UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Genética

ANDRESSA GOIS MORALES

EFEITOS DA INIBIÇÃO DE GENES ASSOCIADOS
AO CONTROLE DO CICLO CELULAR
EM GLIOBLASTOMA

Ribeirão Preto – SP
2012

ANDRESSA GOIS MORALES

**EFEITOS DA INIBIÇÃO DE GENES ASSOCIADOS AO
CONTROLE DO CICLO CELULAR EM GLIOBLASTOMA**

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de concentração: Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz
Gonzaga Tone.

CO-ORIENTADORA: Dra. María
Sol Brassesco Annichini.

**Ribeirão Preto
2012**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Morales, Andressa Gois

Efeitos da inibição de genes associados ao controle do ciclo celular em glioblastoma. Ribeirão Preto, 2012.

109f: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Co-orientadora: Dra. Maria Sol Brassesco Anichinni

1. Genes da família *BUB* 2. Glioblastoma 3. Ciclo celular 4. RNA de interferência

Folha de Aprovação

Andressa Gois Morales

Efeitos da inibição de genes associados ao controle do ciclo celular em glioblastoma

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a minha querida mãe Dirce,
meu amoroso pai Osvaldo (in memoriam),
minhas amigas e irmãs: Aracelis e
Angélica, por serem a base de minha
formação e por me apoiarem
incondicionalmente.*

À **Deus**, pela infinita sabedoria.333333

À **FMRP** e ao **Departamento de Genética** que permitiram a realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estudo no primeiro ano do doutorado.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa (FAPESP)** pela concessão da bolsa nos demais anos do doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Luiz Gonzaga Tone**, exemplo de profissional justo e dedicado, agradeço pela paciência e pela sabedoria, que sem as quais não seria possível o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por ter me ensinado coisas que vão além da bancada.

À minha co-orientadora Dra. **Maria Sol Brassesco Annichini** pela amizade e pelas excelentes contribuições científicas que foram fundamentais para o norteamento de meu trabalho e que contribuíram para meu crescimento tanto profissional quanto pessoal.

Ao Prof. Dr. **Carlos Alberto Scrideli**, pelas discussões e pelo auxílio na análise estatística desta tese.

Ao Coordenador do curso de pós-graduação do Departamento de Genética, Prof. Dr. **Ademilson Espencer Egea Soares** pelo auxílio e convívio em todo o doutorado.

À Dra. **Rosane Gomes de Paula Queiroz**, pelo apoio fundamental dado em todo o período deste trabalho, por estar sempre disposta a ajudar e por fazer o laboratório um ambiente mais harmônico e agradável de trabalhar.

À técnica do laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Puericultura e Pediatria **Veridiana Kill Suazo** pelo apoio e incentivo constante.

À **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)** pelo auxílio financeiro;

À minha querida amiga **Julia A. Pezuk**, por estar sempre ao meu lado. Amiga de experimentos, de estatísticas, de baladas, de viagens e de barzinhos. Muito obrigada por participar e compartilhar tantos momentos de minha vida.

À minha amiga **Jaqueline Carvalho de Oliveira** agradeço pelo imenso companheirismo e amizade. Você fez o ambiente de trabalho ser mais sereno e me ensinou a ser mais profissional, mais calma (apesar de não parecer) e mais positiva.

À amiga e colega de laboratório **Priscila Manzini** por me escutar e ajudar em tantos assuntos “extras” laboratoriais.

Aos meus amigos de trabalho, **Augusto, Daniel, Fernanda, Guilherme, Gustavo, Kleiton, Mauricio, Paola, Régia e Vanessa** por fazerem o laboratório um ambiente agradável. Agradeço pelas discussões científicas e pelas não tão científicas assim. Com certeza irei sentir falta de nossas reuniões no café.

Às técnicas do laboratório de Citogenética do Departamento de Puericultura e Pediatria **Aide Barbosa, Sônia Scandusi, Maria Luisa Machado e Lucimar Fernandes** pela ajuda e convivência durante estes anos.

À Profa. Dra. **Elza Tiemi Sakamoto Hojo** e a aluna de doutorado **Ana Paula Lima Montaldi** pela colaboração para execução desta tese.

Às secretarias do Departamento de Genética **Susie Adriana Penha Nalon, Maria Aparecida Oliveira Silva Elias e Silvia Santanna Consiglieri** e a secretária do Laboratório de Puericultura e Pediatria **Evelise Visconte**, pelo apoio prestado durante todo o doutorado.

À minha amiga e ex-companheira de laboratório **Maria Angélica Abdalla de Freitas Cortez**, por fazer meu começo no doutorado mais animador.

Às amigas e companheiras de casa **Andréia de Araujo Almeida, Joyce Izidoro da Silva e Juliana Dassoler**, por fazerem minha estadia em Ribeirão Preto mais agradável.

Aos amigos do **Laboratório de Genética do Desenvolvimento** (IB/USP) que me ajudaram e me incentivaram no período final deste trabalho.

Aos amigos **Ana Rita, Adriane (Feijão), Gislaine e Ribers**, pelos momentos de descontração e alegria.

À minha grande amiga **Carol** que sempre me apoiou e me aconselhou, deixando claro o quanto é minha amiga.

Ao **João Henrique (Biju)**, por fazer parte de todos os momentos de minha vida, me incentivando e me apoiando em momentos difíceis, tornando-os mais fáceis e agradáveis de serem vividos. Agradeço a Deus por tê-lo colocado no meu caminho.

Agradeço principalmente ao meu pai e meu anjo **Oswaldo** (*in memoriam*), que enquanto comigo me ensinou o verdadeiro valor da vida e que mesmo distante sempre estará ao meu lado, a minha mãe **Dirce**, que me ensinou a importância do estudo, as minhas irmãs **Angélica e Aracelis** que sempre me incentivaram e acreditam em mim. Meu muito obrigado a todas vocês pelo eterno amor, carinho, incentivo em mim depositado e que sem eles eu não conseguiria chegar até aqui.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“A sabedoria de um ser humano não está no quanto tem consciência de que sabe, mas do quanto tem consciência de que não sabe. A consciência da própria ignorância é o primeiro passo em direção à sabedoria.”

Augusto Cury

Morales, AG **Efeitos da inibição de genes associados ao controle do ciclo celular em glioblastoma**. 2012, 109f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Os tumores astrocíticos são originados a partir dos astrócitos e classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde em astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma subependimal de células gigantes (grau I), xantoastrocitoma pleomórfico (grau II), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (GBM) (grau IV). Este último é o tumor cerebral mais frequente em adultos, possuindo uns dos piores prognósticos, devido principalmente à radioresistência do tumor, com uma sobrevida média de 14 meses. Vários estudos têm procurado encontrar novos alvos terapêuticos e os genes da família *BUB* são candidatos promissores, devido ao seu papel no controle do ciclo celular. Estes genes participam do mecanismo do ponto de checagem do fuso mitótico, prevenindo a separação prematura das cromátides irmãs. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão de *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* em amostras de pacientes portadores de gliomas de baixo grau (I e II) e glioblastoma, relacionar as expressões destes genes à sobrevida e estudar os efeitos da inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1*, por RNAi, na linhagem pediátrica SF188. Nossos resultados mostraram que tanto *BUB1* quanto *BUBR1* foram hiperexpressos nos glioblastomas e nos gliomas de baixo grau em relação à substância branca ($p<0,05$). A análise da expressão destes genes em amostras de glioblastomas em relação a amostras de grau I e II demonstrou uma hiperexpressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* e uma hipoexpressão do *BUB3* em glioblastoma ($p<0,05$). Em relação à sobrevida, os baixos níveis de expressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* foram relacionados a uma melhor sobrevida quando analisado o total de todos os pacientes. Paralelamente, a inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* na linhagem SF188 resultou em uma diminuição da proliferação e também da capacidade clonogênica, além de um aumento na apoptose quando combinado com temozolomida (TMZ). Também foram realizados experimentos com inibições dos genes com ou sem a presença de irradiação. Esta combinação resultou em uma diminuição tanto da proliferação quanto da capacidade clonogênica. Estes resultados sugerem que o *BUB1* e o *BUBR1* podem ser considerados alvos

interessantes para o tratamento de glioblastoma, porém estudos adicionais são necessários para confirmar tal potencial.

Palavras-chave: Genes do *checkpoint* mitótico, glioblastoma, ciclo celular, RNA de interferência.

