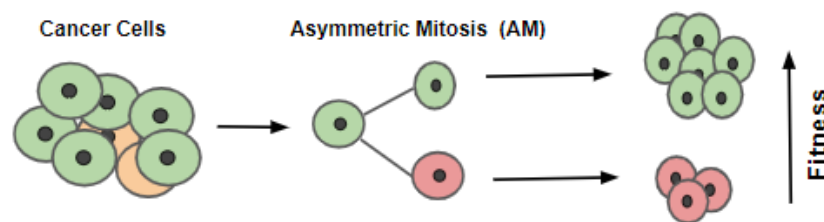


Figura 2. Illustration of AM promoting fitness heterogeneity in cancer cells.

Asymmetric segregation of some subcellular component (eg, EGRF), promotes increased fitness to one of the daughter cells, resulting in fitness variability in sister cells.

Cells with stem phenotype usually tend to be more resistant to therapy than cells with non-stem phenotypes (Clarke et al., 2006). Glioblastomas stem cells can co-segregate growth factor receptor such as EGFR and p75NTR asymmetrically and favor one of the daughter cells to resist treatment with EGFR inhibitors (Hitomi et al., 2021). It raises the question: Can stem cells be more resistant to therapy because they are able to perform AM? An CD133+ subpopulation of PGCCs, for instance, asymmetric division was observed by budding, producing daughter cells of different sizes surrounding the giant mother cell, and asymmetries in the distribution of chromosomes, which was not observed in CD133- subpopulation (Jiang et al., 2015). However, this question remains still not clear.

More importantly than that, some studies have shown that cancer cells, originating from AM, perform new rounds of asymmetric divisions during the generation of their offspring, suggesting that AM can be a heritable phenotype from their mother cells (Levrier et al., 2018; Tse et al., 2012). Similarly, we

recently reported that ERK asymmetry at mitosis produces more offspring with AM, suggesting heritability of the AM phenotype for ERK activity in cancer cells (Buss et al., 2023). In this way, it is also crucial to consider AM heritability of phenotypes and its impact on therapeutic efficiency.

Conclusion and open questions

Taking all evidence together, we can infer that tumorigenesis can be associated with both the loss of physiological AM and the increase in pathological AM, mainly those responsible for increased tumor heterogeneity, specifically in fitness. In addition, we can infer that AM can be a heritable phenotype to daughter cells and drive resistance in CSCs. Nonetheless, it is important to consider that some questions remain unclear. Can stem cells be more resistant to therapy because they are able to perform AM? Are all AM important for generating resistance to therapy performed by CSCs? In this same way, it is important to mention that is delicate to categorize cells by momentary cell states such as the presence or absence of specific markers due to the plasticity of cancer cells. This raises another question How reliable can the classification of stem cells by specific markers be given the plasticity of cancer cells? All these questions remains unclear and need to be more explored.

References

- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J. C. and Giebel, B.** (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* **109**, 5494–5501.
- Beddington, R. S. P. and Robertson, E. J.** (1999). Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. *Cell* **96**, 195–209.
- Betschinger, J. and Knoblich, J. A.** (2004). Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol* **14**, R674-685.
- Black, J. R. M. and McGranahan, N.** (2021). Genetic and non-genetic clonal diversity in cancer evolution. *Nat Rev Cancer* **21**, 379–392.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I.

Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41–64.

Bu, P., Wang, L., Chen, K.-Y., Srinivasan, T., Murthy, P. K. L., Tung, K.-L., Varanko, A. K., Chen, H. J., Ai, Y., King, S., et al. (2016). A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. *Cell Stem Cell* **18**, 189–202.

Bufalino, M. R. and van der Kooy, D. (2014). The aggregation and inheritance of damaged proteins determines cell fate during mitosis. *Cell Cycle* **13**, 1201–1207.

Buss, J. H., Lenz, L. S., Pereira, L. C., Torgo, D., Marcolin, J., Begnini, K. R. and Lenz, G. (2023). The role of mitosis in generating fitness heterogeneity. *Journal of Cell Science* **136**, jcs260103.

Chao, L., Rang, C. U., Proenca, A. M. and Chao, J. U. (2016). Asymmetrical Damage Partitioning in Bacteria: A Model for the Evolution of Stochasticity, Determinism, and Genetic Assimilation. *PLoS Comput Biol* **12**, e1004700.

Cheeks, R. J., Canman, J. C., Gabriel, W. N., Meyer, N., Strome, S. and Goldstein, B. (2004). *C. elegans* PAR Proteins Function by Mobilizing and Stabilizing Asymmetrically Localized Protein Complexes. *Current Biology* **14**, 851–862.

Chen, Q., Shi, J., Tao, Y. and Zernicka-Goetz, M. (2018). Tracing the origin of heterogeneity and symmetry breaking in the early mammalian embryo. *Nat Commun* **9**, 1819.

Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., Visvader, J., Weissman, I. L. and Wahl, G. M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Research* **66**, 9339–9344.

Cooke, J. (2004). Developmental mechanism and evolutionary origin of vertebrate left/right asymmetries. *Biol Rev Camb Philos Soc* **79**, 377–407.

Cusulin, C., Chesnelong, C., Bose, P., Bilenky, M., Kopciuk, K., Chan, J. A., Cairncross, J. G., Jones, S. J., Marra, M. A., Luchman, H. A., et al. (2015). Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes. *Stem Cell Reports* **5**, 1–9.

Czerniak, B., Herz, F., Wersto, R. P. and Koss, L. G. (1992). Asymmetric distribution of oncogene products at mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4860–4863.

Duan, X. and Sun, S.-C. (2019). Actin cytoskeleton dynamics in mammalian oocyte meiosis. *Biol Reprod* **100**, 15–24.

Feng, X., Guo, J., An, G., Wu, Y., Liu, Z., Meng, B., He, N., Zhao, X., Chen, S., Zhu, Y., et al. (2022). Genetic Aberrations and Interaction of NEK2 and

TP53 Accelerate Aggressiveness of Multiple Myeloma. *Advanced Science* **9**, 2104491.

Filby, A., Perucha, E., Summers, H., Rees, P., Chana, P., Heck, S., Lord, G. M. and Davies, D. (2011). An imaging flow cytometric method for measuring cell division history and molecular symmetry during mitosis. *Cytometry A* **79**, 496–506.

Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett* **230**, 6–19.

Gérard, A., Mertens, A. E. E., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G. (2007). The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J Cell Biol* **176**, 863–875.

Gisselsson, D. (2005). Mitotic instability in cancer: is there method in the madness? *Cell Cycle* **4**, 1007–1010.

Guichet, P.-O., Guelfi, S., Ripoll, C., Teigell, M., Sabourin, J.-C., Bauchet, L., Rigau, V., Rothhut, B. and Hugnot, J.-P. (2016). Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. *PLoS One* **11**, e0151274.

Guo, M., Peng, Y., Gao, A., Du, C. and Herman, J. G. (2019). Epigenetic heterogeneity in cancer. *Biomark Res* **7**, 23.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.

Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674.

Higuchi-Sanabria, R., Pernice, W. M. A., Vevea, J. D., Alessi Wolken, D. M., Boldogh, I. R. and Pon, L. A. (2014). Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **14**, 1133–1146.

Hitomi, M., Chumakova, A. P., Silver, D. J., Knudsen, A. M., Pontius, W. D., Murphy, S., Anand, N., Kristensen, B. W. and Lathia, J. D. (2021). Asymmetric cell division promotes therapeutic resistance in glioblastoma stem cells. *JCI Insight* **6**, 130510.

Izumi, H. and Kaneko, Y. (2012). Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 18048–18053.

Izumi, H. and Kaneko, Y. (2014). Trim32 facilitates degradation of MYCN on spindle poles and induces asymmetric cell division in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **74**, 5620–5630.

Jemaà, M., Galluzzi, L., Kepp, O., Senovilla, L., Brands, M., Boemer, U., Koppitz, M., Lienau, P., Prechtel, S., Schulze, V., et al. (2013).

Characterization of novel MPS1 inhibitors with preclinical anticancer activity. *Cell Death Differ* **20**, 1532–1545.

Jiang, Q., Zhang, Q., Wang, S., Xie, S., Fang, W., Liu, Z., Liu, J. and Yao, K. (2015). A Fraction of CD133+ CNE2 Cells Is Made of Giant Cancer Cells with Morphological Evidence of Asymmetric Mitosis. *J Cancer* **6**, 1236–1244.

Jordan, M. A. and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* **4**, 253–265.

Kanda, T., Sullivan, K. F. and Wahl, G. M. (1998). Histone–GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Current Biology* **8**, 377–385.

Kaseb, H. O., Lewis, D. W., Saunders, W. S. and Gollin, S. M. (2016). Cell division patterns and chromosomal segregation defects in oral cancer stem cells. *Genes Chromosomes Cancer* **55**, 694–709.

Knoblich, J. A. (2001). Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 11–20.

Kosar, M., Giannattasio, M., Piccini, D., Maya-Mendoza, A., García-Benítez, F., Bartkova, J., Barroso, S. I., Gaillard, H., Martini, E., Restuccia, U., et al. (2021). The human nucleoporin Tpr protects cells from RNA-mediated replication stress. *Nat Commun* **12**, 3937.

Lathia, J. D., Hitomi, M., Gallagher, J., Gadani, S. P., Adkins, J., Vasanji, A., Liu, L., Eyler, C. E., Heddleston, J. M., Wu, Q., et al. (2011). Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis* **2**, e200.

Le Roy, H., Zuliani, T., Wolowczuk, I., Faivre, N., Jouy, N., Masselot, B., Kerkaert, J.-P., Formstecher, P. and Polakowska, R. (2010). Asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor directs the fate of normal and cancer keratinocytes in vitro. *Stem Cells Dev* **19**, 209–220.

Lenz, L. S., Faccioni, J. L., Bracco, P. A., Santos, J. A. F., Pereira, L. C., Buss, J. H., Tamborindéguy, M. T., Torgo, D., Monteiro, T., Mantovani, G. B., et al. (2021). Cancer Cell Fitness Is Dynamic. *Cancer Research* **81**, 1040–1051.

Lenz, G., Onzi, G. R., Lenz, L. S., Buss, J. H., dos Santos, J. A. and Begnini, K. R. (2022). The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer. *Cancer Research* **82**, 3–11.

Leonard, A. C. and Grimwade, J. E. (2009). Chromosome Replication and Segregation. In *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (ed. Schaechter, M.), pp. 493–506. Oxford: Academic Press.

Lerit, D. A., Smyth, J. T. and Rusan, N. M. (2013). Organelle asymmetry for proper fitness, function, and fate. *Chromosome Res* **21**, 271–286.

- Levrier, C., Sadowski, M. C., Rockstroh, A., Gabrielli, B., Kavallaris, M., Lehman, M., Davis, R. A. and Nelson, C. C.** (2017). 6 α -Acetoxyanopterin: A Novel Structure Class of Mitotic Inhibitor Disrupting Microtubule Dynamics in Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* **16**, 3–15.
- Levrier, C., Rockstroh, A., Gabrielli, B., Kavallaris, M., Lehman, M., Davis, R. A., Sadowski, M. C. and Nelson, C. C.** (2018). Discovery of thalictuberine as a novel antimitotic agent from nature that disrupts microtubule dynamics and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Cycle* **17**, 652–668.
- Lin, J., Hou, K. K., Piwnica-Worms, H. and Shaw, A. S.** (2009). The polarity protein Par1b/EMK/MARK2 regulates T cell receptor-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol* **183**, 1215–1221.
- Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J. and Taddei, F.** (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3076–3081.
- Liu, W., Jeganathan, G., Amiri, S., Morgan, K. M., Ryan, B. M. and Pine, S. R.** (2013). Asymmetric segregation of template DNA strands in basal-like human breast cancer cell lines. *Mol Cancer* **12**, 139.
- Ludford-Menting, M. J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E. T.-Y., Pedersen, N., Thomas, S. J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L. E., Waterhouse, N. J., et al.** (2005). A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* **22**, 737–748.
- Ma, R., Minsky, N., Morshed, S. A. and Davies, T. F.** (2014). Stemness in human thyroid cancers and derived cell lines: the role of asymmetrically dividing cancer stem cells resistant to chemotherapy. *J Clin Endocrinol Metab* **99**, E400–409.
- Mannino, G., Russo, C., Maugeri, G., Musumeci, G., Vicario, N., Tibullo, D., Giuffrida, R., Parenti, R. and Lo Furno, D.** (2022). Adult stem cell niches for tissue homeostasis. *J Cell Physiol* **237**, 239–257.
- O'Brien, C. A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K. G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S. and Dick, J. E.** (2012). ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. *Cancer Cell* **21**, 777–792.
- Pajpach, F., Shearwin-Whyatt, L. and Grützner, F.** (2021). Evolution, Expression and Meiotic Behavior of Genes Involved in Chromosome Segregation of Monotremes. *Genes (Basel)* **12**, 1320.
- Pine, S. R., Ryan, B. M., Varticovski, L., Robles, A. I. and Harris, C. C.** (2010). Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2195–2200.

- Rello-Varona, S., Vitale, I., Kepp, O., Senovilla, L., Jemaá, M., Métivier, D., Castedo, M. and Kroemer, G.** (2009). Preferential killing of tetraploid tumor cells by targeting the mitotic kinesin Eg5. *Cell Cycle* **8**, 1030–1035.
- Robinson, H. M. R., Black, E. J., Brown, R. and Gillespie, D. A. F.** (2007). DNA mismatch repair and Chk1-dependent centrosome amplification in response to DNA alkylation damage. *Cell Cycle* **6**, 982–992.
- Sansregret, L. and Swanton, C.** (2017). The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, a028373.
- Simons, B. D. and Clevers, H.** (2011). Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues. *Cell* **145**, 851–862.
- Sosa, M. S., Parikh, F., Maia, A. G., Estrada, Y., Bosch, A., Bragado, P., Ekpin, E., George, A., Zheng, Y., Lam, H.-M., et al.** (2015). NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. *Nat Commun* **6**, 6170.
- Stolz, A., Ertych, N. and Bastians, H.** (2015). A phenotypic screen identifies microtubule plus end assembly regulators that can function in mitotic spindle orientation. *Cell Cycle* **14**, 827–837.
- Terskikh, V. V., Vorotelyak, Y. A. and Vasiliev, A. V.** (2009). Self-Renewal of Stem Cells. *Acta Naturae* **1**, 61–65.
- Tse, H. T. K., Weaver, W. M. and Carlo, D. D.** (2012). Increased Asymmetric and Multi-Daughter Cell Division in Mechanically Confined Microenvironments. *PLOS ONE* **7**, e38986.
- Von Hoff, D. D., McGill, J. R., Forseth, B. J., Davidson, K. K., Bradley, T. P., Van Devanter, D. R. and Wahl, G. M.** (1992). Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8165–8169.
- Wang, L., Bu, P., Ai, Y., Srinivasan, T., Chen, H. J., Xiang, K., Lipkin, S. M. and Shen, X.** (2016). A long non-coding RNA targets microRNA miR-34a to regulate colon cancer stem cell asymmetric division. *Elife* **5**, e14620.
- Zhang, S., Mercado-Uribe, I., Xing, Z., Sun, B., Kuang, J. and Liu, J.** (2014). Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene* **33**, 116–128.

CAPÍTULO II

APRESENTAÇÃO

Sabendo que a heterogeneidade intratumoral é um fator que favorece o surgimento de fenótipos tolerantes a tratamentos, o entendimento de como essas variabilidades são produzidas torna-se de extrema importância no contexto terapêutico. A *AM* desempenha importante papel para a geração de variabilidades em populações celulares. O *fitness* é considerado o fenótipo mais importante para a biologia tumoral, sendo associado a capacidade da célula de sobreviver e produzir descendentes. Portanto, o manuscrito “***The role of mitosis in generating fitness heterogeneity***” publicado no periódico “*Journal of Cell Science*”, sugere a importância da *AM* e do tempo na geração de variabilidade de *fitness* em células irmãs.

Neste trabalho, nós mostramos que células irmãs apresentam variabilidades de *fitness* entre si, através da avaliação de *AMs* de fenótipos que afetam a aptidão das células, como por exemplo, a atividade de ERK. Além disso, mostramos que a variabilidade de ERK, observada em células irmãs, é principalmente adquirida conforme a célula progride no ciclo celular, sendo mais pronunciada nas últimas horas que antecedem a seguinte mitose. Neste trabalho, também mostramos que a atividade de ERK da célula mãe, nas últimas 5 horas que antecedem a mitose, é capaz de influenciar a média de tempo intermitótico (*Intermitotic time - IMT*) das células filhas, sendo responsável também por produzir variabilidades de *IMT* em células filhas.