Morales, AG **Cell-Cycle Genes Inhibition Effects In Glioblastoma**. 2012, 109f.
Doctor's degree Thesis – Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Astrocytic tumors are originated from astrocytes and classified according to the World Health Organization into pilocytic astrocytoma (grade I), subependymal giant cell astrocytoma (grade I), pleomorphic xanthoastrocytoma (grade II), diffuse astrocytoma (grade II), anaplastic astrocytoma (grade III) and Glioblastoma (GBM) (grade IV). Glioblastoma is the most common brain tumor in adults with a very poor prognosis and a median survival of 14 months. Because their role in cell cycle control, several authors have previously ponited the BUB gene family as new therapeutic target candidates. These genes participate in the mitotic checkpoint by preventing the premature separation of sister chromatids. The aims of this study were to study the expression of *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* in samples of patients with low-grade gliomas (I and II) and glioblastoma, evaluate any association of gene expression with patient survival and analyze BUB1 e BUBR1 inhibition (by iRNA) effects, on SF188, a pediatric cell line. BUB1 and BUBR1 were found hyperexpressed in glioblastoma samples and in low-grade gliomas when compared with white matter samples ($p<0.05$). The analysis of the expression of these genes in glioblastoma samples compared with grade I and II samples showed a hyperexpression of *BUB1* and *BUBR1*, while *BUB3* was hipoexpressed in glioblastoma ($p<0.05$). In the survival analysis, the hipoexpression of BUB1 and BUBR1 genes were related with a better survival when all patients were considered. The *BUB1* and *BUBR1* inhibition resulted in decreased proliferation and colony formation, along with increased apoptosis when combined with temozolomide. Experiments with the inhibition of genes also were performed in association with irradiation. This combination demonstrated decreased proliferation and colony formation. Our results suggest that BUB1 and BUBR1 might be interesting targets for future treatment of glioblastoma, nonetheless further studies are necessary to confirm this potencial.

Keywords: Mitotic checkpoint genes, glioblastoma, cell cycle, interference RNA

Figura 1 – Esquema simplificado demonstrando cinetocoros não ligados aos microtúbulos.....	33
Figura 2 – Ilustração demonstrando as funções do ponto de checagem do fuso mitótico.	34
Figura 3 – Análise da eficiência do silenciamento dos genes <i>BUBR1</i> e <i>BUB1</i> com siRNAs específicos por PCR em tempo real.....	45
Figura 4 – Western blotting demonstrando a eficiência do silenciamento gênico..	46
Figura 5 – Exemplos de células binucleadas	51
Figura 6 – Comparação da expressão relativa dos genes <i>BUB1</i> , <i>BUB3</i> e <i>BUBR1</i> em amostras de substância branca, em amostras de pacientes portadores de gliomas de baixo grau, e em amostras de pacientes com glioblastoma	56
Figura 7 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUB1</i> para os pacientes como um todo	59
Figura 8 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUB1</i> para pacientes com gliomas de grau I e II.	60
Figura 9 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUB1</i> para pacientes com glioblastoma	61
Figura 10 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUB3</i> para os pacientes como um todo.	62
Figura 11 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUB3</i> para pacientes com gliomas de grau I e II.	63

Figura 12 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUB3</i> para pacientes com glioblastoma	64
Figura 13 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUBR1</i> para os pacientes como um todo.....	65
Figura 14 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUBR1</i> para pacientes com gliomas de grau I e II.	66
Figura 15 – Sobrevida livre de eventos de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene <i>BUBR1</i> para pacientes com glioblastoma	67
Figura 16 – Expressão relativa dos genes <i>BUB1</i> , <i>BUB3</i> e <i>BUBR1</i> em linhagens de gliomas.	68
Figura 17 – Esquema demonstrando os experimentos realizados para cada tratamento (inibição, inibição + TMZ e inibição + irradiação)	69
Figura 18 – Porcentagem de células viáveis na linhagem celular SF188 após os tratamentos de inibição com ou sem TMZ.....	71
Figura 19 – Análise da proliferação celular na linhagem celular SF188 após os tratamentos de inibição acoplados ou não a TMZ.....	73
Figura 20 – Fração de sobrevivência em SF188 após os tratamentos de inibição com ou sem TMZ.	75
Figura 21 – Efeito da inibição dos genes com ou sem TMZ nas fases do ciclo celular na linhagem celular SF188	77
Figura 22 – Porcentagem de células em apoptose em SF188 após os diversos tratamentos	78

Figura 23 – Porcentagem de células em divisão celular na linhagem celular SF188 após a inibição dos genes <i>BUBR1</i> e <i>BUB1</i>	80
Figura 24 – Porcentagem de células que apresentam atipia celular e cromossômica em SF188 nos diferentes tratamentos..	81
Figura 25 – Exemplos de atipias cromossômicas.	82
Figura 26 – Exemplos de atipias celulares	83
Figura 27 – Análise de proliferação celular em SF188 após o tratamento da inibição com ou não irradiação.	84
Figura 28 – Análise da proliferação celular em SF188 nos tratamentos com 2 Gy e com 4 Gy.	85
Figura 29 - Capacidade clonogênia em SF188, nos tratamentos com inibição dos genes <i>BUB1</i> e <i>BUBR1</i> com ou sem irradiação de 2 e 4 Gy.....	86
Figura 30 – Análise da capacidade clonogênia na linhagem SF188 nos tratamentos com 2 Gy e com 4 Gy.	87
Figura 31 – Fração de Sobrevivência dos tratamentos após a irradiação de 2Gy e 4Gy	87

Tabela I – Índice médio de proliferação das diferentes linhagens tratadas com Temozolomida em relação ao controle sem tratamento	43
Tabela II – Correlação entre os valores das expressões dos genes <i>BUB1</i> , <i>BUB3</i> e <i>BUBR1</i>	57
Tabela III – Análise multivariada utilizando o Modelo de Cox para a expressão do gene <i>BUB1</i> em associação com subtipo histológico	58
Tabela IV – Análise multivariada utilizando o Modelo de Cox para a expressão do gene <i>BUBR1</i> em associação com subtipo histológico.....	58
Tabela V – Porcentagem de proliferação celular em SF188 após os tratamentos de inibição com ou sem TMZ.	72
Tabela VI – Porcentagem de colônias na linhagem SF188 após a inibição dos genes <i>BUBR1</i> e <i>BUB1</i> associados ou não a TMZ.....	74
Tabela VII – Porcentagem de células em G1, em SF188 nos diversos tratamentos.	76
Tabela VIII – Porcentagem de células na fase S, em SF188 nos diversos tratamentos	76
Tabela IX – Porcentagem de células em G2/M, na linhagem celular de glioblastoma SF188 nos diferentes tratamentos.....	76
Tabela X – Porcentagem de micronúcleo encontradas em na linhagem celular SF188 após a inibição dos genes <i>BUB1</i> e <i>BUBR1</i>	79
Tabela XI – Porcentagem de proliferação celular em SF188 em diferentes tratamentos com ou sem irradiação.....	84
Tabela XII – Porcentagem de colônias na linhagem SF188 em diferentes tratamentos com ou sem irradiação.....	85
Tabela XIII – Efeitos da inibição do <i>BUB1</i> e <i>BUBR1</i> na taxa de reforço de doses na linhagem SF188..	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>One Way Repeated Measures Analysis of Variance</i>
APC/C	Complexo Promotor de Anáfase
BN	Binucleada
BUB1	<i>Budding Uninhibited by Benzimidazole 1</i>
BUB3	<i>Budding Uninhibited by Benzimidazoles 3 Homolog</i>
BUBR1	<i>Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 Homolog Beta</i>
CDC20	<i>Cell Division Cycle 20 Homolog</i>
CDK1	<i>Cyclin-Dependent</i> quinase 1
cDNA	DNA complementar
CENPE	<i>Centromere Protein E</i>
CHK1	<i>Checkpoint</i> quinase 1
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECL	Electron coupling labeling
EGFR	Receptor do Fator do Crescimento Epidérmico
EP	Eficiência de plaqueamento
FACs	Separador de células ativadas por fluorescência
FITC	<i>Fluorescein reactive isothiocyanate form</i>
FS	Fração de Sobrevida
G1	<i>Gap</i> 1 (fase do ciclo celular)
G2	<i>Gap</i> 2 (fase do ciclo celular)
GBM	Glioblastoma
Gy	Gray
HC-FMRP	Hostipal das Clínicas- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HPRT	<i>Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase</i>
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2

M	Mitose (fase do ciclo celular)
MAD1	Mitotic arrest deficient-like 1
MAD2	Mitotic arrest deficient 2-like protein 1
MCC	Complexo do <i>checkpoint</i> mitótico
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MPS-1	Monopolar Spindle 1
mRNA	RNA mensageiro
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína 53
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídeo
PINK1	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PLK1	<i>Polo-like kinase 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>Real Time quantitative reverse transcription PCR</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
Rpm	Rotação por minuto
RRM2	Ribonucleotide reductase M2
S	Síntese (fase do ciclo celular)
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
SB	Substância branca
SBF	Soro bovino fetal
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLE	Sobrevida livre de eventos

SNC	Sistema nervoso central
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline- tween</i>
TMZ	Temozolomida
TRD	Taxa do reforço de dose
U	Unidade
USP	Universidade de São Paulo
XTT	<i>Sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
°C	Grau centígrado

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	29
1.2. TUMORES ASTROCÍTICOS	30
1.3. INSTABILIDADE GENÔMICA.....	32
1.4. FATORES ENVOLVIDOS NA CHECAGEM DO FUSO MITÓTICO	32
1.4.1. Família BUB	34
1.4.1.1. Alterações na expressão gênica e carcinogênese	36
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1. LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	41
3.2. AMOSTRAS	41
3.3. TRATAMENTO DE CULTIVOS COM TEMOZOLOMIDA	42
3.4. RNA DE INTERFERÊNCIA (RNAi)	44
3.5. EXTRAÇÃO DE RNA E PROTEÍNAS E qRT-PCR.....	46
3.6. WESTERN BLOTTING.....	47
3.7. TESTES FUNCIONAIS	48
3.7.1. Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método de Exclusão de Azul de Tripan	48
3.7.2. Ensaio de Proliferação Celular	48
3.7.3. Ensaio de Apoptose (Anexina V Marcada com FITC)	49
3.7.4. Avaliação do Ciclo Celular	49
3.7.5. Sobrevivência Clonogênica.....	49
3.7.6. Índice Mitótico.....	50
3.7.7. Atipia Celular e Cromossômica	50
3.7.8. Micronúcleo	51
3.7.9. Ensaio Funcionais após a Irradiação das Células	52
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1. EXPRESSÃO DOS GENES BUB1, BUB3 E BUBR1 EM PACIENTES.	55
4.2. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	57
4.3. EXPRESSÃO DOS GENES BUB1, BUB3 E BUBR1 EM LINHAGENS CELULARES.....	68
4.4. TESTES FUNCIONAIS	68
4.4.1. Viabilidade Celular	70
4.4.2. Proliferação Celular.....	72
4.4.3. Capacidade Clonogênica	74
4.4.4. Ciclo Celular	75
4.4.5. Apoptose	78
4.4.6. Micronúcleo	79
4.4.7. Índice Mitótico.....	79
4.4.8. Atipia Celular e Cromossômica	81
4.4.9. Efeitos da Irradiação na Capacidade Clonogênica e na Proliferação Celular	83

5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÕES.....	96
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores do sistema nervoso central

As neoplasias malignas do sistema nervoso central (SNC) são os tumores sólidos mais frequentes em crianças, apresentando entre os anos 2004-2008 nos Estados Unidos, taxa de incidência de 5.05 por 100.000 pessoas, em crianças de 0-19 anos e de 25.86 por 100.000 pessoas, em adultos (acima de 20 anos), (Babcock et al., 2008; CBTRUS, 2012).

Estas neoplasias representam 2% de todos os tipos de neoplasias, porém apresentam uma taxa desproporcional de morbidade e de mortalidade (Buckner et al., 2007). A incidência anual é de 14,8 por 100.000 pessoas, sendo que aproximadamente metade destas é de baixo grau. Entretanto, mesmo benigno, se não for favorável à excisão e a radioterapia, o câncer pode ser fatal, devido ao progressivo crescimento no espaço limitado do crânio (Jemal et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os diferentes tipos de tumor podem ser classificados em diferentes graus, partindo do grau I (benigno) ao grau IV (maligno) (Kleihues et al., 2007b). Esta classificação prediz o comportamento biológico do tumor, estima o grau de severidade do mesmo, reflete o prognóstico do paciente e influencia na escolha terapêutica (Kleihues et al., 2002; Kleihues et al., 2007b).

Tumores de grau I, em geral, apresentam baixo índice de proliferação e há possibilidade de cura após ressecção cirúrgica. Os astrocitomas pilocíticos e meningiomas são exemplos típicos desta classe. Neoplasias de grau II possuem baixa atividade mitótica, mas tendência à recorrência. Exemplos clássicos são os ependimomas e astrocitomas grau II. Os tumores de grau III, como os astrocitomas anaplásicos, apresentam evidências histológicas de anaplasia, geralmente na forma de aumento da atividade mitótica, aumento de celularidade e pleomorfismo nuclear. Por fim, a classificação grau IV é atribuída a neoplasias malignas com alta atividade mitótica, propensas à necrose e associadas a uma rápida evolução pré- e pós-operatória da doença (Reifenberger et al., 2006; Kleihues et al., 2007b).

1.2. Tumores astrocíticos

Os tumores astrocíticos representam 60% de todas as neoplasias gliais, originam-se a partir de astrócitos e são classificados conforme as características morfológicas e de proliferação celular observadas no tecido. De acordo com a OMS, são subdivididos em quatro grupos: astrocitoma pilocítico (grau I), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV).

O astrocitoma pilocítico, pertencente ao grau I, ocorre predominantemente em crianças, geralmente de origem cerebelar e apresenta comportamento benigno (Louis et al., 2007; Tchoghandjian et al., 2009). Apesar de benigno, nem sempre apresenta bons resultados, sendo que 10% a 20% dos casos podem apresentar progressão da doença (Arsen, et al. 2006).

O tratamento deste tipo de câncer é realizado através da ressecção cirúrgica, sendo que se a ressecção do tumor for completa, nenhuma outra terapia adjunta é recomendada. (Bristol, 2009).

O glioblastoma (GBM) é o mais comum e agressivo dos tumores gliais em adultos. Apesar de ser encontrado em qualquer faixa etária, o glioblastoma afeta principalmente homens com mais de 40 anos sendo pouco frequente em crianças. A taxa anual de incidência é de 2-3 novos casos por 100.000 pessoas e atinge seu pico de incidência entre indivíduos de 50-70 anos, possuindo tempo médio de sobrevida de 14 meses. O glioblastoma geralmente é encontrado nos hemisférios cerebrais e, devido ao seu crescimento rápido, os primeiros sintomas são decorrentes do aumento da pressão intracraniana. Pacientes com este tipo de neoplasia apresentam frequentemente dores de cabeça, convulsões, perda de memória e alterações de comportamento (Stupp, et al., 2005; Reifenberger et al., 2006; Brandes et al., 2008).

O GBM apresenta características histopatológicas como atipia nuclear, atividade mitótica proeminente, proliferação microvascular e/ou necrose, podendo surgir em decorrência do desenvolvimento através da progressão de tumores de baixo grau, pela acumulação de alterações moleculares, sendo assim denominado glioblastoma secundário ou então pode ser diagnosticado primariamente, sendo denominado glioblastoma primário ou *de novo*,

correspondendo a mais de 90% dos casos (Reifenberger et. al., 2006;; Kleihues et al. 2007a; Ohgaki, Kleihues, 2007; Brandes et al., 2008; Tran, Rosenthal, 2010).

Essa separação entre glioblastoma primário e secundário não possui repercussão prática com relação ao tratamento e nem evidencia uma diferença histológica, porém possuem diferenças genéticas marcantes. Amplificações do receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*) e mutações no gene *PTEN* são alterações típicas de glioblastoma primário. Por outro lado, mutações nas enzimas isocitrato desidrogenase (*IDH1* e *IDH2*) possui um importante papel no início da patogênese do glioblastoma secundário (Kleihues et al. 2007a; Parson et al., 2008; Ohgaki, Kleihues, 2009; Brennan, 2011).

O tratamento do glioblastoma inclui cirurgia, radiação e quimioterapia com a droga temozolomida (Khasraw, Lassman, 2010; Tran, Rosenthal, 2010; Clarke et al. 2010). A falta de delimitação anatômica bem como a heterogenidade celular e genética presente no glioblastoma o torna um dos tumores cerebrais mais difíceis de tratar. (Kleihues, Ohgaki, 2000; Grant et al., 2004; Stark et al., 2005; Louis et al., 2007; Ohgaki, Kleihues, 2007).

Ao contrário do glioblastoma adulto, os mecanismos de tumorigênese do glioblastoma em crianças são pouco conhecidos. É sabido que existem grandes diferenças genéticas entre glioblastoma pediátrico e adulto. Além disso, os tumores pediátricos são particularmente difíceis de serem tratados e não há uma terapia efetiva com quimioterápico para o tratamento pediátrico. Assim, tratamentos para pacientes adultos não podem simplesmente serem extrapolados para tratamentos em crianças, sendo necessária mais investigação sobre a biologia de glioma pediátrico de alto grau (Reddy, Wellons 2003; Paugh et al., 2010; Faria et al., 2010; Bax et al., 2009; MacDonald et al., 2011).

1.3. Instabilidade genômica

O processo de carcinogênese é decorrente de uma série de alterações que provoca descontrole em etapas importantes do ciclo celular, afetando principalmente a diferenciação, a proliferação e a morte celular (Hanahan, Weinberg, 2000). Estas alterações podem gerar variabilidade dentro de uma população celular e possibilitar seleção, assim, qualquer evento que desencadeie vantagem seletiva para as células cancerosas, pode acelerar o desenvolvimento e a progressão da neoplasia (Beckman, Loeb, 2005; Geigl et al., 2008). O termo instabilidade genômica refere-se a este aumento na taxa de mutações que ocorre em uma célula e pode surgir como consequência de alterações em processos que mantêm a integridade do genoma (Lengauer et al., 1998).

A instabilidade genômica é representada principalmente pela instabilidade microsatélite e pela instabilidade cromossômica. A instabilidade microsatélite pode ser decorrente da inativação de genes de reparo do DNA e alterações no padrão de metilação do DNA, enquanto a instabilidade cromossômica normalmente resulta de alterações em proteínas que atuam principalmente no controle do ponto de checagem do fuso mitótico (Beckman, Loeb, 2005; Weaver, Cleveland, 2006; Finkel et al., 2007).

1.4. Fatores envolvidos na checagem do fuso mitótico

As células eucarióticas possuem mecanismos de controle, denominados pontos de checagem ou *checkpoints*, que asseguram uma correta execução dos eventos do ciclo celular, garantindo desta forma a manutenção da estabilidade genética (Lopes, Sunkel, 2003; Weaver, Cleveland, 2006).

O ponto de checagem consiste em um mecanismo de controle que monitora a execução de um processo e bloqueia o início do evento subsequente até o anterior ser realizado com sucesso. Em geral, os pontos de checagem compartilham uma estrutura em comum contendo três componentes essenciais: um sensor que monitora o processo; um transdutor que transmite um sinal quando o processo não foi corretamente concluído, e um alvo que irá responder nos eventos posteriores (Hoeijmakers et al., 2001).