Os experimentos e análises realizadas neste trabalho, foram executadas principalmente por mim, com o apoio do orientador Guido Lenz e da co-orientadora Karine Beghini. É importante mencionar que as co-autoras deste trabalho tiveram participação tanto na produção de linhagens celulares, quanto no desenvolvimento do programa de computador, que permitiu a análise automatizada da atividade de ERK em células únicas. Além disso, os dados de Ki67, foram executados pela co-autora Daphne, durante seu período de mestrado, sob supervisão da pós-doutoranda Luana Lenz.

RESEARCH ARTICLE

The role of mitosis in generating fitness heterogeneity

Julieti Huch Buss^{1,2}, Luana Suéling Lenz^{1,2}, Luiza Cherobini Pereira^{1,2}, Daphne Torgo^{1,2}, Júlia Marcolin^{1,2}, Karine Rech Begnini^{1,2,*} and Guido Lenz^{1,2,*}

ABSTRACT

Cancer cells have heterogeneous fitness, and this heterogeneity stems from genetic and epigenetic sources. Here, we sought to assess the contribution of asymmetric mitosis (AM) and time on the variability of fitness in sister cells. Around one quarter of sisters had differences in fitness, assessed as the intermitotic time (IMT), from 330 to 510 min. Phenotypes related to fitness, such as ERK activity (herein referring to ERK1 and ERK2, also known as MAPK3 and MAPK1, respectively), DNA damage and nuclear morphological phenotypes were also asymmetric at mitosis or turned asymmetric over the course of the cell cycle. The ERK activity of mother cell was found to influence the ERK activity and the IMT of the daughter cells, and cells with ERK asymmetry at mitosis produced more offspring with AMs, suggesting heritability of the AM phenotype for ERK activity. Our findings demonstrate how variabilities in sister cells can be generated, contributing to the phenotype heterogeneities in tumor cells.

KEY WORDS: Asymmetric mitosis, Sister cells, ERK activity, Heritability, Fitness, Mother cell

INTRODUCTION

Non-genetic heterogeneity in a population of tumor cells is key to explaining several aspects of cancer biology and specially the ineffectiveness of cancer treatments (Wilting and Dannenberg, 2012). Genetically identical cells present individual variability in gene expression profiles and drug metabolism, promoting the generation of a momentary state of tolerance to treatment, which contributes to the survival and eventual stable resistance of that cell or its descendants (Brock et al., 2009; Ramirez et al., 2016). Instability and stochasticity during the production of cellular substrates in individual cells favor the emergence of genetic alterations producing phenotypes that confer resistance to therapy (Marusyk et al., 2020). Single-cell studies provide evidence that single cells are highly variable at different levels, from transcription and signaling of a single protein to the general state of the cell (phenotype) (Batchelor et al., 2009, 2011; Lahav et al., 2004; Lenz et al., 2021). The contribution of genetic and all the other non-genetic processes to the generation of heterogeneity are still far from clear, but the importance of the non-genetic processes are relevant (Gookin et al., 2017; Granada et al., 2020; Lawson et al., 2018; Lenz et al., 2022).

Asymmetric mitosis (AM) is a classic event that contributes to cellular heterogeneity given that it produces two daughter cells with different characteristics (Venkei and Yamashita, 2018). After undergoing an AM, daughter cells might present a difference in terms of fitness, both in prokaryotes and eukaryotes (Higuchi-Sanabria et al., 2014; Lindner et al., 2008). Through AM, glioblastoma stem cells segregate more p75NTR (also known as NGFR) and EGFR to one of the sister cells promoting resistance to therapy with EGFR inhibitors (Hitomi et al., 2021; Lathia et al., 2011). Although AM is a well described feature of cancer stem cells (CSCs), it can also occur in non-CSCs, and thus is not exclusive of this cell state (Kaseb et al., 2016). The ERK (herein referring to ERK1 and ERK2, also known as MAPK3 and MAPK1, respectively) pathway is classically known to regulate cell proliferation and survival, integrating different signal sources with multiple functions (Jacques-Silva et al., 2004; Lenz et al., 2000). Technologies that allow the monitoring of ERK activity in live cells (Kudo et al., 2018; Pargett et al., 2017; Regot et al., 2014), have shown that ERK activity is highly dynamic (Chavez-Abiega et al., 2022; Ryu et al., 2016) and influences cell outcome (De et al., 2020). We have previously shown that fitness is highly dynamic in cancer cells and two to four generations are enough to produce the ERK variability in a colony of cells found among randomly grouped cells in the population (Lenz et al., 2021).

In this work, we assessed the fitness difference in sister cells and determined how much of it is acquired through AM or develops over the progression of the cell cycle, focusing on measuring ERK signaling activity, which is linked to fitness. Furthermore, knowing that the phenotype of daughter cells can be affected by the phenotypic status of the mother cell (Lenz et al., 2021; Min et al., 2020), we also questioned whether mother cell ERK activity can influence the behavior of daughter cells.


RESULTS

Asymmetric mitosis contributes to fitness heterogeneity in cancer

Cell fitness can be considered the most important phenotype in cancer biology, as cancer is a disease of excess cell fitness (Dey-Guha et al., 2015; Lenz et al., 2021; Silva et al., 2016). Therefore, we evaluated whether mitosis is able to generate fitness heterogeneity. For this we measured the difference (Δ) in intermitotic time (IMT) in pairs of sister cells after mitosis. If values of the Δ distribution rejected normality after a normal Shapiro–Wilk distribution test, they were considered asymmetric. In this case, sister cells with Δ values above the third quartile ($>Q3$) were considered asymmetric (Fig. 1A). Confirming the fitness variability among sister cells, a bimodal distribution was observed for IMT in sister cells (Fig. 1B). Whereas the symmetric sisters had a Δ IMT range from 0 to 270 min, the asymmetric sisters had a Δ IMT from 330 to 510 min, confirming that different fitness occurs in a proportion of sister cells. However, the difference observed in sister cells is still smaller than the difference observed in randomly

¹Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 91509-900, Brazil. ²Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 91509-900, Brazil.

*Authors for correspondence (lenz@ufrgs.br; karine.begnini@ufrgs.br)

 J.H.B., 0000-0001-8729-2947; L.S.L., 0000-0001-6346-4265; J.M., 0000-0002-4409-1405; K.R.B., 0000-0002-1099-3304

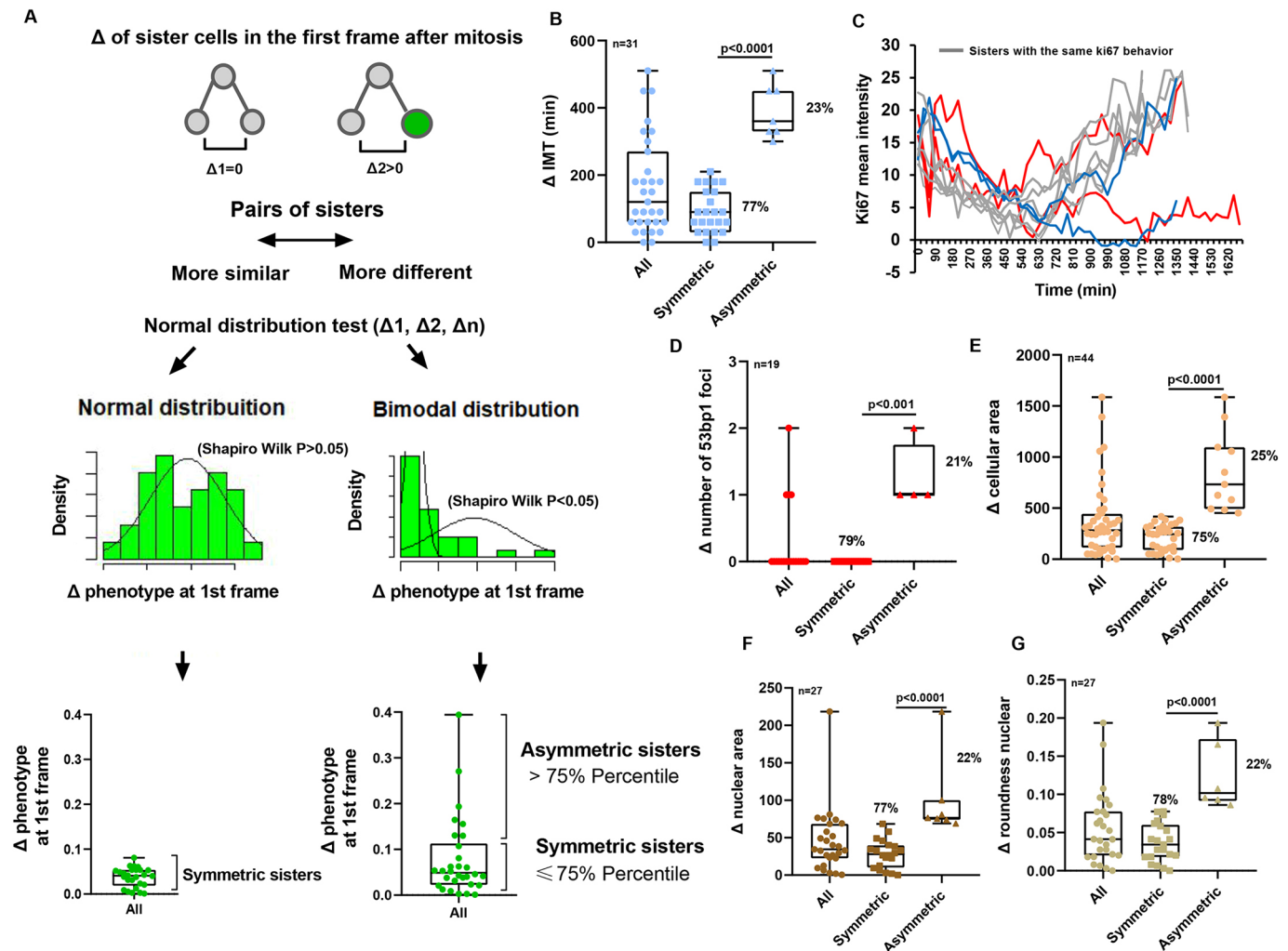


Fig. 1. Variability of sister cells after mitosis. (A) Distribution analysis performed for each difference (Δ) between pairs of sister cells after mitosis for a given phenotype. Phenotypes that rejected normality (Shapiro–Wilk $P<0.05$) were separated in quartiles and the pairs above the third quartile (Q3) were considered asymmetric. An unpaired two-tailed Mann–Whitney test was performed to confirm the separation of asymmetric sister cells from symmetric sister cells. (B) Δ IMT in minutes in sister after mitosis of A172^{ERK-53BP1} glioma cells. (C) Mean fluorescence intensity obtained through measuring the expression of YFP integrated in the endogenous locus of the Ki-67 gene in U251 cells over time. Sisters with the same Ki67 behavior are painted with the same gray color. Δ number of 53BP1 foci (D) Δ cell area (E), Δ nuclear area (F) and nuclear roundness (G). For box plots, the box represents the 25–75th percentiles, and the median is indicated. The whiskers show the range ($n=31$ pairs of sister cells). P -values shown on B, D–G were calculated with a Mann–Whitney test.

paired cells from the same set of cells (non-sister) (Fig. S1A). A similar separation of the cells considered asymmetric was obtained with the threshold of one standard deviation above the mean (Fig. S1B). Tracking the expression of endogenous Ki-67 (also known as MKI67) through YFP tagging indicated that two out of five sister pairs had different progression through the cell cycle (Fig. 1C).

Cell phenotypes linked to fitness, such as number of 53BP1 (also known as TP53BP1) foci, an indicator of hyper-replication and DNA double-strand breaks (DSBs) (Mirman and de Lange, 2020) were also asymmetric (Fig. 1D). Morphological phenotypes, such as cell area, nuclear morphometrical parameters (area, roundness and perimeter) also showed a bimodal distribution (Fig. 1E–G; Fig. S1C). However, not all morphometric parameters showed high variability in sister cells after mitosis, as the nuclear irregularity index (NII) (Filippi-Chiela et al., 2012), aspect, extent and radius ratio had a normal distribution according to the normality test (Fig. S1D). In addition, it is important to mention that only one pair of sisters was asymmetric for all the measured features, indicating

that asymmetry is not a phenomenon applied to all phenotypes (Fig. S1E).

Mitotic and temporal variability of ERK activity in sister cells

Given that IMT is a phenotype that can only be assessed at the completion of the cell cycle, we opted to focus our attention on the ERK signaling status, as this signaling pathway is linked to cell fitness and shows significant variability in isogenic cells (Filippi et al., 2016). ERK activity was measured in live cells through the use of a kinase translocation reporter (KTR) (Kudo et al., 2018; Regot et al., 2014). ERK activity in the last 5 h before mitosis correlated negatively with the mean IMT of the daughter cells (Pearson $r: -0.5074$, $P<0.05$) (Fig. 2A), whereas the ERK activity just after mitosis did not correlate with the IMT of the cell itself (Fig. 2B), indicating that the ERK activity of the mother cell is a predictor of the average daughter cell fitness and confirming the importance of the activity of this pathway in the mother cells for the decisions of the daughter cells in the next cell cycle (Min et al., 2020; Stern et al., 2021 preprint). Sister cells underwent AM for ERK activity,

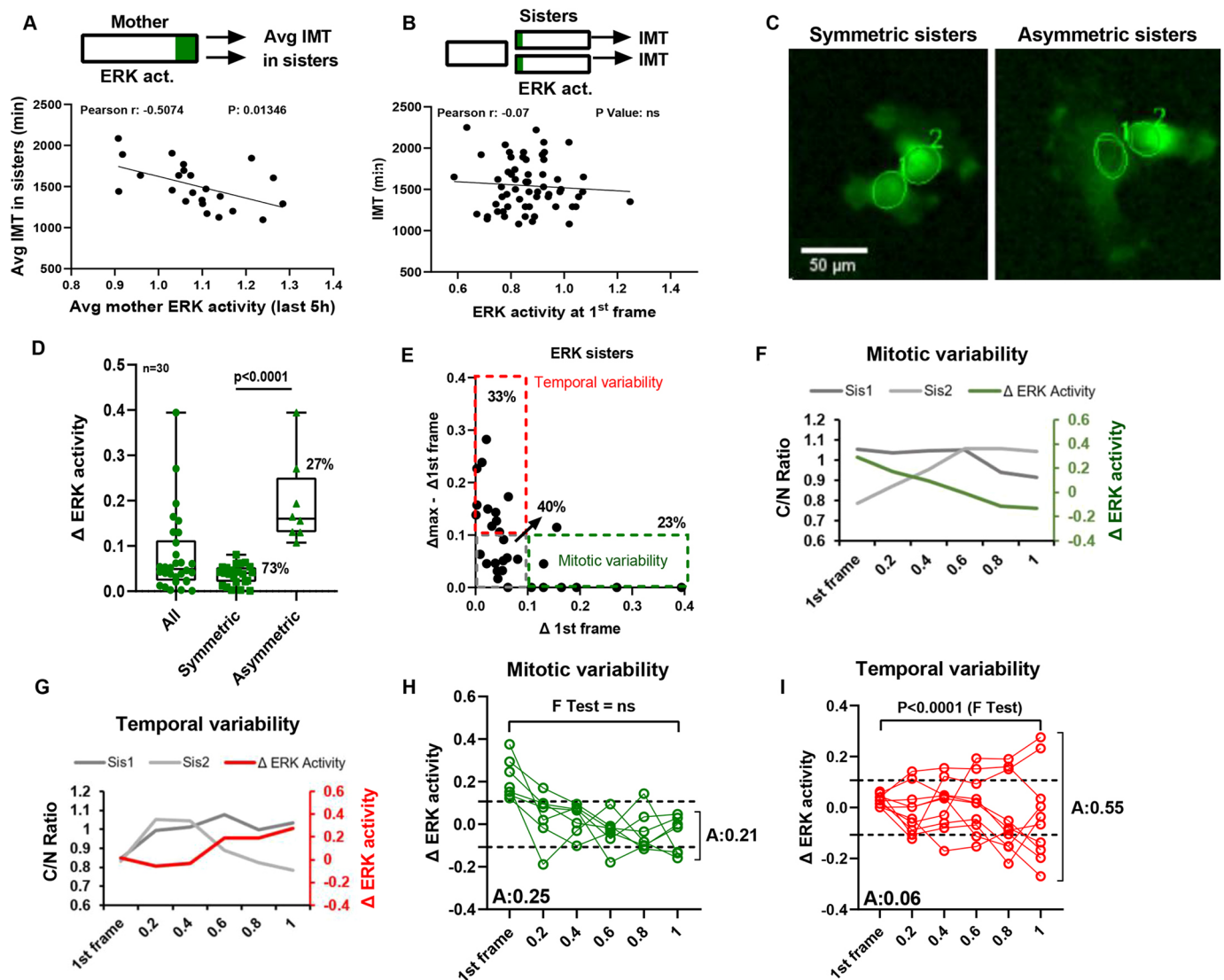


Fig. 2. Contribution of mitosis and time on ERK variability in sister cells. (A) ERK activity of the mother cell in the last 5 h (green in the diagram at the top) correlates negatively with the average IMT of the daughter cells. (B) ERK activity just after mitosis (green in the diagram at the top) does not correlate with the IMT of the cell. (C) Example of symmetric (left) and asymmetric (right) sisters for ERK activity. (D) Each point on the graph represents the difference (Δ) of the C/N ratio in sister cells pairs right after mitosis (sister with the highest C/N ratio–sister with the lowest C/N ratio). Asymmetric sisters were considered pairs of sisters that had differences (Δ ERK activity) above the third quartile (Q3). An unpaired two-tailed Mann–Whitney test was performed to confirm the separation of asymmetric sister cells from symmetric sister cells. For box plots, the box represents the 25–75th percentiles, and the median is indicated. The whiskers show the range ($n=31$ sister cell pairs). (E) Contribution of mitosis and time to the generation of ERK variability in sister cells. (F,G) The cell cycle was aligned from cell birth (0) to cell division (1). (F) Shows one pair of sisters that underwent AM, thus having high variability of ERK activity (Δ ERK activity) in the first frame (1st frame) after mitosis. (G) Shows one pair of sisters that underwent symmetric mitosis but showed variability over time, representing sisters with temporal variability. (H,I) Δ ERK activity was calculated for sister cells that had more mitotic variability (green) (H) and for sisters that had more temporal variability (red) (I). The amplitude (A) in the graphs was obtained by determining the maximum – minimum Δ value of sisters observed in the first frame after mitosis and in the last cell cycle block.

showing a bimodal distribution for Δ values (Fig. 2C,D). The degree of asymmetry in the sister cells was similar to the asymmetry observed in a non-tumoral cell line, suggesting that having ERK asymmetries is not cancer cell specific (Fig. S2A). The degree of difference in ERK activity was similar in asymmetric sister cells and asymmetric non-sister cells in both cell lines (Fig. S2B). However, sisters asymmetric for ERK activity are not necessarily asymmetric for IMT (Fig. S2C).

Given our focus is on ERK activity of the last 5 h of the cell cycle, we asked whether the differences in ERK activity at the end of the cell cycle is due to asymmetry produced by mitosis or was produced

over the progression through the cell cycle. Thus, we imaged cells every 30 min along the whole cell cycle of the two sister cells and observed 23% of sisters had a maximum difference (Δ_{\max}) right after mitosis (mitotic variability), whereas 33% attained the Δ_{\max} over the course of the cell cycle (temporal variability) (Fig. 2E, see Movies 1 and 2); 40% of sisters never attained ERK asymmetric status over one cell cycle. We also analyzed the nuclear area of sisters after mitosis and the variability was almost exclusively temporal, as expected due to the increase in nuclear area with the progression of the cell cycle (Fig. S2D) (Filippi-Chiela et al., 2012). The difference in ERK activity observed in sister cells right after

mitosis is still smaller than the difference observed in non-sister cells (Fig. S2E). However, sister cells become more different from each other as they move through the cell cycle, turning them as different as non-sister cells (Fig. S2F), confirming the role of time in generating differences in the ERK activity status of sister cells.

To better understand the behavior of sisters that underwent AM on ERK activity status along the cell cycle, we separated pairs of cells into two groups: pairs with large mitotic variability (Fig. 2F,H) and pairs with large temporal variability (Fig. 2G,I). The Δ ERK activity throughout the cell cycle was obtained by defining sister 1 as the cell with higher ERK activity and sister 2 as the cell with lower ERK activity at the first frame and maintaining the order Δ Sis1-Sis2 for the whole cell cycle. We found that pairs of sister cells with large mitotic differences reduced their Δ ERK during the cell cycle (Fig. 2H). We also observed that around 60% of sisters with symmetric mitosis developed differences over the course of the cell cycle (Fig. 2I) eventually having higher differences at the end of the cell cycle when compared to sister cells with AM, showing amplitude of 0.55 and 0.21, respectively (Fig. 2I; Fig. S2E,F). It is important to mention that the mean ERK activity of asymmetric sister cell pairs is equal to the average ERK activity of symmetric sister cell pairs over the cycle (Fig. S2G), indicating that symmetry is not due to very low or very high ERK activity. Finally, it is important to add that the differences found in pairs of sister cells does not correlate with the average ERK activity (Fig. S2H). Taken together, these data confirm the importance of time in increasing ERK heterogeneity in a subpopulation of sister cells, especially in producing large differences in ERK activity prior to mitosis.

Temporal variability influences the fitness of sister cells

Considering the existence of temporal variability in terms of ERK activity, next we asked whether mitotic variability also could generate asymmetrical sister cells for ERK activity in the next generation. We found that sister cells initially asymmetric for ERK activity had an ~69% (9 of 13) AM in their next generation (Fig. 3A), whereas sister cell pairs initially symmetric for ERK activity had only 21% (6 of 28) AM (Fig. 3B). In addition, mitosis performed by initially asymmetrical sister cell pairs had a mean value of Δ ERK activity after mitosis above the third quartile ($Q_3=0.1071$, threshold defined for asymmetric sisters), when compared to mitoses performed by pairs of initially symmetrical sister cells (Fig. 3C). Sister cells that had an AM for ERK activity did not appear to produce the greater inter-sister variability (Fig. S3A), just as the mean IMT of sisters who inherited higher ERK activity was similar to the mean IMT of sisters who inherited lower ERK activity (Fig. S3B). Moreover, the variability acquired throughout the cell cycle did not produce AM in the next generation (Fig. 3D). These data show that AM, in terms of ERK activity, is partially heritable whereas temporal variability does not generate heritability. In addition, we observed that the greater the difference in ERK activity peaks in sister cell pairs, the greater the difference in IMT between sisters (Fig. S3C), suggesting that the IMT variability found in sister cells can also be explained, at least in part, by the variability of ERK activity throughout the cycle.

Influence of the mother cell on the fitness of daughter cells

Heritability of phenotypes, including asymmetries, is key for understanding the generation of heterogeneity in cancer cells (Lenz et al., 2022). We found that sister cells are more similar to each other than to the mother cell regarding ERK activity (Fig. 3E). However, maximum ERK activity of the mother cell in the last 5 h before mitosis correlated with the average ERK activity in daughter

cell pairs (Pearson r : 0.43, $P<0.05$) (Fig. 3F), which is in line with the impact of ERK activity at the end of mitosis on IMT (Fig. 2A). If the ERK activity of the whole cell cycle of the mother is considered, the correlation with the daughter IMTs does not reach statistical significance (Fig. S3D), reinforcing the importance of the last hours of the cell cycle of the mother for the IMT of the daughters. As observed for ERK activity, sister cells were much more similar to each other, in terms of IMT, than to their mother cells, showing sister symmetry (SisSymmetry) values that ranged from 0.59 to 0.99, whereas IMT conservation (IMTCon) values ranged from 0.68 to 6.7 (Fig. 3G). As expected, cells with lower IMT than their mother (IMTCon <1) progressed more homogeneously through the cell cycle than those with IMTCon >1 , as one or two of the sister cells in this case did not progress directly through the G1 phase (Fig. 3G). Corroborating this, there was no correlation between the IMT of the mother cell and the average IMT of sister cell pairs (Fig. S3E). On the other hand, as expected, there was a correlation of IMT between pairs of sister cells (Spearman r : 0.8, $P<0.01$) (Fig. S3F). In addition, cousin cells also showed correlation to IMT values (Fig. S3G), supporting the cousin–mother inequality hypothesis (Chakrabarti et al., 2018). Taken together, these data suggest that the IMT of mother cells is not heritable and does not predict the symmetry of IMT in sister cells. However, the IMT in sister cells can be affected both by the ERK activity of the mother cell (Fig. 2A), and by the temporal variability of ERK among sister cells (Fig. S3C).

In order to confirm that the ERK activity of the mother cell in the last block of the cell cycle (more precisely the last 5 h before division) influences the IMT of the daughter cells, mother cells were treated with the MEK inhibitor trametinib (MEKi) during the last block of the cell cycle and the IMT of daughter cells was evaluated. MEKi reduced the average ERK activity (Fig. 3H) and this inhibition in the mother cell resulted in daughter cells with a higher average IMT when compared to untreated cells (Fig. 3I). Furthermore, after ERK inhibition in mother cells, daughter cells showed a greater difference in IMT among themselves (Fig. 3J), suggesting that a high ERK activity of mother cells normally led to reduced differences in IMT in the daughter cells.

DISCUSSION

Non-genetic heterogeneity has been considered an important event for drug resistance in cancer (Bell and Gilan, 2020) and AM is part of the mechanism that produces this heterogeneity (Berge et al., 2019; Inaba and Yamashita, 2012). Phenotype variability and plasticity favor the emergence of phenotypic states that are resistant to treatments, resulting in its ineffectiveness (Pisco et al., 2013). Sister cells presented differences in IMT and in endogenous Ki-67 levels over the progression of the cell cycle. Ki-67 variability is associated with cell cycle regulation, and low levels of Ki-67 indicates G0 entry (Sobecki et al., 2017). This suggests that the larger differences in IMT of the sister cells is due to the entry of one sister in G0, whereas the other sister progresses through G1 without arrest.

In glioblastoma cells, the increase in EGFR and neurotrophin receptor (p75NTR) in one of the daughter cells through AM results in resistance to inhibition of growth factor receptors (Hitomi et al., 2021). In this work, we show that cells can undergo AM and produce asymmetric daughter cells for fitness and for phenotypes related to fitness, such as ERK activity and DNA damage. Proliferative heterogeneity has been described in sister cells and can be driven by AKT, producing AKT^{low} and AKT^{normal} daughter cells (Dey-Guha et al., 2011, 2015). Thus, we add that AM contributes to fitness heterogeneity in glioblastoma sister cells but does not seem to be a master regulator of asymmetry for the

Asymmetrics 2nd generation

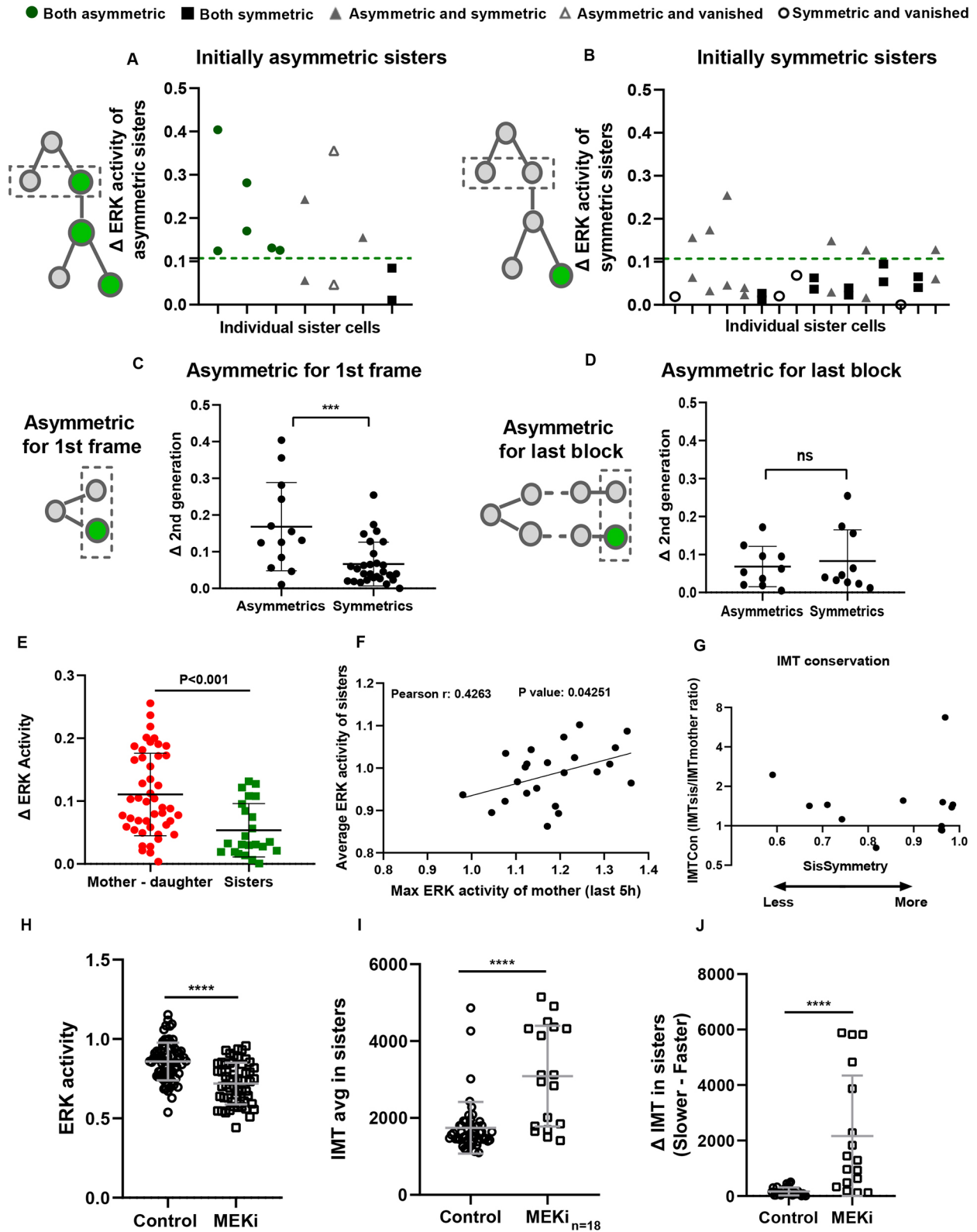


Fig. 3. See next page for legend.

analyzed phenotypes. We also added that AM can be heritable to the next generation, ensuring ERK heterogeneity in subsequent generations.

Additionally, we found that the difference in ERK activity observed in sister cells from normal and cancer cell lines, after mitosis, is still smaller than the difference observed in non-sister

Fig. 3. Heritability and variability of ERK on fitness of sister cells.

(A,B) Each point on the graphs represents the difference (Δ) of ERK activity for each daughter generated from initially asymmetric (A) or symmetric (B) mothers for ERK activity. The dashed line represents the threshold defined for asymmetric sisters ($Q3=0.1071$). (C) Δ 2nd generation obtained by determining the value of maximum delta–minimum delta of (Δ) of ERK activity for each daughter generated from initially asymmetric. (D) Δ 2nd generation obtained by determining the value of maximum delta–minimum delta of (Δ) of ERK activity for each daughter generated from sisters with temporal asymmetry for ERK activity. (E) Δ ERK activity, in absolute values, of the mother and each daughter cell compared to Δ ERK activity observed in pairs of sister cells. (F) ERK activity average in pairs of sisters compared to the maximum ERK activity from mother cell in the last 5 h before mitosis. (G) IMT Conservation (IMTCon) and similarity of IMT (SisSymmetry) in sister cells. (H) ERK activity of cells treated or not with MEKi (trametinib) at 20 nM. (I,J) Average IMT in daughter cells (I) and the difference (Δ) of IMT (slower-faster) of daughter cells (J) that had mother cells treated or not with MEKi in the last block of the cell cycle. The data is expressed as mean \pm s.d. *P*-values shown in C–F, H–J were calculated with an unpaired two-tailed *t*-test (** $P\leq 0.001$; *** $P\leq 0.0001$; ns, not significant).

cells, suggesting that, although mitosis contributes to the generation of differences in sister cells, some information is transmitted from the mother cell to the daughter cells. It has already been demonstrated that sister cells show high correlation in terms of mean transcriptional activity, which is inherited from mother cells to daughter cell (Phillips et al., 2019). However, we observe that the average ERK activity of the mother cells is not inherited by their daughter cells. Notwithstanding, the maximum ERK activity in the mother cell in the last 5 h before mitosis was correlated with the average ERK activity in daughter cell pairs and the fitness of the daughter cells. This agrees with the time frame of during which MEK inhibition in the mother cell cycle can affect the percentage of proliferative daughter cells (CDK2^{inc}) found previously (Min et al., 2020). Surprisingly, inhibition of the ERK pathway at the end of G2, besides increasing the IMT of the next cycle, also increased the differences between sister cells, suggesting that high activity at the end of the cycle leads to more homogeneous sisters regarding fitness.