Atualmente, três pontos de checagem têm sido amplamente relatados: o de dano ao DNA, que é capaz de bloquear a progressão do ciclo nas fases G1, S e G2 ou mesmo a mitose, o de replicação do material genético, que monitora a progressão através da fase S e o ponto de checagem do fuso mitótico (em inglês *spindle assembly checkpoint* - SAC) (Hoeijmakers et al., 2001; Canman et al., 2001). Os pontos de checagem garantem que estes processos vitais, como a divisão celular, replicação do DNA e segregação cromossômica sejam precisamente coordenados (Marchetti, Venkatachalam, 2010).

O ponto de checagem do fuso mitótico é considerado um dos principais mecanismos envolvidos no controle do ciclo celular. O mesmo consiste em uma cascata de sinalização que previne a separação prematura das cromátides irmãs, retardando a entrada da célula na anáfase até todos os cromossomos estarem ligados corretamente, impedindo assim, uma segregação cromossômica desigual (figura 1) (Musacchio, Hardwick, 2002; May, Hardwick, 2006; Suijkerbuijk, Kops, 2008, Silva et al., 2011).

Figura 1 – Esquema simplificado demonstrando que cinetocoros não ligados aos microtúbulos emitem sinais que é transmitido pela maquinaria mitótica e inibe o início da anáfase, ativando assim o ponto de checagem do fuso mitótico. Adaptado de Musacchio e Hardwick, 2002.

1.4.1.Família BUB

Em 1991, dois estudos independentes identificaram em *Saccharomyces cerevisiae*, proteínas envolvidas no ponto de checagem do fuso mitótico: proteínas da família BUB (*budding uninhibited by benzimidazole*), BUB1 e BUB3 e da família MAD (*mitotic arrest deficient*), MAD1, MAD2 e MAD3 (BUBR1 em humanos; também conhecida como BUB1B) (Hoyt et al., 1991; Li, Murray, 1991).

As proteínas BUBs estão localizadas do lado externo dos cinetocoros, e se acumulam, no começo da prometáfase, nos cinetocoros não ligados aos microtubulos (May, Hardwick, 2006; Suijkerbuijk, Kops, 2008). Nestes cinetocoros, estas proteínas desencadeiam a inibição da proteína Cdc20, impedindo-a de ativar o complexo promotor de anáfase/ciclosomo (APC/C) (figura 2A) (Wang et al., 2008).

Figura 2 – Ilustração demonstrando as funções do ponto de checagem do fuso mitótico. **A-** Cinetocoro não ligado ao microtúbulo ativa o ponto de checagem do fuso mitótico, que por sua vez inativa o APC/C. **B-** Inativação do ponto de checagem ativa o APC/C, acarretando na separação das cromátides irmãs e na saída da mitose. Adaptado de Nakayama e Nakayama, 2006; Fukasawa, 2007.

Somente após a última cromátide estar ligada corretamente ao fuso mitótico, a Cdc20 é liberada, e esta por sua vez ativa o APC/C. O APC/C ativado, aciona a degradação de securinas e de ciclinas do tipo B, através da

ubiquitinação. A destruição da securina ativa a separase. A separase cliva a coesina, resultando na separação das cromátides irmãs. Já a degradação da ciclina B, inativa a CDK1 (quinase dependente de ciclina 1) ativando a saída da mitose (figura 2B) (Kops et al., 2005; Fry, Yamano, 2006).

Os mecanismos moleculares que levam a inibição do CDC20-APC/C pelas proteínas do ponto de checagem do fuso mitótico ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, tem sido demonstrado que o complexo do *checkpoint* mitótico (MCC), composto pelas proteínas BUBR1, BUB3 e MAD2, associados com Cdc20, previne a ativação do APC/C, inibindo a ubiquitinação da securina e ciclina B (Fang et al., 1998; Sudakin et al., 2001; Weaver, Cleveland, 2005; Bolanos-Garcia, Blundell, 2011).

Ainda não tem sido totalmente esclarecido como BUBR1, BUB3, MAD2 e Cdc20 interagem para formar o MCC, porém sabe-se que a proteína quinase BUBR1 possui um sítio de ligação diferente de MAD2 no Cdc20, e ambos, BUBR1 e MAD2 se mostram capazes de inibir Cdc20, pelo menos *in vitro* (May, Hardwick, 2006; Bolanos-Garcia, 2009). Além disso, experimentos demonstraram que BUB3 co-localiza com BUB1 e BUBR1 em cinetocoros não ligados ao fuso (Bolanos-Garcia, 2009).

Uns dos papéis da proteína quinase BUB1 é a fosforilação do Cdc20, além de possibilitar a formação de uma ligação estável dos microtubulos aos cinetocoros, promover a segregação cromossômica e também auxiliar a formação do conjunto de componentes da parte externa do cinetocoro (Meraldi, Sorger, 2005; Boyarchuk et al., 2007; Kang et al., 2008; Schliekelman et al., 2009). Ainda, a atividade da proteína BUB1 pode proteger a célula da morte, e em leveduras ser suficiente para recrutar outras proteínas do ponto de checagem do fuso mitótico (Niikura et al. 2007; Rischitor et al., 2007). Já a proteína quinase BUBR1 participa na regulação da estabilidade de ligação ao microtúbulo, é necessária para o alinhamento cromossômico e auxilia na progressão meiótica de oócitos (Ditchfield, et al., 2003; Wei et al., 2010; Bolanos-Garcia, Blundell 2011).

1.4.1.1. Alterações na expressão gênica e carcinogênese

A hiper- ou hipoexpressão dos genes *BUBs* tem sido relatadas em diferentes tipos de câncer, como gástrico, renal, colorretal e carcinoma de células escamosas orais (Grabsch et al., 2003; Pinto et al., 2008; Burum-Auensen et al., 2008; Ando et al., 2010; Hsieh et al., 2010; Rizzardi et al., 2011).

Mudanças na expressão destes genes podem acarretar inúmeras e diferentes respostas, dependendo do gene envolvido. Células deficientes da proteína BUB1 são propensas a instabilidade genética, tanto por falhas na ligação dos microtúbulos aos cinetocoros, quanto pela habilidade destas células de detectar tais erros, podendo apresentar alto grau de aneuploidia. Além disso, a supressão de BUB1 pode inativar o ponto de checagem do fuso mitótico, diminuir a condensação das cromátides irmãs, além de induzir uma resposta prematura de senescência (Meraldi, Sorger, 2005, Gjoerup et al., 2007). Fibroblastos embrionários murinos mutantes para BUB1 demonstraram severa missegregação cromossômica, aneuploidia e alto nível de senescência prematura (Schliekelman et al., 2009).

Outro trabalho demonstrou que a hiperexpressão de *BUB1* leva a aneuploidia e a formação espontânea de vários tipos de tumores em camundongos, indicando que este gene possui propriedades oncogênicas (Ricke et al., 2011).

A hiperexpressão dos genes *BUB1*, *BUBR1* e *BUB3* já tem sido relatada em diversos tipos de tumores. Em células de carcinomas renais a hiperexpressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* foi significativamente correlacionada ao grau de complexidade genômica, indicando a provável função destes genes no desenvolvimento e/ou progressão citogenética deste tipo de neoplasia (Wang et al., 2008; Pinto et al., 2008).

Outra evidência do papel das proteínas do ponto de checagem do fuso mitótico na instabilidade genômica e carcinogênese tem sido demonstrada para a BUBR1. A redução dos níveis desta proteína, encontrada em câncer colorretal, foi relacionada à aneuploidia (Burum-Auensen et al., 2008). Além disso, o aumento da taxa de separação prematura das cromátides irmãs está proporcionalmente correlacionado com uma diminuição nos níveis de BUBR1 (Bohers et al., 2008). Assim, defeitos em BUBR1 não apenas aumentam o aparecimento de

aneuploidia, como também comprometem as células para apoptose (Ha et al., 2007).

Park e colaboradores (2007) demonstraram que a regulação diferencial da expressão do gene *BUBR1* em células cancerosas está associada com mudanças no padrão de hipermetilação do promotor deste gene.

Recentemente, foi demonstrada que a hiperexpressão de *BUBR1* está associada aos estágios patológicos menos avançados e a maior sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas (Rizzardi et al., 2011). Contudo, foi observado em lesões malignas de carcinoma de células escamosas orais, que a hiperexpressão deste gene foi associado com menor sobrevida (Lira et al., 2010). Ainda, a alta expressão de *BUBR1* foi correlacionada a aneuploidia e a progressão de câncer gástrico e a um mau prognóstico em carcinoma hepatocelular (Ando, et al. 2010; Liu, et al., 2009).

Assim, mudanças na expressão dos genes da família *BUB* parecem não seguir um padrão nos diferentes tipos de neoplasias, porém como já relatado, a maioria dos trabalhos descreve que tanto a hiperexpressão quanto a hipoexpressão dos mesmos podem aumentar o desenvolvimento de aneuploidias. A presença de aneuploidia é um dos indicativos da maioria dos tumores sólidos, uma vez que grande parte das células cancerosas possui número de cromossomos anormais (Ha et al., 2007; Burum-Auensen et al., 2008; Wang et al., 2008, Ando et al., 2010).