Besides AM, phenotypic dynamics over time can also influence the outcome of single cells (Lane et al., 2017). ERK signaling is widely variable even in isogenic cells (Filippi et al., 2016) and its dynamics influence the outcome of the cell (De et al., 2020). We previously demonstrated that two to four generations are enough to cause the ERK variability found in a colony of cells to be similar to the variability of randomly grouped cells (Lenz et al., 2021). Here, we observed that sister cells turned asymmetric over the course of the cell cycle, highlighting the role of time in generating differences in the ERK activity status of sister cells. Therefore, we add that ERK heterogeneity, in addition to being acquired through AM, can be developed throughout cell cycle in sister cells. Moreover, we add that ERK dynamics in sisters was correlated with Δ IMT in sister cells, suggesting that the fitness variability found in sister cells can also be explained, at least in part, by the variability of ERK activity throughout the cycle.

Taken together, our findings demonstrate that although mitosis contributes to ERK differences in sister cells, the variability in ERK activity during the progression of the cell cycle is mainly responsible for producing the ERK differences relevant for IMT in sister cells. Our data also further reinforce the importance of understanding the role of mitosis and time in generating variabilities, especially in cancer, in order to reduce the heterogeneity of phenotypes.

MATERIALS AND METHODS**Cell culture, fluorescent labels and reagents**

A172, MRC-5 and U251 glioma cell lines obtained from American Tissue Culture Collection (ATCC) were cultured in DMEM LOW (Gibco #31600-034) supplemented with 10% fetal bovine serum (Laborclin #630111) and maintained at 37°C and 5% CO₂ in a humidified incubator. A172 and MRC-5 cells were transduced with ERK-KTR fluorescent reporter (Kudo et al., 2018; Regot et al., 2014) and with the nuclear marker Apple53BP1trunc (Yang et al., 2015), producing A172^{ERK-53BP1} and MRC5^{ERK-53BP1}. U251^{Ki-67} cells were constructed through tagging endogenously locus of Ki-67 with YFP through CRISPR-cas9 (Lenz et al., 2021; Stewart-Ornstein and Lahav, 2016). During all experiments, cell culture medium was supplemented with 1% penicillin and streptomycin (Gibco #15140-122) and 0.1% amphotericin B (Gibco #15290-018). Cells were regularly tested for *Mycoplasma* using the *Mycoplasma* Detection Kit MycoAlert (Lonza). Trametinib (MEKi, MedChem #HY-10999) was diluted in DMSO and used at 20 nM for 6 h.

Time-lapse microscopy, live-cell tracking and fluorescence quantification

Images of A172^{ERK-53BP1}, MRC5^{ERK-53BP1} and U251^{Ki-67} cells were taken every 30 min with the 20 \times objective on an Incucyte® S3 System (Sartorius). The tracking of individual cells was performed manually. The ERK activity was quantified semi-automatically through software developed by our group (available upon request) that measured the relative cytoplasmic to nuclear fluorescence (C/N) ratio (Kudo et al., 2018; Regot et al., 2014). ERK activity peaks were considered values above the average cell ERK activity plus one standard deviation (s.d.). Ki-67 activity was quantified by the average yellow fluorescence intensity (YFP) in each cell after mitosis and nucleolus formation.

IMT, IMTconservation and SisSymmetry

Intermitotic time (IMT) was calculated in minutes from the birth of a cell to its next division. IMTCon in A172^{ERK-53BP1} cells were obtained by averaging the sister cell IMT divided by the mother cell IMT. The SisSymmetry values were obtained by determining the ratio between the sister with the lowest IMT (faster sister) and the sister with the highest IMT (slower sister).

Mitosis variability and asymmetric sisters

To perform the mitotic variability, sister cells were analyzed at the first frame after mitosis for the morphological phenotypes: cellular area, nuclear area, roundness, nuclear irregularity index (NII), aspect, extent, radius ratio, for a signaling phenotype (number of 53BP1 foci), ERK activity (ERK-KTR fluorescent reporter) and the fitness phenotype as intermitotic time (IMT). The difference of sister cell pairs (Δ) for each phenotype was calculated and represents the variability of sister cells after mitosis. The (Δ) values were submitted to the Shapiro–Wilk test to assess the normality of the data. In this work, phenotypes that accepted normality (Shapiro–Wilk $P>0.05$) represent phenotypes in which mitosis was not enough to generate variability in sister cells, that is, phenotypes that did not undergo AM. Phenotypes that rejected normality (Shapiro–Wilk $P<0.05$), in other words that present a bimodal distribution, represent phenotypes that performed AM, generating pairs of sister cells with greater variability among themselves (asymmetric sisters) in relation to other pairs of more similar sisters (symmetric sisters). Asymmetric sisters were considered pairs of sister cells that had differences (Δ values) above the third quartile (Q3). To confirm the separation in two groups, an unpaired two-tailed Mann–Whitney test was performed between ‘symmetrics’ and ‘asymmetrics’ in the graphs. ‘Symmetrics’ were composed of more homogeneous sister cell pairs (with lower Δ values) whereas ‘asymmetrics’ were composed of more heterogeneous sister cell pairs (with higher Δ values).

Cell cycle alignment, mitotic and temporal variability

Sister cell pairs were synchronized according to the cell cycle at values from 0 to 1, where 0 was the time the cell was born and 1 the time the cell divided.

Then, each cell had its life cycle divided into 5 blocks (block 1: frames from 0 to 0.2; block2: from 0.2 to 0.4; block 3: from 0.4 to 0.6; block4: from 0.6 to 0.8 and block5: frames from 0.8 to 1). As a control, the cell cycle was also aligned considering block 1 larger than the others, simulating the G1 phase, and the results obtained were the same (data not shown). For ERK activity and nuclear area, the average of values obtained within each block was calculated, obtaining 5 values for each single cell. The difference between the averages of each block was calculated between pairs of sister cells (average of block1 sister 1 - average of block1 - sister 2) and the maximum difference (Δ_{max}) found over the 5 blocks was established. Mitotic variability was calculated by the Δ first frame after mitosis and temporal variability was calculated by the $\Delta_{max} - \Delta$ first frame. The same threshold established to identify asymmetric sisters (Δ values above the third quartile - Q3) was used to obtain the percentage of cells that showed the mitotic (green) or temporal variability (red) in the Fig. 2. To assess ERK behavior throughout the cell cycle, the difference (Δ) of ERK activity in pairs of cells was obtained by the cell that had the greater ERK activity - the cell that had less ERK activity in the first frame after mitosis. The amplitude (A) in the graphs was obtained by maximum - minimum Δ value between sisters or non-sisters observed in the 1st frame after mitosis and in the last cell cycle block.

Asymmetrics in the second generation

Analyses of descendants of cells that had initially symmetrical or asymmetrical mitosis were performed. The difference (Δ) in ERK activity for each daughter generated from initially asymmetric or symmetric mothers for ERK activity were obtained. Then, the Δ_{2nd} generation was obtained by determining the value of maximum delta - minimum delta of (Δ) of ERK activity for each daughter generated from initially asymmetric divisions. Similarly, the Δ_{2nd} generation was obtained by determining the value of maximum delta - minimum delta of (Δ) of ERK activity for each daughter generated from sisters with temporal asymmetry for ERK activity, that is, pairs of sisters that had Δ values above the third quartile in the last block of the cell cycle.

Acknowledgements

We wish to thank Ralph Weissleder for the Apple-53BP1trunc (Addgene plasmid #69531) and Markus Cover for the pLentiPGK Puro DEST ERK-KTR-Clover (Addgene plasmid #90227). We also wish to thank Dr Gallit Lahav (Harvard University) for the plasmid used for tagging Ki-67, and the Multi BioCell Lab of CBIot of image acquisition.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: J.H.B., K.R.B., G.L.; Methodology: J.H.B., L.S.L., D.T.; Software: L.C.P.; Validation: J.H.B.; Formal analysis: J.H.B., L.S.L., D.T., J.M.; Investigation: J.H.B., L.S.L., D.T.; Data curation: J.H.B., L.S.L., D.T., K.R.B., G.L.; Writing - original draft: J.H.B., L.S.L., D.T., K.R.B., G.L.; Writing - review & editing: J.H.B.; Visualization: J.H.B., G.L.; Supervision: G.L.; Project administration: J.H.B., G.L.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), FAPERGS-FAPESP (2019/15477-3) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) funding agencies. J.H.B., L.S.L. and G.L. received CNPQ fellowships. L.C.P., D.T., J.M. and K.R.B. received CAPES fellowships.

Data availability

All relevant data can be found within the article and its supplementary information.

Peer review history

The peer review history is available online at <https://journals.biologists.com/jcs/lookup/doi/10.1242/jcs.260103.reviewer-comments.pdf>

References

Batchelor, E., Loewer, A. and Lahav, G. (2009). The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 371-377. doi:10.1038/nrc2604

- Batchelor, E., Loewer, A., Mock, C. and Lahav, G. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 488. doi:10.1038/msb.2011.20
- Bell, C. C. and Gilan, O. (2020). Principles and mechanisms of non-genetic resistance in cancer. *Br. J. Cancer* **122**, 465-472. doi:10.1038/s41416-019-0648-6
- Berge, U., Bochenek, D., Schnabel, R., Wehling, A., Schroeder, T., Stadler, T. and Kroschewski, R. (2019). Asymmetric division events promote variability in cell cycle duration in animal cells and *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **10**, 1901. doi:10.1038/s41467-019-09413-5
- Brock, A., Chang, H. and Huang, S. (2009). Non-genetic heterogeneity - a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 336-342. doi:10.1038/nrg2556
- Chakrabarti, S., Paek, A. L., Reyes, J., Lasick, K. A., Lahav, G. and Michor, F. (2018). Hidden heterogeneity and circadian-controlled cell fate inferred from single cell lineages. *Nat. Commun.* **9**, 5372. doi:10.1038/s41467-018-07788-5
- Chavez-Abiega, S., Grönloh, M. L. B., Gadella, T. W. J., Jr, Bruggeman, F. J. and Goedhart, J. (2022). Single-cell imaging of ERK and Akt activation dynamics and heterogeneity induced by G-protein-coupled receptors. *J. Cell Sci.* **135**, jcs259685. doi:10.1242/jcs.259685
- De, S., Campbell, C., Venkitaraman, A. R. and Esposito, A. (2020). Pulsatile MAPK signaling modulates p53 activity to control cell fate decisions at the G2 checkpoint for DNA damage. *Cell Rep.* **30**, 2083-2093.e5. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.074
- Dey-Guha, I., Wolfer, A., Yeh, A. C., G Albeck, J., Darp, R., Leon, E., Wulffkuhle, J., Petricoin, E. F., Wittner, B. S. and Ramaswamy, S. (2011). Asymmetric cancer cell division regulated by AKT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 12845-12850. doi:10.1073/pnas.1109632108
- Dey-Guha, I., Alves, C. P., Yeh, A. C., Salony, Sole, X., Darp, R. and Ramaswamy, S. (2015). A mechanism for asymmetric cell division resulting in proliferative asynchronicity. *Mol. Cancer Res.* **13**, 223-230. doi:10.1158/1541-7786.MCR-14-0474
- Filippi-Chiela, E. C., Oliveira, M. M., Jurkovski, B., Callegari-Jacques, S. M., Da Silva, V. D. and Lenz, G. (2012). Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One* **7**, e42522. doi:10.1371/journal.pone.0042522
- Filippi, S., Barnes, C. P., Kirk, P. D. W., Kudo, T., Kunida, K., McMahon, S. S., Tsuchiya, T., Wada, T., Kuroda, S. and Stumpf, M. P. H. (2016). Robustness of MEK-ERK dynamics and origins of cell-to-cell variability in MAPK signaling. *Cell Rep.* **15**, 2524-2535. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.024
- Gookin, S., Min, M., Phadke, H., Chung, M., Moser, J., Miller, I., Carter, D. and Spencer, S. L. (2017). A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. *PLoS Biol.* **15**, e2003268. doi:10.1371/journal.pbio.2003268
- Granada, A. E., Jiménez, A., Stewart-Ornstein, J., Blüthgen, N., Reber, S., Jambhekar, A. and Lahav, G. (2020). The effects of proliferation status and cell cycle phase on the responses of single cells to chemotherapy. *Mol. Biol. Cell* **31**, 845-857. doi:10.1091/mbc.E19-09-0515
- Higuchi-Sanabria, R., Pernice, W. M. A., Vevea, J. D., Alessi Wolken, D. M., Boldogh, I. R. and Pon, L. A. (2014). Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **14**, 1133-1146. doi:10.1111/1567-1364.12216
- Hitomi, M., Chumakova, A. P., Silver, D. J., Knudsen, A. M., Pontius, W. D., Murphy, S., Anand, N., Kristensen, B. W. and Lathia, J. D. (2021). Asymmetric cell division promotes therapeutic resistance in glioblastoma stem cells. *JCI Insight* **6**, 130510. doi:10.1172/jci.insight.130510
- Inaba, M. and Yamashita, Y. M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell* **11**, 461-469. doi:10.1016/j.stem.2012.09.003
- Jacques-Silva, M. C., Bernardi, A., Rodnight, R. and Lenz, G. (2004). ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. *Oncology* **67**, 450-459. doi:10.1159/000082930
- Kaseb, H. O., Lewis, D. W., Saunders, W. S. and Gollin, S. M. (2016). Cell division patterns and chromosomal segregation defects in oral cancer stem cells. *Genes Chromosomes Cancer* **55**, 694-709. doi:10.1002/gcc.22371
- Kudo, T., Jeknić, S., Macklin, D. N., Akhter, S., Hughey, J. J., Regot, S. and Covert, M. W. (2018). Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. *Nat. Protoc.* **13**, 155-169. doi:10.1038/nprot.2017.128
- Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A. J., Elowitz, M. B. and Alon, U. (2004). Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat. Genet.* **36**, 147-150. doi:10.1038/ng1293
- Lane, K., Van Valen, D., Defelice, M. M., Macklin, D. N., Kudo, T., Jaimovich, A., Carr, A., Meyer, T., Pe'er, D., Boutet, S. C. et al. (2017). Measuring signaling and RNA-seq in the same cell links gene expression to dynamic patterns of NF- κ B activation. *Cell Syst.* **4**, 458-469.e5. doi:10.1016/j.cels.2017.03.010
- Lathia, J. D., Hitomi, M., Gallagher, J., Gadani, S. P., Adkins, J., Vasanji, A., Liu, L., Eyles, C. E., Heddleston, J. M., Wu, Q. et al. (2011). Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis.* **2**, e200. doi:10.1038/cddis.2011.80
- Lawson, D. A., Kessenbrock, K., Davis, R. T., Pervolarakis, N. and Werb, Z. (2018). Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1349-1360. doi:10.1038/s41556-018-0236-7