Portanto, estes dados sugerem uma forte relação entre a atividade alterada das proteínas do ponto de checagem mitótico, a carcinogênese e a instabilidade genômica de diferentes tipos de neoplasias.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a expressão dos genes *BUB1*, *BUBR1*, *BUB3*, em amostras de pacientes portadores de gliomas de baixo grau (I e II) e de alto grau (IV);
 - Analisar a correlação da expressão destes genes com a sobrevida de pacientes com gliomas de baixo grau (I e II) e alto grau (grau IV);
 - Analisar a expressão dos genes *BUB1*, *BUBR1*, *BUB3* em linhagens celulares de glioblastoma;
 - Avaliar os efeitos da inibição destes genes em linhagem celular de glioblastoma, utilizando RNA de interferência (RNAi), através de ensaios funcionais.
-

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

3.1. Linhagens Celulares e Condições de Cultura

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas para estudo:

- U343, T98G, MO59K, U138, LN319– Glioblastoma adulto;
- R286 - astrocitoma pilocítico pediátrico, gentilmente cedida pelo Prof. Michael Bobola – University of Washington – Estados Unidos;
- SF188 – glioblastoma pediátrico, gentilmente cedida por Nada Jabado e Damien Faury – McGill University – Canadá;
- U87 – glioblastoma adulto (gentilmente cedido por Peter E. Huber – German Cancer Research Center – Alemanha).

A transfecção para silenciamento dos genes *BUB1* e *BUBR1* foi realizada na linhagem SF188, assim como todos os testes funcionais.

Estas linhagens celulares foram cultivadas em meio HAM F10 suplementado com 1% de glutamina, 100 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, e 10% de soro bovino fetal (pH 7,2–7,4) em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C.

3.2. Amostras

Para o desenvolvimento do trabalho, foram coletadas 18 amostras de pacientes portadores de glioblastoma (grau IV), 16 pacientes portadores de astrocitoma pilocítico (grau I) e 3 de pacientes portadores de astrocitoma difuso (grau II), sendo que estes últimos foram agrupados em um único grupo (gliomas de baixo grau), que foram submetidos à cirurgia no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto sob a responsabilidade do prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr. da divisão de Neurocirurgia do Departamento de Cirurgia e de Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, com prévio consentimento por

escrito do paciente e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa processo HCRP nº5333/2009.

Todas as amostras foram microdissecadas e guardadas em nitrogênio líquido até sua utilização. O diagnóstico foi confirmado no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

3.3. Tratamento de Cultivos Com Temozolomida

A temozolomida foi adquirida da Sigma-Aldrich do Brasil. A solução estoque da TMZ foi preparada em DMSO filtrada em filtro Millipore® (0,5µm). Alíquotas da droga foram armazenadas a -80°C, mantendo a atividade por pelo menos seis meses.

Para a padronização das concentrações de TMZ foram realizados testes de proliferação em relação a concentrações descritas na literatura e os efeitos comparados por ANOVA. Assim, foram considerados os resultados da estatística e a percentagem de inibição.

Foi definido usar uma concentração de 250µM de TMZ. Esta concentração se mostrou eficiente reduzindo em cerca de 30% a proliferação após 72 horas para a maioria das linhagens (Tabela I).

Tabela I – Índice médio de proliferação das diferentes linhagens tratadas com Temozolomida em relação ao controle sem tratamento

24hs	ST	50uM	100uM	250uM	500uM	750uM
U138	1	1,157	1,09	0,82	0,8	0,79
U251	1	0,99	0,93	0,85	0,75	0,58
U343	1	1,01	1	0,91	0,81	0,8
T98G	1	0,87	0,93	0,98	0,93	0,98
SF188	1	0,96	0,938	1,01	0,95	0,95
LN319	1	0,96	0,91	0,81	0,75	0,7
R286	1	1,02	1	0,83	0,73	0,65
48hs	ST	50uM	100uM	250uM	500uM	750uM
U138	1	1,112	1,08	0,94	0,81	0,73
U251	1	0,94	0,91	0,75	0,61	0,49
U343	1	0,93	0,94	0,65	0,54	0,47
T98G	1	0,92	0,83	0,76	0,69	0,6
SF188	1	0,87	0,91	0,84	0,76	0,97
LN319	1	0,97	0,92	0,85	0,75	0,6
R286	1	0,98	0,92	0,76	0,62	0,56
72hs	ST	50uM	100uM	250uM	500uM	750uM
U138	1	1,04	1,03	0,98	0,87	0,73
U251	1	0,95	0,89	0,74	0,59	0,45
U343	1	0,82	0,79	0,68	0,5	0,39
T98G	1	0,82	0,8	0,74	0,69	0,63
SF188	1	1,02	0,87	0,73	0,63	0,74
LN319	1	0,91	0,85	0,75	0,6	0,54
R286	1	0,95	0,89	0,7	0,51	0,41

Negrito: estatisticamente diferente ($p < 0,05$), sombreado: diminuição de 30% em média da proliferação.

3.4. RNA de Interferência (RNAi)

No intuito de produzir um silenciamento gênico transiente foram utilizados os duplexes de siRNA específicos Silencer® Select Predesigned siRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Utilizou-se um siRNA para o gene *BUBR1*, pois este já era validado pela empresa, e inicialmente dois siRNA para *BUB1* (siRNA1 e siRNA2), com o propósito de verificar qual deles resultaria em uma melhor resposta. Realizada a transfecção foi escolhido o siRNA para *BUB1* (siRNA2) que obteve a porcentagem maior de silenciamento (figura 3). A linhagem celular SF188 foi transfectada com siRNAs, utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) em uma concentração final de 100nM. Como controle negativo foi utilizado o Silencer® Select Negative Control #1 siRNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Nos primeiros testes o silenciamento foi realizado tanto em relação ao controle negativo, quanto em relação a lipofectamina sozinha (*mock*) para verificar a existência de diferenças entre tais procedimentos. Como os padrões de inibição encontrados nesses controles foram semelhantes, nos testes posteriores foram realizados apenas com o controle negativo. Assim, o experimento foi realizado de maneira reversa, onde os oligômeros foram reversamente transfectados nas linhagens de glioblastomas utilizando a lipofectamina 2000 (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, EUA). Inicialmente, os mesmos foram centrifugados e ressuspensos em água livre de nuclease a uma concentração de 50µM. Para a transfecção, 2,5µL de lipofectamina foi diluída em 200µL do meio Opti-MEM pré-aquecido a 37°C e incubado por 5 min a temperatura ambiente. A seguir, 2µL do oligômero foi diluído em 200µL do meio Opti-MEM para atingir uma concentração final de 100nM, quando adicionado nas células. Após 5 min de incubação, a lipofectamina diluída foi combinada com o oligômero diluído e incubados por 20 min em temperatura ambiente. Seguidamente 404,5µL do complexo oligômero-lipofectamina foram adicionados a 595,5 µL de meio de cultura sem antibióticos contendo 6×10^5 células. As células transfectadas foram incubadas por 24 a 72 h a 37°C. A eficiência da transfecção foi monitorada por qRT-PCR. O silenciamento específico dos genes-alvo foi confirmado por qRT-PCR e posteriormente validado a proteína BUB1 por Western Blot (figuras 3 e 4). A proteína BUBR1 não foi possível ser validada por *Western*

Blotting. Foram testados dois anticorpos de diferentes empresas para esta proteína e nenhum deles apresentou resultados satisfatórios.

Figura 3 – Análise da eficiência do silenciamento do gene *BUBR1* (A) e *BUB1* (B) com siRNAs específicos. A linhagem SF188 foi transfectada na concentração de 100nM. A eficiência da transfecção foi avaliada por qRT-PCR 24, 48 e 72h após a transfecção.

Figura 4 – *Western blotting* demonstrando a inibição através do siRNA BUB1 e do controle negativo. Ambos os tratamentos foram incubados com anticorpos da proteína BUB1 (A) de 150KDa e β -actina (B) de 45KDa, demonstrando a redução da proteína BUB1.

3.5. Extração de RNA e Proteínas e qRT-PCR

Para confirmação do silenciamento gênico foi realizado qRT-PCR para quantificação dos mRNAs-alvo. Além disso, foi utilizada esta técnica para analisar a expressão dos genes *BUBR1*, *BUB3* e *BUB1* em amostras de pacientes portadores de gliomas. Primeiramente, foi extraído o mRNA dos cultivos celulares tratados e das amostras por meio do Trizol Reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Os RNAs foram quantificados e armazenados em freezer – 80°C até a sua utilização. Foram sintetizados os cDNAs dos mRNAs por meio do *kit* High capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O qRT-PCR foi realizado utilizando aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram utilizadas sondas TaqMan® inventariadas para os genes *BUB1*, *BUBR1* e *BUB3* (Hs01557701_m1, Hs00190920_m1 e Hs00176169_m1, Applied Biosystems). O volume final para cada PCR foi de 10 μ L, incluindo 4,5 μ L de amostra investigada diluída (1/50), 5 μ L Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 0,5 μ L de sonda. Como controles endógenos foram utilizados os

genes *TBP* e *HPRT*. A quantificação relativa da expressão gênica foi determinada utilizando o método $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001). As proteínas foram extraídas utilizando o tampão RIPA (Pierce, IL, EUA) suplementado com Coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich, Inc, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.6. Western Blotting

Para a análise protéica 40-100 μg de cada amostra foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970), transferidas para membranas de nitrocelulose e posteriormente incubadas em TBS-T 1% contendo 5% de solução bloqueadora (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) *overnight*, a temperatura ambiente. Seguidamente, as membranas foram incubadas por 5 horas a temperatura ambiente com os anticorpos primários das proteínas de estudo, diluídos de acordo com as instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). As membranas foram então lavadas 3 vezes (10 minutos cada) com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG HRP sc-2005* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) (1:5000 em TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes (10 minutos cada) com TBS-T. O anticorpo secundário foi visualizado através da utilização do ECLTM Western blotting Analysis System (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Os filmes foram expostos entre 1 a 15 minutos e então analisados.

3.7. Testes Funcionais

3.7.1. Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método de Exclusão de Azul de Tripán

As células foram incubadas em solução de azul de tripan (Triplan blue / Merck, Frankfurter, Germany) a 0,5% em solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 (Phosphate Buffer Saline – PBS / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), na proporção de 1:1. Após a homogeneização, a mistura foi observada em câmera de Neubauer ao microscópio óptico. Para os testes foram realizados três experimentos distintos.

3.7.2. Ensaio de Proliferação Celular

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio com o reagente XTT (sodium 3'-[1- (phenylaminocarbonyl)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-methoxy- 6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) utilizando o *Proliferation kit II* (XTT) (Roche, Molecular Biochemicals, IN, EUA), que avalia a capacidade das células vivas de metabolizar este sal. As células metabolicamente ativas degradam o XTT produzindo uma alteração na cor do meio o que pode ser medido pela variação na absorbância. Assim, 2300 células da linhagem SF188 foram semeadas em quintuplicata, em placas com 96 poços e colocadas para crescimento por 72, 96 e 120h após a transfecção. Em cada tempo foi adicionado o reagente 3-(4,5-dimetitiazol-2)-2,5-difeniltetrazolium e continuada a incubação por 2 horas, como a finalidade de permitir o aparecimento da cor na solução. Foi lida a absorbância em um leitor de placa iMax Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) sendo o valor encontrado comparado entre os grupos de células silenciadas e células não silenciadas (controle negativo). Foram realizados três experimentos diferentes.

3.7.3.Ensaio de Apoptose (Anexina V Marcada com FITC)

De acordo com o protocolo, 96h após a transfecção e 48h após o tratamento com TMZ. As células foram tripsinizadas e lavadas em PBS gelado. Foram ressuspensas, 2×10^5 células em 10 μ L de tampão de ligação. Imediatamente antes da leitura no citômetro foram adicionados 5 μ L de anexina V marcada com FITC e 50 μ L de iodeto de propídio (2 μ g/mL em PBS). Foram analisados 10000 eventos. Para os testes foram realizados três experimentos diferentes.

3.7.4.Avaliação do Ciclo Celular

A avaliação das fases do ciclo celular foi realizada utilizando o Guava CytoSoft 4.2.1. Foram analisados três tempos e em cada tempo as células foram tripsinizadas, fixadas com etanol 70% e estocadas em freezer -20°C. Posteriormente, o material foi descongelado e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos, lavado com PBS (filtrado e gelado) e novamente centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. Ao pellet, foram acrescentados 200 μ L da solução PI (iodeto de propídio 1mg/mL, RNase 50ug/mL, Nanodet [NP-40] 0,2%), conservando-se o material em gelo. Foram analisados 5000 eventos. Para a avaliação do ciclo celular foram realizados três experimentos distintos. A análise foi realizada no laboratório de Citogenética e Mutagenese do Departamento de Genética da FMRP-USP, sob a responsabilidade da Dra. Profa. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo.

3.7.5.Sobrevivência Clonogênica

Após a transfecção as células foram tripsinizadas, sendo semeadas 200 células em placas com seis poços. As culturas foram tratadas com TMZ (5 μ M) durante 48h e após este período, o meio foi removido e um meio novo foi acrescentado. As placas foram incubadas em estufa a 37°C entre 7 -15 dias, até que as colônias fossem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol: ácido acético (3:1) e coradas com Giemsa 3%.

As colônias com pelo menos 50 células foram contadas utilizando uma lupa e com o número de colônias foi determinada a eficiência de plaqueamento (EP):

$$EP = \frac{\text{número de colônias formadas} \times 100}{\text{número de células plaqueadas}}$$

Utilizando o EP foi calculada a fração de sobrevivência (FS):

$$FS = \frac{\text{número de colônias formadas após o tratamento}}{\text{número de células semeadas} \times EP}$$

A EP representa a percentagem de células que tem capacidade de formar colônias e é específica de cada linhagem para cada condição de cultura. A FS é específica de cada tratamento e representa a percentagem de células plaqueadas que após o tratamento ainda apresentam a capacidade de formar colônia. A partir dos dados de FS foram realizadas as análises estatísticas.

3.7.6.Índice Mitótico

O índice mitótico foi calculado como a percentagem de células em mitose após a transfecção. As células foram semeadas em garrafas de 25cm² e analisadas após 72, 96 e 120h. Uma vez tripsinizadas, as células foram fixadas em metanol: ácido acético (3:1) pingadas e coradas com Giemsa 3%. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico. 1000 células foram analisadas por tratamento para calcular, a partir desses dados, o índice mitótico. Para o teste foram realizados três experimentos distintos.

3.7.7.Atipia Celular e Cromossômica

As atipias foram analisadas após 72h após a transfecção. As células foram semeadas em garrafas de 25cm² e após o tempo, as células foram fixadas em metanol: ácido acético (3:1) pingadas e coradas com Giemsa 3%. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico. 500 células foram analisadas por

tratamento para atipia celular e 50 células em mitose foram analisadas para o teste de alterações cromossômicas. Para os testes foram realizados três experimentos distintos.

3.7.8.Micronúcleo

As células foram plaqueadas 24h após a transfecção em garrafas de 25cm² e em 94h foram adicionados 20uL de citocalacina B (5ug/ml) com a finalidade de obter células binucleadas. 120h após a transfecção as células foram fixadas utilizando metanol: ácido acético (3:1). O material foi gotejado sobre uma lâmina e corado com Giemsa 3% durante 7 minutos e analisadas em microscópio óptico. Foram analisadas 1000 células binucleadas, que foram avaliadas conforme as seguintes características: os dois núcleos da célula binucleada (BN) continham membranas nucleares intactas e dentro do mesmo limite citoplasmático, com o mesmo tamanho e mesma intensidade de coloração; os dois núcleos podiam estar unidos por uma fina ponte nucleoplasmática, apenas se a largura não superasse um quarto do diâmetro do maior núcleo; os dois núcleos das células BN poderiam se tocar, porém não se sobreporem; e que o micronúcleo tivesse formato redondo ou oval, sem refringências, com a mesma intensidade do núcleo principal e sem estar ligado a este, e com tamanho entre 1/16 a 1/3 do diâmetro do núcleo principal (figura 5) (Fenech, 2000; Fenech et al., 2003).

Figura 5 – Exemplos de células binucleadas sem (A) e com a presença de micronúcleo (B). Magnificação de 1000 x.

3.7.9. Ensaios Funcionais após a Irradiação das Células

Foram realizadas a análise de ensaio clonogênico e de proliferação celular da inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* isolados ou em combinação com irradiação. As doses de irradiação gama utilizadas foram de 2 e 4Gy. As células foram transfectadas e após 24h foram irradiadas com raios- γ provenientes da fonte de ^{60}Co , a uma taxa de dose de 0,48 Gy/min., utilizando o equipamento Gammatron S-80 (Siemens Medical Systems Inc., Iselin, NJ, USA) do Setor de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Harley Francisco de Oliveira. Após a irradiação 500 células foram plaqueadas para proliferação celular e 250 células para ensaio clonogênico. Após 7 e 12 dias, os tratamentos foram analisados para proliferação e para o ensaio clonogênico, respectivamente, fixando as células para análise das colônias e utilizando XTT para a proliferação celular, metodologias citadas anteriormente.

Para a análise do ensaio clonogênico das células irradiadas foi calculado a taxa do reforço de dose (TRD). A TRD é definida como a FS das células tratadas com a irradiação, comparada com a FS das células tratadas com a irradiação associada com algum tratamento (*BUB1* ou *BUBR1*). A radiosensibilização é o termo utilizado quando uma droga/siRNA aumenta a sensibilidade das células para a irradiação (Tao et al, 2007; He, et al., 2010). Quando a $\text{TRD}=1$, entende-se que a inibição aumentou os efeitos da irradiação, mas esta resposta não foi decorrente da somatória dos dois tratamentos (irradiação+inibição), sendo um efeito aditivo. Por outro lado, quando a $\text{TRD}>1$, considera-se que houve um efeito sinérgico na irradiação, ou seja, o efeito do tratamento é a somatória dos efeitos da irradiação juntamente com os efeitos da inibição dos genes. Quando a $\text{TRD}<1$, considera-se que o efeito foi sub-aditivo, ou seja, a inibição não aumentou o efeito da irradiação.