- Lenz, G., Gottfried, C., Luo, Z., Avruch, J., Rodnight, R., Nie, W. and Neary, J. T. (2000). P_{2Y} purinoceptor subtypes recruit different MEK activators in astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 927-936. doi:10.1038/sj.bjp.0703138
- Lenz, L. S., Faccioni, J. L., Bracco, P. A., Santos, J. A. F., Pereira, L. C., Buss, J. H., Tamborindeguy, M. T., Torgo, D., Monteiro, T., Mantovani, G. B. et al. (2021). Cancer cell fitness is dynamic. *Cancer Res.* **81**, 1040-1051. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-2488
- Lenz, G., Onzi, G. R., Lenz, L. S., Buss, J. H., Dos Santos, J. A. and Begnini, K. R. (2022). The origins of phenotypic heterogeneity in cancer. *Cancer Res.* **82**, 3-11. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-1940
- Lindner, A. B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E. J. and Taddei, F. (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3076-3081. doi:10.1073/pnas.0708931105
- Marusyk, A., Janiszewska, M. and Polyak, K. (2020). Intratumor heterogeneity: the Rosetta stone of therapy resistance. *Cancer Cell* **37**, 471-484. doi:10.1016/j.ccell.2020.03.007
- Min, M., Rong, Y., Tian, C. and Spencer, S. L. (2020). Temporal integration of mitogen history in mother cells controls proliferation of daughter cells. *Science* **368**, 1261-1265. doi:10.1126/science.aay8241
- Mirman, Z. and De Lange, T. (2020). 53BP1: a DSB escort. *Genes Dev.* **34**, 7-23. doi:10.1101/gad.333237.119
- Pargett, M., Gillies, T. E., Teragawa, C. K., Sparta, B. and Albeck, J. G. (2017). Single-cell imaging of ERK signaling using fluorescent biosensors. *Methods Mol. Biol.* **1636**, 35-59. doi:10.1007/978-1-4939-7154-1_3
- Phillips, N. E., Mandic, A., Omid, S., Naef, F. and Suter, D. M. (2019). Memory and relatedness of transcriptional activity in mammalian cell lineages. *Nat. Commun.* **10**, 1208. doi:10.1038/s41467-019-09189-8
- Pisco, A. O., Brock, A., Zhou, J. Y., Moor, A. E., Mojtahedi, M., Jackson, D. and Huang, X.-S. (2013). Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. *Nat. Commun.* **4**, 2467. doi:10.1038/ncomms3467
- Ramirez, M., Rajaram, S., Steininger, R. J., Osipchuk, D., Roth, M. A., Morinishi, L. S., Evans, L., Ji, W., Hsu, C.-H., Thurley, K. et al. (2016). Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat. Commun.* **7**, 10690. doi:10.1038/ncomms10690
- Regot, S., Hughey, J. J., Bajar, B. T., Carrasco, S. and Covert, M. W. (2014). High-sensitivity measurements of multiple kinase activities in live single cells. *Cell* **157**, 1724-1734. doi:10.1016/j.cell.2014.04.039
- Ryu, H., Chung, M., Dobrzyński, M., Fey, D., Blum, Y., Sik Lee, S., Peter, M., Kholodenko, B. N., Li Jeon, N. and Pertz, O. (2016). Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate. *Mol. Syst. Biol.* **12**, 866. doi:10.15252/msb.20166982
- Silva, A. O., Dalsin, E., Onzi, G. R., Filippi-Chiela, E. C. and Lenz, G. (2016). The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp. Cell Res.* **348**, 177-183. doi:10.1016/j.yexcr.2016.09.014
- Sobecki, M., Mrouj, K., Colinge, J., Gerbe, F., Jay, P., Krasinska, L., Dulic, V. and Fisher, D. (2017). Cell-cycle regulation accounts for variability in Ki-67 expression levels. *Cancer Res.* **77**, 2722-2734. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0707
- Stern, A. D., Smith, G. R., Santos, L. C., Sarmah, D., Zhang, X., Lu, X., Iuricich, F., Pandey, G., Iyengar, R. and Birtwistle, M. R. (2021). Predicting individual cell division events from single-cell ERK and Akt dynamics. *BioRxiv* 2021.09.14.460349. doi:10.1101/2021.09.14.460349
- Stewart-Ornstein, J. and Lahav, G. (2016). Dynamics of CDKN1A in single cells defined by an endogenous fluorescent tagging toolkit. *Cell Rep.* **14**, 1800-1811. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.045
- Venkei, Z. G. and Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *J. Cell Biol.* **217**, 3785-3795. doi:10.1083/jcb.201807037
- Wilting, R. H. and Dannenberg, J.-H. (2012). Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resist. Updat.* **15**, 21-38. doi:10.1016/j.drug.2012.01.008
- Yang, K. S., Kohler, R. H., Landon, M., Giedt, R. and Weissleder, R. (2015). Single cell resolution in vivo imaging of DNA damage following PARP inhibition. *Sci. Rep.* **5**, 10129. doi:10.1038/srep10129

Supplemental information for:

The role of mitosis in generating fitness heterogeneity

Julieti Huch Buss^{1,2}, Luana Suéling Lenz^{1,2}, Luiza Cherobini Pereira^{1,2}, Daphne Torgo^{1,2}; Júlia Marcolin^{1,2}, Karine Rech Begnini^{1,2*} and Guido Lenz^{1,2*}

Supplementary Figures:

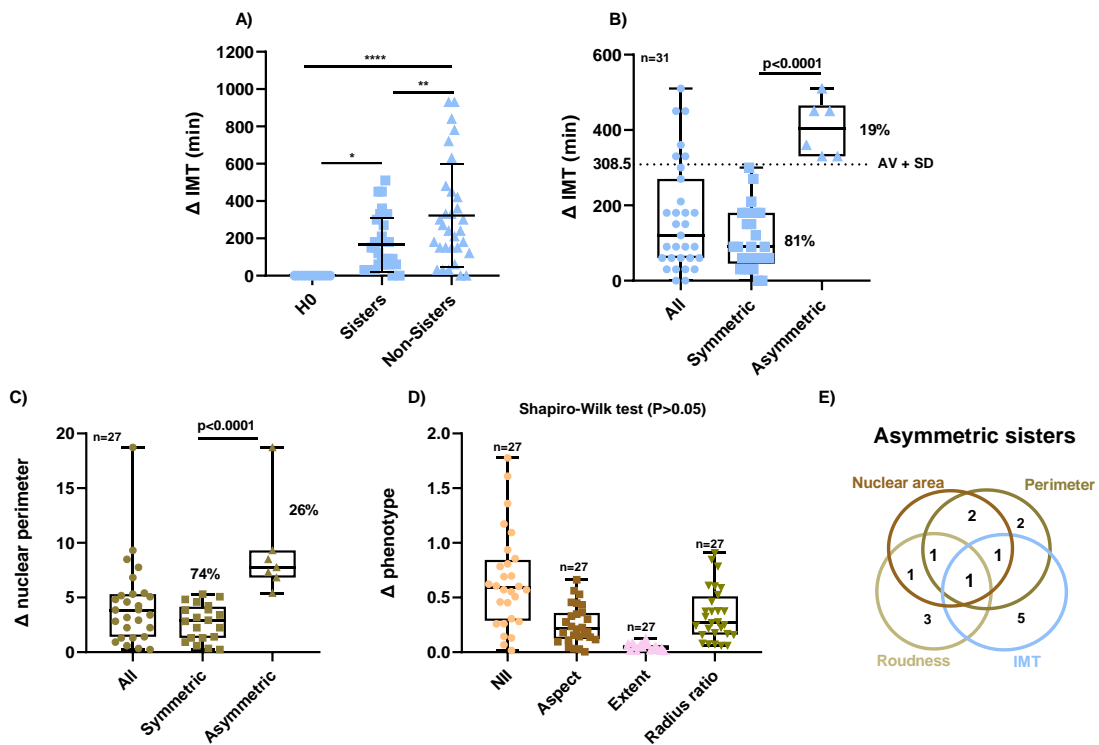
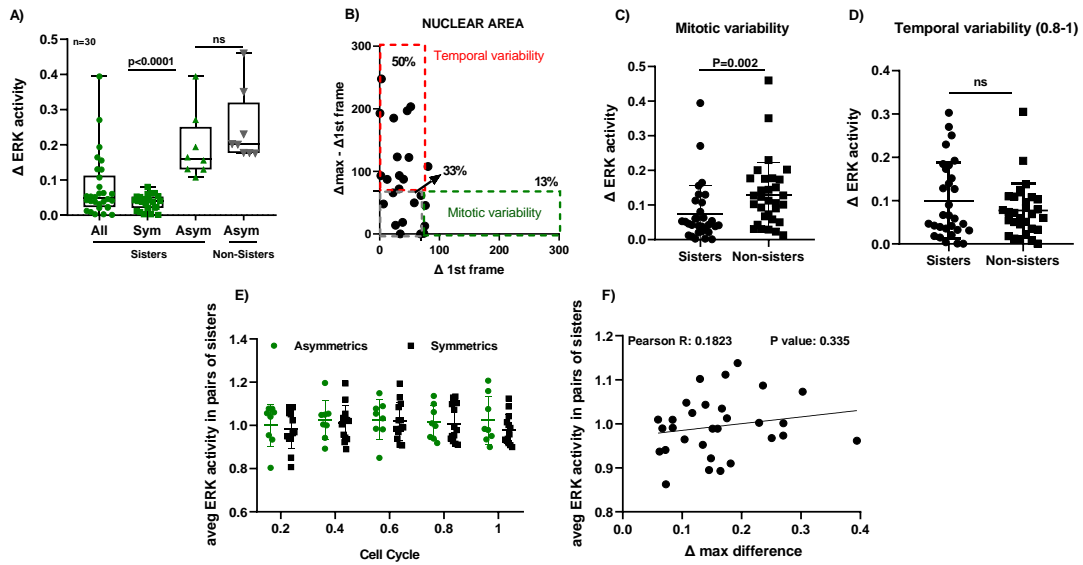


Figure Supplementary 1: Variability of sister cells after mitosis.

A. Δ IMT in pairs of sisters in comparison with null hypothesis (H0) and alternative hypothesis, which are the randomly assembled pairs of non-sister cells (H1). **B.** Δ IMT, in minutes, in pairs of sister cells separated by average + SD. Sisters with Δ IMT above the mean + SD were considered asymmetric. **C.** Δ nuclear perimeter in sister cells pairs after mitosis (Shapiro wilk $P < 0.05$, rejecting normality). **D.** Nuclear morphometrical parameters (Nuclear Irregularity Index (NII), Aspect, Extent and Radius ratio) which accepted normality (Shapiro Wilk $P > 0.05$). **E.** Co-occurrences of asymmetric pairs of sisters on different phenotypes.

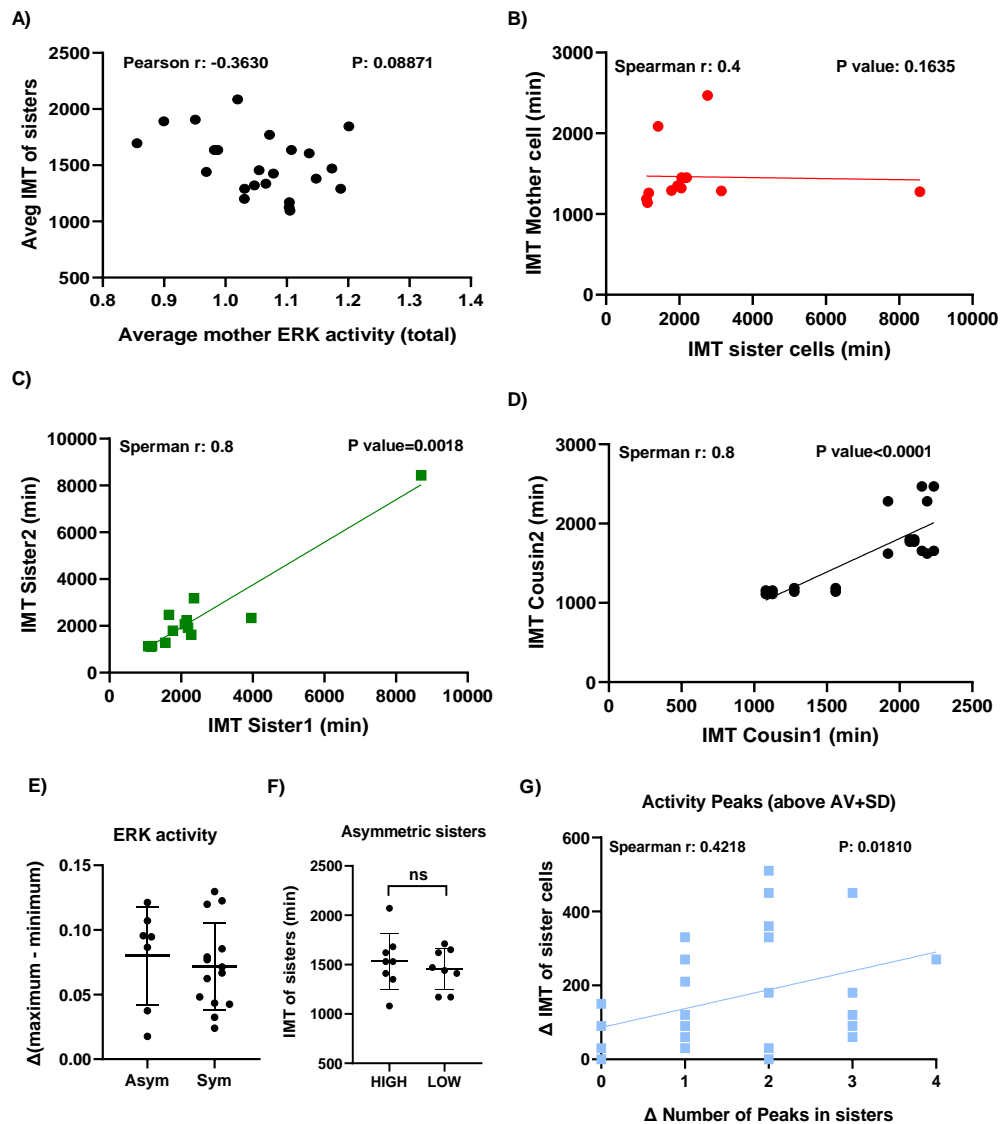


17

18 **Figure Supplementary 2: Contribution of mitosis and time on fitness variability in sister cells.**

19 **A.** Each point on the graph represents the difference (Δ) of ERK activity in pairs of sister or non-sister cells
 20 after mitosis. Asymmetric were considered pairs of cells that had differences (Δ ERK activity) above the third
 21 quartile (Q3) when compared to all delta values of sister or non-sister cells pairs. **B.** Contribution of mitosis
 22 and time in the generation of nuclear variability in sister cell pairs. Δ ERK activity of sister and non-sister
 23 cells after mitosis (**C**) and at the end of the cell cycle (**D**), representing mitotic and temporal variability,
 24 respectively. T-test was performed to compare the means between groups. **E.** ERK activity average in pairs
 25 of asymmetric or symmetric sister cells throughout the cycle. **F.** The average ERK activity was compared to
 26 the maximum ERK difference (Δ max difference) observed in sister cell pairs.

27



28

29 **Figure Supplementary 3: Heritability and variability of ERK on fitness of sister cells.**

30 **A.** Correlation analysis between the average ERK activity of the mother cell over the entire cell cycle on the
 31 IMT average in sister cells. ($P < 0.05$). **B.** Correlation analysis between the IMT of mother cells with the mean
 32 of IMT of daughter cells (sisters), in minutes. Correlation analysis between the IMT of the sister cells (**C**) and
 33 between the IMT of the cousin cells (**D**) in minutes. **E.** ERK activity dynamics in pairs of asymmetric or
 34 symmetric sisters obtained by the maximum difference in ERK activity found throughout the cell cycle -
 35 minimum difference observed. **F.** Asymmetric sister cell pairs for ERK activity were separated into high
 36 (sister cell with higher ERK activity after mitosis) and low (sister cell with lower ERK activity after mitosis)
 37 and the IMT in minutes of each sister cell was obtained. **G.** Represent the correlation between the difference
 38 (Δ) number of ERK activity peaks in sister cells pairs in the difference (Δ) IMT in sister cells.

39

40

41 **Movies Titles:**

42 **Movie 1: Asymmetric sister cells.** An example of asymmetric sister cells for ERK activity, representing
43 sisters with mitotic variability. Images of A172^{ERK-53BP1} were taken every 30 minutes with the 20x objective
44 on an Incucyte® S3 System (Sartorius).

45 **Movie 2: Symmetric sister cells.** An example of sister cells that are symmetric in the first frame after
46 mitosis but turned asymmetric over the course of the cell cycle. Images of A172^{ERK-53BP1} were taken every
47 30 minutes with the 20x objective on an Incucyte® S3 System (Sartorius).