3.8. Análise Estatística

Os testes funcionais foram comparados ao controle negativo (siRNA não-alvo), descrita no decorrer do texto apenas como controle. A análise estatística foi realizada pelo pacote estatístico SigmaStat 3.5 (Jnadel Scientific, CA, USA) e pelo pacote estatístico para Ciências Sociais versão 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). O teste de *One Way Repeated Measures Analysis of Variance* (ANOVA) foi realizado para cada ensaio, seguido pelo teste *Pairwise Multiple Comparison* de Holm-Sidak. Para comparação entre os valores de expressão de mRNA foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Além disso, foram realizados os testes de correlação de Spearmann para verificar a correlação entre a expressão dos genes estudados. A análise de sobrevida foi realizada utilizando-se curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank usando a mediana dos valores de expressão como ponto de corte para sobrevida livre de eventos, com recaída e/ou morte considerada como evento desfavorável. Foi comparado o grupo total de pacientes, pacientes com astrocitomas graus I e II e glioblastoma (grau IV). Além disso, também foi realizada a análise multivariada de Cox. Foi considerado nível de significância estatística valores de p menores que 0,05.

4. *RESULTADOS*

4.1. Expressão dos Genes *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* em pacientes

Os genes *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* foram analisados em amostras de substância branca (n=5), em amostras de pacientes portadores de glioblastoma (n=18) e em amostras de pacientes com glioma de baixo grau (n=19), sendo 16 de astrocitoma pilocítico e 3 de astrocitoma difuso. Estes três grupos expressaram todos os genes analisados (figura 6A, 6B e 6C), exceto nas amostras de substância branca, em que *BUB1* e *BUBR1* se mostraram pouquíssimos expressos (figura 6A e 6C).

Tanto *BUB1* e *BUBR1* se apresentaram hiperexpressos nas amostras de glioblastoma e nas amostras de glioma grau I e II, quando comparados às de substâncias brancas ($p < 0.05$) (figura 6A e 6C). Quando analisada a expressão relativa destes genes entre as amostras de glioblastoma e as de baixo grau, *BUB1* e *BUBR1* também foram hiperexpressos ($p < 0,05$) (figura 6A e 6C). Além disso, estes genes foram correlacionados positivamente, quando analisados pelo teste de Spearman ($p < 0,05$) (tabela II).

Ao contrário dos resultados encontrados para *BUB1* e *BUBR1*, o gene *BUB3* foi hipoexpresso nas amostras dos pacientes com glioblastoma quando comparados às amostras de substância branca ($p < 0,05$) (figura 6B).

Estes resultados mostram uma diferença na expressão relativa dos genes *BUB1* e *BUB1R* entre glioblastoma (grau IV) e gliomas de baixo grau (I e II), demonstrando um perfil distinto de expressão entre estes genes e os diferentes graus de gliomas. Tais dados reforçam a diferença biológica encontrada nestes distintos tipos de tumores.

Figura 6 – Comparação da expressão relativa dos genes *BUB1* (A), *BUB3* (B) e *BUBR1* (C) em amostras de substância branca – SB, n=5, em amostras de pacientes portadores de gliomas de baixo grau – Grau I e II, n=19 e em amostras de pacientes com glioblastoma – Grau IV, n=18. Calibrador U138. Teste Mann-Whitney, * p<0,05.

Tabela II – Correlação entre os valores das expressões dos genes *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* determinada pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (N=42).

		BUB1	BUB3	BUBR1
BUB1	Coeficiente de Correlação	1,000	-,119	,810**
	Sig.	.	,453	,000
BUB3	Coeficiente de Correlação	-,119	1,000	-,001
	Sig.	,453	.	,995
BUBR1	Coeficiente de Correlação	,810**	-,001	1,000
	Sig.	,000	,995	.

** p< 0,001.

4.2. Análise de Sobrevida

A relação entre os níveis de expressão dos genes *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* e a sobrevida livre de eventos (SLE) dos pacientes analisados foi avaliada por curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank, utilizando-se os valores da mediana de expressão destes genes como ponto de corte, sendo considerado como evento desfavorável, a presença de recaída e/ou morte.

Quando analisada a sobrevida no grupo total de pacientes, os valores de expressão abaixo da mediana para os genes *BUB1* e *BUBR1* foram associados à melhor sobrevida destes pacientes ($p<0,05$) (figuras 7 e 13). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao gene *BUB3* (figura 10). Estes dados, no entanto, devem ser observados com cautela, uma vez que estes diferentes subtipos de gliomas apresentam comportamento biológico e prognóstico diferentes.

Para avaliar se esta associação prognóstica observada era independente do subtipo histológico, foi realizada a análise multivariada por modelo de regressão de Cox utilizando a variável valores de expressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* em associação com subtipo histológico (grau VII *versus* grau IV). Expressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* não se mostrou como fator prognóstico independente ($p=0,702$ e $p=0,709$, respectivamente) quando analisado em associação com o subtipo histológico ($p=0,005$ e $p<0.001$) (tabelas III e IV).

Foi realizada também a análise da sobrevida livre de eventos separadamente para os 2 subtipos histológicos: pacientes com gliomas baixo grau (graus I e II) e pacientes portadores de glioblastoma (grau IV).

Conforme mostrado nas figuras 8, 9, 11, 12, 14 e 15, não foi observada associação significativa entre os valores de expressão dos genes analisados e sobrevida livre de eventos nos pacientes com glioma de baixo grau e nem nos pacientes diagnosticados como glioblastoma.

Estes dados sugerem que maiores valores de expressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* estejam associados a subtipo histológico mais agressivo (glioblastomas), porém não apresentam impacto prognóstico direto. Estes dados, no entanto, devem ser vistos com cuidado devido ao número amostral relativamente pequeno.

Tabela III – Análise multivariada utilizando o Modelo de Cox para a expressão do gene *BUB1* em associação com subtipo histológico (grau I/II versus IV).

	Valor de P	Risco relativo [Exp(B)]
Subtipo histológico	0,005	11.932
<i>BUB1</i>	0,702	1.358

Tabela IV – Análise multivariada utilizando o Modelo de Cox para a expressão do gene *BUBR1* em associação com subtipo histológico (grau I/II versus IV).

	Valor de P	Risco relativo [Exp(B)]
Subtipo histológico	0,000	16.355
<i>BUBR1</i>	0,709	0.962

Figura 7 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUB1* para os pacientes como um todo (n=37). $p < 0,001$.

Figura 8 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUB1* para pacientes com gliomas de grau I e II (n=19).

Figura 9 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUB1* para pacientes com glioblastoma (n=18).

Figura 10 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUB3* para os pacientes como um todo (n=37).

Figura 11 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUB3* para pacientes com gliomas de grau I e II (n=19).

Figura 12 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUB3* para pacientes com glioblastoma (n=18).

Figura 13 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUBR1* para os pacientes como um todo (n=37). $p < 0,005$

Figura 14 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUBR1* para pacientes com gliomas de grau I e II (n=19).

Figura 15 – Sobrevida livre de eventos (SLE) determinada pelo método de Kaplan-Meier e pelo teste de Log-rank de acordo com os menores ou maiores valores da mediana da expressão do gene *BUBR1* para pacientes com glioblastoma (n=18).

4.3. Expressão dos Genes *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* em linhagens celulares

A análise da expressão dos genes de estudo foi realizada em 9 linhagens de gliomas, sendo uma astrocitoma pilocítico (R286), e as demais glioblastomas (U251, U343, SF188, T98G, MO59K, LN-319, U138 e U87). Todas as linhagens expressaram os genes *BUB1*, *BUB3*, *BUBR1* apesar de apresentarem uma variação de expressão entre as linhagens (figura 16).

Figura 16 – Expressão relativa dos genes *BUB1*, *BUB3* e *BUBR1* em linhagens de gliomas. Calibrador U138.

4.4. Testes Funcionais

Nos experimentos funcionais foi utilizada a linhagem SF188, que foi escolhida por ser pediátrica. Como já enfatizado no presente trabalho, GBMs em crianças apesar de raros, possuem grandes diferenças genéticas quando comparados ao de adulto, são difíceis de serem tratados, não havendo um tratamento efetivo para este tipo de tumor (Bax. et al. 2009; Paugh et al.,2010;

Faria et al., 2010, MacDonald, et al. 2011). Além disso, Kops e colaboradores (2004) publicaram alguns ensaios funcionais com inibição de *BUBR1* em T98G, linhagem de glioblastoma adulto.

O tratamento do GBM inclui cirurgia, radiação e quimioterapia com a droga temozolomida (TMZ). A TMZ exibe atividade antineoplásica através da interferência na replicação do DNA (Stupp et al., 2007; Argyriou et al., 2009). Por este motivo, alguns experimentos foram realizados na presença desta droga. Nestes, a TMZ foi adicionada ao meio de cultivo 48h após a transfecção, sendo analisados assim os tempos de 72, 96 e 120h após a transfecção e 24, 48 e 72h após o tratamento com a droga. Além disso, também foram realizadas a análise de ensaio clonogênico e a de proliferação celular combinada ou não com irradiação (2Gy e 4Gy) (figura 17).

Figura 17 – Esquema demonstrando os experimentos realizados em cada tratamento (somente inibição, inibição + TMZ e inibição + irradiação).