DISCUSSÕES INTEGRADAS

A mitose assimétrica (*AM*) é um processo de divisão celular onde ocorre a produção de células filhas com diferentes características entre si (KNOBLICH, 2010). Historicamente, a *AM* é responsável por garantir a diversidade celular necessária durante o processo de desenvolvimento de diferentes organismos (KNOBLICH, 2001), sendo também um evento responsável pela manutenção da homeostase tecidual em populações de células tronco (SANTORO et al., 2016). No entanto, observamos que os eventos de *AM* não são exclusivos a esses cenários. Células tumorais são capazes de realizar *AM* produzindo células filhas tanto com diferenças morfológicas (TSE; WEAVER; CARLO, 2012; ZHANG et al., 2014), quanto com diferenças na segregação de componentes subcelulares (LE ROY et al., 2010; LIU et al., 2013). Nesse contexto, acreditamos que a *AM* pode atuar como um mecanismo responsável por gerar variabilidades em populações de células tumorais, contribuindo com a heterogeneidade intratumoral (*ITH*).

A *ITH* é atribuída à diversidade genética e epigenética encontrada em populações de células tumorais (BLACK; MCGRANAHAN, 2021; RAMÓN Y CAJAL et al., 2020; WANG et al., 2021). Dessa maneira, tumores apresentam células com diferentes níveis de sensibilidade a tratamentos, impactando negativamente a terapia (DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). Compreender os mecanismos responsáveis por produzir variabilidades em câncer é de extrema relevância no contexto terapêutico (MCGRANAHAN; SWANTON, 2017). Nesse cenário, discutimos que *AMs* podem favorecer a geração de diversidade em populações tumorais, favorecendo assim, o surgimento de células resistentes a tratamentos. Portanto, no capítulo I desta tese, avaliamos a importância da *AM* e do tempo na geração de variabilidade de fenótipos, especialmente de aptidão, em células irmãs. No capítulo II, discutimos o quanto a *AM* é descrita em células tumorais e sua contribuição para a variabilidade de fenótipos proliferativos em câncer.

A aptidão é um dos principais fenótipos associados a biologia tumoral, visto que o câncer é caracterizado por apresentar proliferação descontrolada

(HANAHAN; WEINBERG, 2011). A aptidão celular é caracterizada pela capacidade da célula de sobreviver e deixar descendentes (ORR, 2009). Dessa maneira, a fim de avaliar a diferença de aptidão de células irmãs, medimos a diferença (Δ) de tempo intermitótico (*IMT*) em células irmãs. É importante ressaltar que utilizamos o *IMT* como um medidor indireto de aptidão, ou seja, quanto menor o *IMT*, maior a aptidão (capacidade proliferativa) das células.

Nossos dados mostraram que 23% dos pares de células avaliados foram considerados assimétricos para *IMT*, demonstrando diferença de duração de ciclo celular de 330 até 510 minutos. A heterogeneidade proliferativa já foi descrita em células tumorais, estando associada a expressão assimétrica de AKT, que resulta na produção de células filhas AKT^{low} e AKT^{normal}, com baixa e alta capacidade proliferativa, respectivamente, sugerindo a importância da ativação assimétrica de vias que controlam a proliferação celular na geração de heterogeneidade de aptidão (DEY-GUHA et al., 2011). Fenótipos celulares que afetam a capacidade proliferativa e de sobrevivência das células, tais como, número de 53BP1, indicador de quebras de fita dupla de DNA (DSBs) (MIRMAN; DE LANGE, 2020) e, fenótipos morfológicos, como área celular e parâmetros morfométricos nucleares, também foram avaliados e mostraram-se assimétricos logo após a mitose.

Corroborando com nossos achados, a *AM* é descrita visando a manutenção da capacidade proliferativa em uma de suas células filhas (HIGUCHI-SANABRIA et al., 2014). Além disso, a *AM* tem sido um importante evento responsável por produzir variabilidades em câncer (BERGE et al., 2019; INABA; YAMASHITA, 2012). Nesse cenário, a co-segregação assimétrica de EGFR e p75NTR, por exemplo, é responsável por promover resistência terapêutica à célula filha que apresenta receptores coenriquecidos (HITOMI et al., 2021), destacando ainda o importante papel da *AM* na geração de fenótipos resistentes a tratamentos. Nesse contexto, podemos sugerir que a *AM* pode atuar favorecendo a geração de variabilidades em tumores, especialmente de aptidão. Além da segregação de componentes subcelulares, no capítulo II desta tese, também demonstramos que células tumorais são capazes de realizar *AMs* produzindo células com diferentes capacidades proliferativas, sob diferentes condições de estresse (ZHANG et al., 2014). Portanto, a partir desse conjunto

de dados, podemos inferir que a *AM* pode ser considerada um mecanismo pró-tumoral, visto que atua produzindo variabilidades que eventualmente possam favorecer o estabelecimento do tumor.

Considerando que o *IMT* é um fenótipo que só pode ser avaliado após a finalização completa de pelo menos um ciclo celular, avaliamos a atividade de ERK, via classicamente associada a regulação da proliferação e amplamente variável em células isogênicas (FILIPPI et al., 2016; LEFLOCH; POUYSSÉGUR; LENORMAND, 2009). Primeiramente, mostramos que a atividade de ERK da célula mãe, nas últimas 5 horas que antecedem a mitose, correlacionou negativamente com a média de *IMT* em células irmãs, sugerindo que a atividade de ERK da célula mãe, no último bloco do ciclo celular, é capaz de influenciar o *IMT* das células filhas. Similarmente, Min e colaboradores demonstraram que o *status* de ativação de MEK da célula mãe é capaz de modular a capacidade proliferativa das células filhas, confirmando a relação entre atividade de ERK da célula mãe e capacidade proliferativa das células filhas (MIN et al., 2020).

Além disso, assumindo que a atividade de ERK nas últimas 5 horas do ciclo celular influencia o *IMT* das células filhas, avaliamos o quanto as diferenças de ERK observadas em células irmãs são derivadas de *AMs* e o quanto são desenvolvidas ao longo do tempo. Nossos dados demonstram que embora 23% das irmãs apresentaram diferença máxima logo após a mitose (variabilidade mitótica), 33% atingem o Δ_{max} ao longo do ciclo celular (variabilidade temporal), demonstrando que, embora as células apresentem variabilidade de ERK logo após a mitose, a variabilidade máxima de ERK observada em células irmãs é principalmente adquirida conforme as células progridem no ciclo. Corroborando com nossos achados, variabilidades em níveis de ERK já foram observadas em células tumorais, onde logo após a mitose, uma célula filha apresentou até 9x mais expressão de *erbB-2* quando comparada à sua célula irmã (CZERNIAK et al., 1992). Variabilidade de ERK em células irmãs também podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela segregação assimétrica de receptores associados a ativação da via, como por exemplo a ativação de EGFR (MCCUBREY et al., 2007; PONSIOEN et al., 2021).

Estudos envolvendo o monitoramento da atividade de ERK em células vivas (BLUM et al., 2017; KUDO et al., 2018; REGOT et al., 2014) têm mostrado

que a atividade de ERK é altamente dinâmica em células únicas (CHAVEZ-ABIEGA et al., 2022). Além disso, a modulação da atividade de ERK tem sido associada a diferentes desfechos celulares (RYU et al., 2016). Nesse contexto, acreditamos que a variabilidade de aptidão, encontrada em células irmãs, pode ser consequência da diferença de atividade de ERK que células irmãs apresentam. Portanto, visando avaliar o comportamento de células irmãs ao longo do ciclo celular, em termos de atividade de ERK, separamos os pares de células irmãs em irmãs com variabilidade mitótica e irmãs com variabilidade temporal.

Nossos dados demonstram que cerca de 60% das irmãs inicialmente simétricas tornaram-se assimétricas ao longo do ciclo, apresentando maior variação de ERK no último bloco do ciclo antes da divisão, quando comparada ao último bloco das irmãs inicialmente assimétricas, sugerindo que células irmãs que eram semelhantes logo após a mitose tornaram-se muito diferentes ao longo do tempo. Dessa maneira, nossos dados confirmam a importância do tempo no aumento de heterogeneidade de ERK em uma subpopulação de células irmãs. Em um estudo anterior, demonstramos que duas a quatro gerações são suficientes para produzir a mesma variabilidade de ERK encontrada em uma colônia de células agrupadas aleatoriamente (LENZ et al., 2021). No presente estudo, acrescentamos que a heterogeneidade de ERK já é observada em células irmãs, onde 23% dessa variabilidade é derivada de *AM* e 33% adquirida conforme as células progridem no ciclo celular.

Alterações na dinâmica de ERK são essenciais para execução de processos fisiológicos associados a aptidão, como proliferação e diferenciação (ALBECK; MILLS; BRUGGE, 2013; AOKI et al., 2017). Nesse sentido, variabilidades na dinâmica de ERK estão associadas a decisão de entrada da célula tumoral em fase S, fazendo com que células irmãs já apresentem diferenças em termos de ciclo celular e assim, contribuindo com a variabilidade proliferativa da população (ALBECK; MILLS; BRUGGE, 2013). Além disso, observamos que quanto maior a diferença nos picos de atividade de ERK em pares de células irmãs, maior a diferença de *IMT* em irmãs, sugerindo que a variabilidade de *IMT* encontrada em células irmãs também pode ser explicada, pelo menos em parte, pela variabilidade da atividade de ERK ao longo do ciclo.

Dessa maneira, podemos inferir que a variabilidade de *IMT* encontrada em células irmãs seja, pelo menos em parte, derivada da variabilidade de ERK observada conforme as células irmãs progridem no ciclo celular.

A herdabilidade de fenótipos, incluindo de assimetrias, é a chave para a compreensão da geração de heterogeneidade em células tumorais (LENZ et al., 2022). Nesse sentido, avaliamos o quanto irmãs com variabilidade mitótica produzem descendentes assimétricos para a próxima geração. Nossos dados demonstraram que, células irmãs inicialmente assimétricas para atividade de ERK produziram 69% de descendentes assimétricos para atividade de ERK. No entanto, a variabilidade adquirida ao longo do ciclo celular não produziu *AM* na próxima geração, sugerindo que a *AM*, em termos de ERK atividade, é parcialmente hereditária enquanto a variabilidade temporal não produz células filhas assimétricas para atividade de ERK.

Além disso, sabendo que a variabilidade de fenótipos em células filhas pode ser influenciada pelo fenótipo de suas células-mãe (MIN et al., 2020), avaliamos o quanto o *IMT* e a atividade de ERK são fenótipos herdáveis para suas células filhas. Nossos dados mostram que, assim como o *IMT*, a atividade média de ERK das células mãe, não é herdada para suas células filhas. Por outro lado, a atividade máxima de ERK da célula mãe nas últimas 5 horas do ciclo correlaciona-se com a atividade média de ERK em pares de células filhas, similarmente ao que observamos com o impacto da atividade de ERK no final da mitose sobre o *IMT* das células filhas, sugerindo que alguma informação, em termos de atividade de ERK é transmitida de célula mãe para célula filha. Confirmando esses achados, se for considerada a atividade de ERK durante todo o ciclo celular da mãe, a correlação com os *IMTs* das filhas não atinge significância estatística, reforçando a importância das últimas horas do ciclo celular da mãe na modulação do *IMT* de suas filhas. Nossos dados também corroboram com o período através do qual a inibição de MEK no ciclo celular da célula mãe é capaz de afetar o percentual de filhas proliferativas (MIN et al., 2020).

Além disso, a inibição de ERK da célula mãe ao final de G2, além de aumentar o *IMT* das células filhas, também aumentou as diferenças de *IMT* em células irmãs, confirmando a importância da atividade de ERK da célula mãe na

geração de células filhas com diferenças proliferativas. Sabendo que a heterogeneidade fenotípica, especialmente proliferativa, é um dos principais eventos que favorecem o surgimento de fenótipos resistentes terapia (PISCO et al., 2013), esse resultado é de extrema relevância, uma vez que sugere que uma alta atividade de ERK no final do ciclo, pode produzir células filhas mais homogêneas em relação a atividade de ERK.

Portanto, nossos achados demonstram que, embora a mitose contribua produzindo diferenças de ERK em células irmãs, a variabilidade de ERK produzida ao longo do ciclo celular é principalmente responsável por produzir as diferenças de ERK relevantes para impactar o *IMT* das células filhas. Além disso, assumindo que a atividade de ERK, no último bloco do ciclo é capaz de modular a média de *IMT* em células irmãs, é importante considerar que as variabilidades que ocorrem ao longo do ciclo de ERK podem favorecer a heterogeneidade proliferativa em células tumorais. Nossos dados reforçam ainda mais a importância de entender o papel da mitose e do tempo na geração de variabilidades, especialmente no câncer, a fim de reduzir a *ITH*, que, atualmente, representa um importante obstáculo à terapia.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos dados expostos, podemos concluir que os principais achados desta tese foram os seguintes:

- Células irmãs apresentam variabilidades de aptidão e de fenótipos associados à aptidão logo após a mitose;
- A variabilidade de ERK em células irmãs é principalmente derivada de diferenças adquiridas conforme as células progridem no ciclo celular;
- A *AM* de ERK é herdável, enquanto a variabilidade temporal apresenta influência sobre o *IMT*;
- A atividade de ERK da célula mãe, nas últimas 5h que antecedem a mitose, é capaz de influenciar a atividade de ERK e a média de *IMT* em células filhas.

Compreender os mecanismos que resultam em variabilidades proliferativas, principalmente em câncer, são de extrema relevância para o contexto terapêutico. Em resumo, observamos que tanto a variabilidade temporal, quanto a atividade de ERK da célula mãe é capaz de influenciar o *IMT* das células filhas. Dessa maneira, os próximos passos deste estudo envolvem:

- Induzir a atividade de ERK na célula mãe a fim de obter células filhas com capacidades proliferativas mais homogêneas, reduzindo assim a *ITH*;
- Tratar as células com TMZ a fim de entender se as células com *IMTs* semelhantes respondem de maneira homogênea à terapia.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, O. et al. Feedback control of chromosome separation by a midzone Aurora B gradient. **Science (New York, N.Y.)**, v. 345, n. 6194, p. 332–336, 18 jul. 2014.
- AGUILANIU, H. et al. Asymmetric Inheritance of Oxidatively Damaged Proteins During Cytokinesis. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1751–1753, 14 mar. 2003.
- ALBECK, J. G.; MILLS, G. B.; BRUGGE, J. S. Frequency-Modulated Pulses of ERK Activity Transmit Quantitative Proliferation Signals. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 249–261, 24 jan. 2013.
- AOKI, K. et al. Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. **Developmental Cell**, v. 43, n. 3, p. 305–317.e5, 6 nov. 2017.
- ASARE, A.; LEVORSE, J.; FUCHS, E. Coupling organelle inheritance with mitosis to balance growth and differentiation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 355, n. 6324, p. eaah4701, 3 fev. 2017.
- BABOUR, A. et al. A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 256–269, 23 jul. 2010.
- BARRAL, Y.; LIAKOPOULOS, D. Role of spindle asymmetry in cellular dynamics. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 278, p. 149–213, 2009.
- BECKMANN, J. et al. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. **Blood**, v. 109, n. 12, p. 5494–5501, 15 jun. 2007.
- BEDDINGTON, R. S. P.; ROBERTSON, E. J. Axis Development and Early Asymmetry in Mammals. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 195–209, 22 jan. 1999.
- BERGE, U. et al. Asymmetric division events promote variability in cell cycle duration in animal cells and Escherichia coli. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1901, 23 abr. 2019.
- BERIKA, M.; ELGAYYAR, M. E.; EL-HASHASH, A. H. K. Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 2, 2014.
- BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 518–528, ago. 2013.
- BETSCHINGER, J.; KNOBLICH, J. A. Dare to be different: asymmetric cell division in Drosophila, C. elegans and vertebrates. **Current biology: CB**, v. 14, n. 16, p. R674-685, 24 ago. 2004.

BLACK, J. R. M.; MCGRANAHAN, N. Genetic and non-genetic clonal diversity in cancer evolution. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 6, p. 379–392, jun. 2021.

BLUM, Y. et al. Measuring ERK Activity Dynamics in Single Living Cells Using FRET Biosensors. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1487, p. 203–221, 2017.

BOSSING, T. et al. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. **Developmental Biology**, v. 179, n. 1, p. 41–64, 10 out. 1996.

BU, P. et al. A miR-34a-Numb Feedforward Loop Triggered by Inflammation Regulates Asymmetric Stem Cell Division in Intestine and Colon Cancer. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 2, p. 189–202, 4 fev. 2016.

BUFALINO, M. R.; VAN DER KOOY, D. The aggregation and inheritance of damaged proteins determines cell fate during mitosis. **Cell Cycle**, v. 13, n. 7, p. 1201–1207, 1 abr. 2014.

BURRELL, R. A. et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 338–345, set. 2013.

BUSS, J. H. et al. The role of mitosis in generating fitness heterogeneity. **Journal of Cell Science**, v. 136, n. 1, p. jcs260103, 3 jan. 2023.

CAREY, L. et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 683–692, dez. 2010.

CAREY, L. A. Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. **The Oncologist**, v. 16 Suppl 1, p. 71–78, 2011.

CARTER, B.; ZHAO, K. The epigenetic basis of cellular heterogeneity. **Nature Reviews Genetics**, v. 22, n. 4, p. 235–250, abr. 2021.

CATTANEO, F. et al. Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 11, p. 19700–19728, 29 out. 2014.

CAUSSINUS, E.; GONZALEZ, C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. **Nature Genetics**, v. 37, n. 10, p. 1125–1129, out. 2005.

CHAO, L. et al. Asymmetrical Damage Partitioning in Bacteria: A Model for the Evolution of Stochasticity, Determinism, and Genetic Assimilation. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 1, p. e1004700, 13 jan. 2016.

CHAVEZ-ABIEGA, S. et al. Single-cell imaging of ERK and Akt activation dynamics and heterogeneity induced by G-protein-coupled receptors. **Journal of Cell Science**, v. 135, n. 6, p. jcs259685, 11 mar. 2022.

CHEEKS, R. J. et al. C. elegans PAR Proteins Function by Mobilizing and Stabilizing Asymmetrically Localized Protein Complexes. **Current Biology**, v. 14, n. 10, p. 851–862, 25 maio 2004.

CHEN, C. et al. Klp10A, a stem cell centrosome-enriched kinesin, balances asymmetries in Drosophila male germline stem cell division. **eLife**, v. 5, p. e20977, 25 nov. 2016.

CHEN, Q. et al. Tracing the origin of heterogeneity and symmetry breaking in the early mammalian embryo. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1819, 8 maio 2018.

CHUNDURI, N. K.; BARTHEL, K.; STORCHOVA, Z. Consequences of Chromosome Loss: Why Do Cells Need Each Chromosome Twice? **Cells**, v. 11, n. 9, p. 1530, 3 maio 2022.

CIARDO, D.; GOLDAR, A.; MARHEINEKE, K. On the Interplay of the DNA Replication Program and the Intra-S Phase Checkpoint Pathway. **Genes**, v. 10, n. 2, p. 94, 29 jan. 2019.

CLARKE, M. F. et al. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9339–9344, 3 out. 2006.

COOKE, J. Developmental mechanism and evolutionary origin of vertebrate left/right asymmetries. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 79, n. 2, p. 377–407, maio 2004.

CROSBY, M. E. Cell Cycle: Principles of Control. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 80, n. 3, p. 141–142, set. 2007.

CUSULIN, C. et al. Precursor States of Brain Tumor Initiating Cell Lines Are Predictive of Survival in Xenografts and Associated with Glioblastoma Subtypes. **Stem Cell Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 18 jun. 2015.

CZERNIAK, B. et al. Asymmetric distribution of oncogene products at mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 11, p. 4860–4863, 1 jun. 1992.

DAGOGO-JACK, I.; SHAW, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 15, n. 2, p. 81–94, fev. 2018.

DALTON, C. M.; CARROLL, J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 13, p. 2955–2964, 1 jul. 2013.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 27 jun. 2002.

DEATHRIDGE, J. et al. Live imaging of ERK signalling dynamics in differentiating mouse embryonic stem cells. **Development**, v. 146, n. 12, p. dev172940, jun. 2019.

DELGEHYR, N. et al. Klp10A, a microtubule-depolymerizing kinesin-13, cooperates with CP110 to control *Drosophila* centriole length. **Current biology: CB**, v. 22, n. 6, p. 502–509, 20 mar. 2012.

DERGHAM, S. T. et al. Prevalence and clinical significance of combined K-ras mutation and p53 aberration in pancreatic adenocarcinoma. **International Journal of Pancreatology: Official Journal of the International Association of Pancreatology**, v. 21, n. 2, p. 127–143, abr. 1997.

DEY-GUHA, I. et al. Asymmetric cancer cell division regulated by AKT. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 31, p. 12845–12850, 2 ago. 2011.

DHALIWAL, N. K. et al. KLF4 Nuclear Export Requires ERK Activation and Initiates Exit from Naive Pluripotency. **Stem Cell Reports**, v. 10, n. 4, p. 1308–1323, 10 abr. 2018.

DOE, C. Q.; BOWERMAN, B. Asymmetric cell division: fly neuroblast meets worm zygote. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 68–75, fev. 2001.

DUAN, X.; SUN, S.-C. Actin cytoskeleton dynamics in mammalian oocyte meiosis. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 1, p. 15–24, 1 jan. 2019.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes & Development**, v. 12, n. 15, p. 2245–2262, 1 ago. 1998.

ENDER, P. et al. Spatiotemporal control of ERK pulse frequency coordinates fate decisions during mammary acinar morphogenesis. **Developmental Cell**, v. 57, n. 18, p. 2153–2167.e6, 26 set. 2022.

FENG, X. et al. Genetic Aberrations and Interaction of NEK2 and TP53 Accelerate Aggressiveness of Multiple Myeloma. **Advanced Science**, v. 9, n. 9, p. 2104491, 2022.

FILBY, A. et al. An imaging flow cytometric method for measuring cell division history and molecular symmetry during mitosis. **Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 79, n. 7, p. 496–506, jul. 2011.

FILIPPI, S. et al. Robustness of MEK-ERK Dynamics and Origins of Cell-to-Cell Variability in MAPK Signaling. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2524–2535, 2 jun. 2016.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436–440, 23 jan. 2003.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 445–457, jul. 2009.

FRISE, E. et al. The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 93, n. 21, p. 11925–11932, 15 out. 1996.

FUKASAWA, K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. **Cancer Letters**, v. 230, n. 1, p. 6–19, 8 dez. 2005.

GALIANA, C. et al. High frequency of Ki-ras amplification and p53 gene mutations in adenocarcinomas of the human esophagus. **Molecular Carcinogenesis**, v. 14, n. 4, p. 286–293, dez. 1995.

GAO, R. et al. Nanogrid single-nucleus RNA sequencing reveals phenotypic diversity in breast cancer. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 228, 9 ago. 2017.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J.; BROWN, J. S. Of cancer and cave fish. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 4, p. 237–238, abr. 2011.

GAVET, O.; PINES, J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. **Developmental Cell**, v. 18, n. 4, p. 533–543, 20 abr. 2010.

GÉRARD, A. et al. The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. **The Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 6, p. 863–875, 12 mar. 2007.

GERLINGER, M. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 10, p. 883–892, 8 mar. 2012.

GISSELSSON, D. Mitotic instability in cancer: is there method in the madness? **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 4, n. 8, p. 1007–1010, ago. 2005.

GOLEY, E. D. et al. Dynamic chromosome organization and protein localization coordinate the regulatory circuitry that drives the bacterial cell cycle. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 74, p. 55–64, 2009.

GONZALEZ DE CASTRO, D. et al. Personalized cancer medicine: molecular diagnostics, predictive biomarkers, and drug resistance. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 93, n. 3, p. 252–259, mar. 2013.

GREAVES, M. Evolutionary determinants of cancer. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 8, p. 806–820, ago. 2015.

GRZYWA, T. M.; PASKAL, W.; WŁODARSKI, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. **Translational Oncology**, v. 10, n. 6, p. 956–975, 1 dez. 2017.

GUICHET, P.-O. et al. Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151274, 8 mar. 2016.

GUO, M. et al. Epigenetic heterogeneity in cancer. **Biomarker Research**, v. 7, p. 23, 2019.

GUO, M.; JAN, L. Y.; JAN, Y. N. Control of Daughter Cell Fates during Asymmetric Division: Interaction of Numb and Notch. **Neuron**, v. 17, n. 1, p. 27–41, 1 jul. 1996.

GUO, Y.-J. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 19, n. 3, p. 1997–2007, mar. 2020.

HAMAZAKI, T. et al. The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 20, p. 7539–7549, out. 2006.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 12 jan. 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. **Genes & Development**, v. 14, n. 19, p. 2393–2409, 1 out. 2000.

HARTWELL, L. H.; SMITH, D. Altered fidelity of mitotic chromosome transmission in cell cycle mutants of *S. cerevisiae*. **Genetics**, v. 110, n. 3, p. 381–395, 1 jul. 1985.

HIGUCHI-SANABRIA, R. et al. Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 8, p. 1133–1146, dez. 2014.

HITOMI, M. et al. Asymmetric cell division promotes therapeutic resistance in glioblastoma stem cells. **JCI insight**, v. 6, n. 3, p. 130510, 8 fev. 2021.

HOEIJMAKERS, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, 17 maio 2001.

HUH, D.; PAULSSON, J. Non-genetic heterogeneity from stochastic partitioning at cell division. **Nature Genetics**, v. 43, n. 2, p. 95–100, fev. 2011.

INABA, M.; YAMASHITA, Y. M. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 4, p. 461–469, 5 out. 2012.

IZUMI, H.; KANEKO, Y. Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 44, p. 18048–18053, 30 out. 2012.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line. **Oncology**, v. 67, n. 5–6, p. 450–459, 2004.

JEAN-CHARLES, P.-Y.; KAUR, S.; SHENOY, S. K. G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 142–158, set. 2017.

JEFFREY, P. D.; TONG, L.; PAVLETICH, N. P. Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. **Genes & Development**, v. 14, n. 24, p. 3115–3125, 15 dez. 2000.

JEMAA, M. et al. Characterization of novel MPS1 inhibitors with preclinical anticancer activity. **Cell Death and Differentiation**, v. 20, n. 11, p. 1532–1545, nov. 2013.

JIANG, Q. et al. A Fraction of CD133+ CNE2 Cells Is Made of Giant Cancer Cells with Morphological Evidence of Asymmetric Mitosis. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 12, p. 1236–1244, 2015.

JINESH, G. G. et al. Molecular genetics and cellular events of K-Ras-driven tumorigenesis. **Oncogene**, v. 37, n. 7, p. 839–846, fev. 2018.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5600, p. 1911–1912, 6 dez. 2002.

JOHNSON, H. E.; TOETTCHER, J. E. Signaling Dynamics Control Cell Fate in the Early Drosophila Embryo. **Developmental Cell**, v. 48, n. 3, p. 361- 370.e3, 11 fev. 2019.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253–265, abr. 2004.

KALTSCHMIDT, J. A.; BRAND, A. H. Asymmetric cell division: microtubule dynamics and spindle asymmetry. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 11, p. 2257–2264, 1 jun. 2002.

KANDA, T.; SULLIVAN, K. F.; WAHL, G. M. Histone–GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. **Current Biology**, v. 8, n. 7, p. 377–385, 26 mar. 1998.

KASEB, H. O. et al. Cell division patterns and chromosomal segregation defects in oral cancer stem cells. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 55, n. 9, p. 694–709, set. 2016.

KATAJISTO, P. et al. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6232, p. 340–343, 17 abr. 2015.

KESHET, Y.; SEGER, R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 661, p. 3–38, 2010.

KNOBLICH, J. A. Asymmetric cell division during animal development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 11–20, jan. 2001.

- KNOBLICH, J. A. Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 849–860, dez. 2010.
- KRANENBURG, O.; GEBBINK, M. F. B. G.; VOEST, E. E. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, Angiogenesis. v. 1654, n. 1, p. 23–37, 4 mar. 2004.
- KUDO, T. et al. Live-cell measurements of kinase activity in single cells using translocation reporters. **Nature Protocols**, v. 13, n. 1, p. 155–169, jan. 2018.
- KUMAR, S.; DE BOER, R.; VAN DER KLEI, I. J. Yeast cells contain a heterogeneous population of peroxisomes that segregate asymmetrically during cell division. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 3, p. jcs207522, 7 fev. 2018.
- KUNATH, T. et al. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 16, p. 2895–2902, ago. 2007.
- LATHIA, J. D. et al. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. **Cell Death & Disease**, v. 2, p. e200, 1 set. 2011.
- LAUB, M. T.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. Systems biology of Caulobacter. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 429–441, 2007.
- LE ROY, H. et al. Asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor directs the fate of normal and cancer keratinocytes in vitro. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 2, p. 209–220, fev. 2010.
- LEFLOCH, R.; POUYSSÉGUR, J.; LENORMAND, P. Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 5, p. 705–711, 1 mar. 2009.
- LENZ, G. et al. P(2Y) purinoceptor subtypes recruit different MEK activators in astrocytes. **British journal of pharmacology**, v. 129, p. 927–36, 1 abr. 2000.
- LENZ, G. et al. The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer. **Cancer Research**, v. 82, n. 1, p. 3–11, 4 jan. 2022.
- LENZ, L. S. et al. Cancer Cell Fitness Is Dynamic. **Cancer Research**, v. 81, n. 4, p. 1040–1051, 15 fev. 2021.
- LEONARD, A. C.; GRIMWADE, J. E. Chromosome Replication and Segregation. Em: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 493–506.
- LERIT, D. A.; SMYTH, J. T.; RUSAN, N. M. Organelle asymmetry for proper fitness, function, and fate. **Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology**, v. 21, n. 3, p. 271–286, maio 2013.

- LEVRIER, C. et al. 6 α -Acetoxyanopterin: A Novel Structure Class of Mitotic Inhibitor Disrupting Microtubule Dynamics in Prostate Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 1, p. 3–15, jan. 2017.
- LEVRIER, C. et al. Discovery of thalichuberine as a novel antimitotic agent from nature that disrupts microtubule dynamics and induces apoptosis in prostate cancer cells. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 17, n. 5, p. 652–668, 2018.
- LI, Q. et al. Cancer stem cells and cell size: A causal link? **Seminars in cancer biology**, v. 35, p. 191–199, dez. 2015.
- LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 15, p. 3079–3093, ago. 2013.
- LIMAS, J. C.; COOK, J. G. Preparation for DNA replication: the key to a successful S phase. **FEBS Letters**, v. 593, n. 20, p. 2853–2867, 2019.
- LIN, J. et al. The polarity protein Par1b/EMK/MARK2 regulates T cell receptor-induced microtubule-organizing center polarization. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 2, p. 1215–1221, 15 jul. 2009.
- LINDNER, A. B. et al. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 8, p. 3076–3081, 26 fev. 2008.
- LIONETTI, M. C.; FUMAGALLI, M. R.; LA PORTA, C. A. M. Cancer stem cells, plasticity, and drug resistance. **Cancer Drug Resistance (Alhambra, Calif.)**, v. 3, n. 2, p. 140–148, 2020.
- LITTLE, S. E. et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. **Cancer Research**, v. 72, n. 7, p. 1614–1620, 1 abr. 2012.
- LIU, W. et al. Asymmetric segregation of template DNA strands in basal-like human breast cancer cell lines. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 139, 15 nov. 2013.
- LIU, Y. et al. Mitotic polarization of transcription factors during asymmetric division establishes fate of forming cancer cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2424, 21 jun. 2018.
- LOEWER, A. et al. The p53 response in single cells is linearly correlated to the number of DNA breaks without a distinct threshold. **BMC biology**, v. 11, p. 114, 19 nov. 2013.
- LUDFORD-MENTING, M. J. et al. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. **Immunity**, v. 22, n. 6, p. 737–748, jun. 2005.
- MAGNUSON, T. et al. The early lethality of autosomal monosomy in the mouse. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 236, n. 3, p. 353–360, dez. 1985.

MALUMBRES, M. et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1275–1276, nov. 2009.

MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. 122, 30 jun. 2014.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 11, p. 630–641, nov. 2005.

MANNINO, G. et al. Adult stem cell niches for tissue homeostasis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 237, n. 1, p. 239–257, jan. 2022.

MARTINEZ, P. et al. Evolution of Barrett's esophagus through space and time at single-crypt and whole-biopsy levels. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 794, 23 fev. 2018.

MASCAUX, C. et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 1, p. 131–139, 17 jan. 2005.

MCCUBREY, J. A. et al. ROLES OF THE RAF/MEK/ERK PATHWAY IN CELL GROWTH, MALIGNANT TRANSFORMATION AND DRUG RESISTANCE. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1773, n. 8, p. 1263–1284, ago. 2007.

MCFALINE-FIGUEROA, J. R. et al. Mitochondrial quality control during inheritance is associated with lifespan and mother-daughter age asymmetry in budding yeast. **Aging Cell**, v. 10, n. 5, p. 885–895, out. 2011.

MCGRANAHAN, N.; SWANTON, C. Cancer Evolution Constrained by the Immune Microenvironment. **Cell**, v. 170, n. 5, p. 825–827, 24 ago. 2017.

MCINTOSH, J. R. Mitosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 9, p. a023218, 9 jan. 2016.

MIN, M. et al. Temporal integration of mitogen history in mother cells controls proliferation of daughter cells. **Science**, v. 368, n. 6496, p. 1261–1265, 12 jun. 2020.

MIRMAN, Z.; DE LANGE, T. 53BP1: a DSB escort. **Genes & Development**, v. 34, n. 1–2, p. 7–23, 1 jan. 2020.

MOLINA, J. R.; ADJEI, A. A. The Ras/Raf/MAPK Pathway. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 1, n. 1, p. 7–9, 1 jan. 2006.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068–1074, jun. 2006.

MURRAY, A. Cell cycle checkpoints. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 872–876, dez. 1994.

NIK-ZAINAL, S. et al. The Life History of 21 Breast Cancers. **Cell**, v. 149, n. 5, p. 994–1007, 25 maio 2012.

O'BRIEN, C. A. et al. ID1 and ID3 Regulate the Self-Renewal Capacity of Human Colon Cancer-Initiating Cells through p21. **Cancer Cell**, v. 21, n. 6, p. 777–792, 12 jun. 2012.

ORR, H. A. Fitness and its role in evolutionary genetics. **Nature reviews. Genetics**, v. 10, n. 8, p. 531–539, ago. 2009.

OUELLET, J.; BARRAL, Y. Organelle segregation during mitosis: Lessons from asymmetrically dividing cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 3, p. 305–313, 6 fev. 2012.

PAEK, A. L. et al. Cell-to-Cell Variation in p53 Dynamics Leads to Fractional Killing. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 631–642, 21 abr. 2016.

PAJPACH, F.; SHEARWIN-WHYATT, L.; GRÜTZNER, F. Evolution, Expression and Meiotic Behavior of Genes Involved in Chromosome Segregation of Monotremes. **Genes**, v. 12, n. 9, p. 1320, 26 ago. 2021.

PARK, S. Y. et al. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 2, p. 636–644, fev. 2010.

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

PAULSSON, J. Summing up the noise in gene networks. **Nature**, v. 427, n. 6973, p. 415–418, 29 jan. 2004.

PINE, S. R. et al. Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 5, p. 2195–2200, 2 fev. 2010.

PISCO, A. O. et al. Non-Darwinian dynamics in therapy-induced cancer drug resistance. **Nature Communications**, 29 nov. 2013.

POKRASS, M. J. et al. Cell Cycle-Dependent ERK Signaling Dynamics Direct Fate Specification in the Mammalian Preimplantation Embryo. **Developmental cell**, v. 55, n. 3, p. 328–340.e5, 9 nov. 2020.

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

POON, R. Y. C. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. Em: COUTTS, A. S.; WESTON, L. (Eds.). **Cell Cycle Oscillators: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2016. p. 3–19.

PREHODA, K. E. Polarization of Drosophila neuroblasts during asymmetric division. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a001388, ago. 2009.

- RAMÓN Y CAJAL, S. et al. Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 98, n. 2, p. 161–177, 2020.
- REGOT, S. et al. High-Sensitivity Measurements of Multiple Kinase Activities in Live Single Cells. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1724–1734, 19 jun. 2014.
- RELLO-VARONA, S. et al. Preferential killing of tetraploid tumor cells by targeting the mitotic kinesin Eg5. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 7, p. 1030–1035, 1 abr. 2009.
- REYES, J.; LAHAV, G. Leveraging and coping with uncertainty in the response of individual cells to therapy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 51, p. 109–115, jun. 2018.
- ROBINSON, H. M. R. et al. DNA mismatch repair and Chk1-dependent centrosome amplification in response to DNA alkylation damage. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 8, p. 982–992, 15 abr. 2007.
- ROSE, L.; GÖNCZY, P. **Polarity establishment, asymmetric division and segregation of fate determinants in early C. elegans embryos.** [s.l.] WormBook, 2018.
- ROSSI, D. J. et al. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 725–729, 7 jun. 2007.
- ROULOT, A. et al. Tumoral heterogeneity of breast cancer. **Annales De Biologie Clinique**, v. 74, n. 6, p. 653–660, 1 dez. 2016.
- ROUX, J. et al. Fractional killing arises from cell-to-cell variability in overcoming a caspase activity threshold. **Molecular Systems Biology**, v. 11, n. 5, p. 803, 7 maio 2015.
- RYU, H. et al. Frequency modulation of ERK activation dynamics rewires cell fate. **Molecular Systems Biology**, v. 12, n. 4, p. 866, 23 abr. 2016.
- SALDIVAR, J. C. et al. An intrinsic S/G2 checkpoint enforced by ATR. **Science (New York, N.Y.)**, v. 361, n. 6404, p. 806–810, 24 ago. 2018.
- SANSREGRET, L.; SWANTON, C. The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. a028373, jan. 2017.
- SANTORO, A. et al. Molecular mechanisms of asymmetric divisions in mammary stem cells. **EMBO Reports**, v. 17, n. 12, p. 1700–1720, dez. 2016.
- SCHNEIDER, B. P. et al. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8010–8018, 15 dez. 2008.

SEVER-CHRONEOS, Z. et al. Retinoblastoma tumor suppressor protein signals through inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity to disrupt PCNA function in S phase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 12, p. 4032–4045, jun. 2001.

SHAN, Z. et al. Basal condensation of Numb and Pon complex via phase transition during *Drosophila* neuroblast asymmetric division. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 737, 21 fev. 2018.

SHEN, Q. et al. Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. **Development**, v. 129, n. 20, p. 4843–4853, 15 out. 2002.

SIMONS, B. D.; CLEVERS, H. Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues. **Cell**, v. 145, n. 6, p. 851–862, 10 jun. 2011.

SINCLAIR, D. A.; GUARENTE, L. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. **Cell**, v. 91, n. 7, p. 1033–1042, 26 dez. 1997.

SOSA, M. S. et al. NR2F1 controls tumour cell dormancy via SOX9- and RAR β -driven quiescence programmes. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6170, maio 2015.

SPOKOINI, R. et al. Confinement to organelle-associated inclusion structures mediates asymmetric inheritance of aggregated protein in budding yeast. **Cell Reports**, v. 2, n. 4, p. 738–747, 25 out. 2012.

SPRADLING, A.; DRUMMOND-BARBOSA, D.; KAI, T. Stem cells find their niche. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 98–104, 1 nov. 2001.

STAVRIDIS, M. P. et al. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 16, p. 2889–2894, ago. 2007.

STOLZ, A.; ERTYCH, N.; BASTIANS, H. A phenotypic screen identifies microtubule plus end assembly regulators that can function in mitotic spindle orientation. **Cell Cycle**, v. 14, n. 6, p. 827–837, 15 jan. 2015.

SULSTON, J. E. et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 100, n. 1, p. 64–119, nov. 1983.

SURYADINATA, R.; SADOWSKI, M.; SARCEVIC, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. **Bioscience Reports**, v. 30, n. 4, p. 243–255, 17 mar. 2010.

SZERLIP, N. J. et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. 3041–3046, 21 fev. 2012.

TAI, C.-J. et al. Clinical-pathological correlation of K-Ras mutation and ERK phosphorylation in colorectal cancer. **Polish Journal of Pathology: Official Journal of the Polish Society of Pathologists**, v. 63, n. 2, p. 93–100, jun. 2012.

TERSKIKH, V. V.; VOROTELYAK, Y. A.; VASILIEV, A. V. Self-Renewal of Stem Cells. **Acta Naturae**, v. 1, n. 2, p. 61–65, set. 2009.

TORRES, L. et al. Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 102, n. 2, p. 143–155, abr. 2007.

TSE, H. T. K.; WEAVER, W. M.; CARLO, D. D. Increased Asymmetric and Multi-Daughter Cell Division in Mechanically Confined Microenvironments. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38986, 25 jun. 2012.

VASQUEZ-LIMETA, A.; LONCAREK, J. Human centrosome organization and function in interphase and mitosis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 117, p. 30–41, set. 2021.

VON HOFF, D. D. et al. Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 17, p. 8165–8169, 1 set. 1992.

VON LINTIG, F. C. et al. Ras activation in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 62, n. 1, p. 51–62, jul. 2000.

WANG, R. et al. Single-cell dissection of intratumoral heterogeneity and lineage diversity in metastatic gastric adenocarcinoma. **Nature medicine**, v. 27, n. 1, p. 141–151, jan. 2021.

WEINERT, T. A.; HARTWELL, L. H. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4863, p. 317–322, 15 jul. 1988.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, 1 nov. 2013.

XIE, T.; SPRADLING, A. C. A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5490, p. 328–330, 13 out. 2000.

YAMASHITA, Y. M. et al. Polarity in Stem Cell Division: Asymmetric Stem Cell Division in Tissue Homeostasis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, p. a001313, jan. 2010.

YAMASHITA, Y. M.; FULLER, M. T.; JONES, D. L. Signaling in stem cell niches: lessons from the *Drosophila* germline. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 4, p. 665–672, 15 fev. 2005.

YI, S. et al. Functional variomics and network perturbation: connecting genotype to phenotype in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 395–410, jul. 2017.

YUAN, S.; NORGDARD, R. J.; STANGER, B. Z. Cellular Plasticity in Cancer. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 7, p. 837–851, jul. 2019.

ZHANG, S. et al. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. **Oncogene**, v. 33, n. 1, p. 116–128, 2 jan. 2014.

ZHOU, W. et al. Stochasticity and robustness analysis of microRNA-mediated ERK signaling network. **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, p. 318–326, out. 2018.

CURRÍCULO VITAE resumido**BUSS, J.H.****1. DADOS PESSOAIS:****Nome:** Julieti Huch Buss**Local e data de nascimento:** Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 01/01/1993.**Endereço profissional:** Instituto de Biociências - Dep. Biofísica - Prédio 43431 - Sala 115, Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Bloco IV, Bairro Agronomia, Porto Alegre, 91501-970, Brasil**Telefone:** (55) 99623 3567**E-mail:** julietibuss@hotmail.com**CV:** <http://lattes.cnpq.br/0685403829852686>**2. FORMAÇÃO:****2018-2023:** Doutorado em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Guido Lenz. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);**2013-2018:** Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.**3. ESTÁGIOS:****2018-2023:** Aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Orientação: Guido Lenz. Principais atividades desenvolvidas: cultura de células, clonagem de vetor plasmidial, transduções lentivirais, tracking de células únicas e co-orientação de alunos de Iniciação Científica. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

2013-2018: Bolsista de Iniciação Científica no grupo de pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), atuando na realização de triagens de compostos com possíveis efeitos antitumorais. Principais atividades desenvolvidas: Cultivo de células e realização de ensaios básicos de biologia celular/molecular. Tradução e discussão dos resultados obtidos em apresentações para a comunidade acadêmica, participando de eventos nacionais/internacionais. Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS (FAPERGS);

2012-2013: Bolsista de Iniciação Científica no Projeto Xisto Agrícola - Embrapa Clima Temperado, exercendo atividades no laboratório de Biologia Molecular. Principais atividades desenvolvidas: Técnicas básicas de Biologia Molecular, como: extração de DNA/RNA, eletroforese, PCR e PCR em tempo real, buscando avaliar alterações moleculares em cultivares submetidas a diferentes perfis de estresse; Desenvolvimento de racional científico, análise e interpretação de dados biológicos; Tradução dos resultados obtidos em apresentações em eventos, a fim de divulgar os dados à comunidade científica. Financiamento: Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS (FAPERGS).

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES:

Trabalho Destaque na sessão de Ciências Biológicas no XXV Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas. Universidade Federal de Pelotas, 2016,

Prêmio em sua sessão pelo trabalho apresentado intitulado: efeito antineoplásico e sinérgico de pirazóis e doxorubicina em linhagem de câncer de mama triplo negativo. Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas, 2015.

Atividade antitumoral da própolis vermelha brasileira em linhagem celular de câncer de bexiga. Universidade Federal de Pelotas, 2013.

Trabalho Destaque na sessão de Ciências Biológicas no XXII Congresso de Iniciação Científica. Universidade Federal de Pelotas, 2013.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS:

BUSS, Julieti Huch; LENZ, Luana Suéling; PEREIRA, Luiza Cherobini; *et al.* The role of mitosis in generating fitness heterogeneity. **Journal of Cell Science**, v. 136, n. 1, p. jcs260103, 2023.

LENZ, Guido; ONZI, Giovana R.; LENZ, Luana S.; *et al.* The Origins of Phenotypic Heterogeneity in Cancer. **Cancer Research**, v. 82, n. 1, p. 3–11, 2022.

LENZ, Luana S.; FACCIONI, Juliano L.; BRACCO, Paula A.; *et al.* Cancer Cell Fitness Is Dynamic. **Cancer Research**, v. 81, n. 4, p. 1040–1051, 2021.

QUOOS, Natália ; DORNELLES, Luciano ; BUSS, Julieti; *et al.* Evaluation of 5'-Arylchalcogenyl-3-(phenylselanyl-triazoyl)-thymidine. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 1, p. 324–329, 2020.

BRUINSMANN, Franciele Aline; BUSS, Julieti H; *et al.* Erlotinib-Loaded Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocapsules Improve In Vitro Cytotoxicity and Anticlonogenic Effects on Human A549 Lung Cancer Cells, **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 6, p. 229, 2020.

BUSS, Julieti Huch *et al.* Lapatinib-Loaded Nanocapsules Enhances Antitumoral Effect in Human Bladder Cancer Cell, **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2019.

ONZI, Giovana Ravizzoni; FACCIONI, Juliano Luiz; PEREIRA, Luiza Cherobini; THOMÉ, Marcos Paulo; BERTONI, Ana Paula Santin; BUSS, Julieti Huch; *et al.* Adipose-derived stromal cell secretome disrupts autophagy in glioblastoma. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 97, n. 10, p. 1491–1506, 2019.

BUSS, Julieti Huch; *et al.* Nano-BCG: A Promising Delivery System for Treatment of Human Bladder Cancer, **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2018.

AUERESSIG, Silvia; TESSMANN, Josiane; MASTELARI, Rosiane; PEREIRA, Liziane; BUSS, Julieti; *et al.* Synergistic effect of pyrazoles derivatives and doxorubicin in claudin-low breast cancer subtype. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 390–398, 2018.

BEGNINI, Karine Rech; DUARTE, Wladimir; PEREIRA, Liziane; BUSS, Julieti H; *et al*, Apoptosis induction by 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides in triple negative breast cancer cells, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 510–516, 2017.

FONSECA, Sergio F; PADILHA, Nathalia; THUROW, Samuel; ROEHRS, Juliano; LAVEGNAGO, Lucielli; SOUZA, Maurice; FRONZA, Mariana; COLLARES, Tiago; BUSS, Julieti; *et al*. Ultrasound-promoted copper-catalyzed synthesis of bis-arylselanyl chrysin derivatives with boosted antioxidant and anticancer activities, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, p. 827–836, 2017.

TESSMANN, Josiane Weber; BUSS, Julieti; *et al*. Antitumor potential of 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-1 H -pyrazoles in human bladder cancer cells. **BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY**, v. 94, p. 37-46, 2017.

SCHULTZE, Eduarda; BUSS, Julieti. *et al*, Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcome the triple-negative breast cancer cell resistance to tretinoin and show synergistic effect on cytotoxicity induced by doxorubicin and 5-fluororacil, **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 96, p. 404–409, 2017.

SCHULTZE, Eduarda; CORADINI, Karine; CHAVES, Paula; PEREIRA, Liziane; BUSS, Julieti; *et al*. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules overcome the triple-negative breast cancer cell resistance to tretinoin and show synergistic effect on cytotoxicity induced by doxorubicin and 5-fluororacil, **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 404–409, 2017.

BEGNINI, Karine; BUSS, Julieti; *et al*. Recombinant Mycobacterium bovis BCG for immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 9, p. 3741–3754, 2015.

BOROWSKI, Joyce Moura; GALLI, Vanessa; MESSIAS, Rafael; PERIN, Ellen; BUSS, Julieti; *et al*. Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses, **Planta**, v. 239, n. 6, p. 1187–1200, 2014.

MESSIAS, Rafael da Silva; GALLI, Vanessa; BUSS, Julieti; *et al*. Isolation of high-quality RNA from grains of different maize varieties, **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697–707, 2014.