4.4.1.Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos analisados em todos os tempos (figura 18). Estes dados demonstram que o silenciamento dos genes *BUBR1* e *BUB1* podem não estar relacionados à diminuição da porcentagem de células viáveis, no entanto, tem que se analisar este resultado com cautela, uma vez que a viabilidade foi calculada pelo método de exclusão azul de tripan, na câmara de Neubauer, sendo este método não tão apurado.

Figura 18 – Porcentagem de células vivas após os tratamentos de inibição com ou sem TMZ, contadas pelo método azul de tripan na linhagem celular SF188 em diferentes tempos – 72h (A), 96h (B) e 120h (C).

4.4.2.Proliferação Celular

A figura 19 e a tabela V mostram o efeito da inibição dos genes *BUBR1* e *BUB1*, com ou sem a presença de temozolomida na proliferação celular. No tempo de 72h, apenas o controle com TMZ não foi significativo em relação ao controle, demonstrando uma diminuição da proliferação de 25,47%, 23,83%, 37,42%, 40,7% nos tratamentos com inibição *BUBR1*, *BUBR1*+TMZ, *BUB1*, *BUB1*+TMZ, respectivamente (figura 19A e tabela V). Nos tempos de 96 e 120h, todos os tratamentos apresentaram uma diminuição significativa em relação às células transfectadas com siRNA não-alvo, exceto o *BUB1* em 120h (Holm-Sidak $p<0,05$) (figura 19B e 19C).

Estes dados sugerem que tanto o silenciamento do gene *BUBR1* quanto do *BUB1* pode provocar uma relevante diminuição na proliferação celular. No entanto, a associação dos siRNAs com TMZ parece não ter efeito aditivo, uma vez que os tratamentos combinados a droga não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos tratamentos com as inibições sem droga (*BUBR1* x *BUBR1*+TMZ / *BUB1* x *BUB1*+TMZ) nos tempos 72 e 96h, sendo esta diferenças apenas significativa em 120h, apresentando uma redução de 14,97% e 27,29%, no tratamento *BUBR1*+TMZ em comparação a inibição de *BUBR1* e no *BUB1*+TMZ em comparação a inibição de *BUB1*, respectivamente (figura 19C e tabela V).

Tabela V – Porcentagem de proliferação celular em SF188 em relação ao controle negativo nos tempos de 72h, 96h e 120h, após os tratamentos de inibição com ou sem TMZ.

	72h	96h	120h
CONTROLE	100,00	100,00	100,00
CONTROLE+TMZ	96,92	83,41	88,82
BUBR1	74,53	66,14	86,01
BUBR1+TMZ	76,17	67,04	71,04
BUB1	62,68	63,32	95,40
BUB1+TMZ	59,30	61,52	68,11

Figura 19 – Análise da proliferação celular após os tratamentos de inibição acoplados ou não a TMZ em SF188 nos tempos – 72h (A), 96h (B) e 120h (C). * $p < 0,05$ (Holm-sidak), comparada ao controle (siRNA não alvo).

4.4.3.Capacidade Clonogênica

O ensaio clonogênico baseia-se na capacidade de uma célula de formar colônias e serve para avaliar a capacidade reprodutiva das células após tratamentos (Franken et al., 2006). Como dito anteriormente, a análise estatística foi realizada com a fração de sobrevivência que foi calculada para cada tratamento.

A análise de variância mostrou diferenças significativas no silenciamento do gene *BUB1* como do *BUBR1*, podendo ser observado um decréscimo maior no número de colônias formadas quando inibido o gene *BUBR1*, sendo esta diminuição no número de colônias de 89,1% em relação ao controle negativo e de 90,7% quando combinado a inibição de *BUBR1* a TMZ, demonstrando que este gene pode estar fortemente envolvido na capacidade da célula em formar colônias (figura 20 e tabela VI). Assim, como observado no teste de proliferação, a associação dos siRNAs com TMZ parece não ter efeito aditivo, uma vez que não houve diferença significativa entre os tratamentos com a droga comparados aos sem adição da droga (*BUBR1* x *BUBR1*+TMZ / *BUB1* x *BUB1*+TMZ).

Tabela VI – Porcentagem de colônias após a inibição dos genes *BUBR1* e *BUB1* associados ou não a TMZ, na linhagem SF188 em relação ao controle negativo.

	%
CONTROLE	100,0
CONTROLE+TMZ	104,8
BUBR1	10,9
BUBR1+TMZ	9,3
BUB1	52,9
BUB1+TMZ	70,0

Figura 20 – Fração de sobrevivência na linhagem SF188 após os tratamentos de inibição com ou sem TMZ, comparada ao controle (controle negativo). * $p < 0,05$ (Holm-sidak).

4.4.4.Ciclo Celular

O ciclo celular foi analisado nas células transfectadas com siRNA para *BUB1* e *BUBR1*, com ou sem TMZ nos tempos de 72, 96 e 120h, a fim de observar se estes genes estariam influenciando a parada celular em alguma das fases (G1, S, G2/M). As tabelas VII, VIII e IX e a figura 21 mostram um aumento significativo na fase G2/M nos tempos de 96 e 120h em todos os tratamentos com a TMZ. Este aumento pode ser efeito da droga que sabidamente causa uma parada na fase G2 (Hirose et al., 2001; Mhaidat et al., 2007). Além disso, há também diminuição na fase G1 em todos os tratamentos no tempo de 96h e também em 120h, exceto para *BUB1*.

Tabela VII – Porcentagem de células em G1, em SF188 nos diversos tratamentos.
*p<0,05 (Holm-sidak).

G1	24h			48h			72h		
Tratamentos	Média da %	SD	p*	Média da %	SD	p*	Média da %	SD	p*
Controle	42.89	6.05	-	62.39	2.43	-	60.62	4.23	-
Controle+TMZ	33.76	2.40	-	14.56	4.04	*	8.35	3.15	*
BUBR1	45.72	0.95	-	48.50	5.31	*	44.50	2.67	*
BUBR1+TMZ	38.28	7.66	-	26.27	4.40	*	13.71	6.16	*
BUB1	46.75	5.07	-	50.89	4.83	*	58.25	3.80	-
BUB1+TMZ	37.77	3.58	-	22.30	0.25	*	8.83	5.43	*

Tabela VIII – Porcentagem de células na fase S, em SF188 nos diversos tratamentos.
*p<0,05 (Holm-sidak).

S	24h			48h			72h		
Tratamentos	Média da %	SD	p*	Média da %	SD	p*	Média da %	SD	p*
Controle	15.16	1.83	-	12.69	2.35	-	11.82	4.10	-
Controle+TMZ	14.28	2.05	-	13.98	6.18	-	9.42	4.45	-
BUBR1	13.31	1.43	-	14.83	4.05	-	15.54	3.12	-
BUBR1+TMZ	14.39	3.61	-	17.26	6.35	-	12.01	6.45	-
BUB1	14.64	2.36	-	14.11	2.97	-	12.10	1.64	-
BUB1+TMZ	14.95	2.05	-	25.00	14.79	-	8.52	2.64	-

Tabela IX – Porcentagem de células em G2/M, na linhagem celular de glioblastoma SF188 em diferentes tratamentos. *p<0,05 (Holm-sidak)

G2/M	24h			48h			72h		
Tratamentos	Média da %	SD	p*	Média da %	SD	p*	Média da %	SD	p*
Controle	39.63	7.63	-	22.76	1.95	-	26.63	5.00	-
Controle+TMZ	49.26	1.55	-	70.74	3.58	*	81.08	7.91	*
BUBR1	35.21	3.81	-	35.39	3.54	-	37.01	4.71	-
BUBR1+TMZ	44.64	4.06	-	53.89	3.57	*	71.51	12.84	*
BUB1	36.61	7.68	-	32.55	4.31	-	28.71	3.21	-
BUB1+TMZ	45.72	6.02	-	51.45	14.35	*	81.50	5.85	*

Figura 21 – Efeito da inibição dos genes com ou sem TMZ nas fases do ciclo celular (fase G1, S, G2/M), nos tempos de 72, 96 e 120h (figura **A**, **B** e **C**, respectivamente) na linhagem celular de glioblastoma SF188. * $p < 0,05$ (Holm-Sidak), comparada ao controle (controle negativo).

4.4.5. Apoptose

Com a finalidade de analisar o efeito do silenciamento dos genes *BUBR1* e *BUB1* com ou sem TMZ na apoptose, realizamos o teste da marcação com anexina V marcada com FITC. Comparando com o controle negativo, houve um aumento na porcentagem de células apoptóticas nos tratamentos conjugados à droga: controle+TMZ, BUBR1+TMZ, BUB1+TMZ (figura 22). Pode-se inferir que este aumento pode ser decorrente do efeito da droga. No entanto, também houve diferença significativa quando comparada os tratamentos (BUBR1+TMZ, BUB1+TMZ) ao tratamento apenas com TMZ (figura 22). Assim, este aumento pode ser decorrente da sensibilização do processo de transfecção quando combinado a temozolomida.

Figura 22 – Porcentagem de células em apoptose em SF188, no tempo de 96h, nos diversos tratamentos, comparada ao controle (controle negativo). * $p < 0,05$ (Holm-sidak).

4.4.6. Micronúcleo

A técnica de micronúcleo tem sido proposta para mensurar danos cromossômicos. Estes micronúcleos podem originar de fragmentos acêntricos (faltando centrômero) ou cromossomos inteiros que não são capazes de migrarem com o resto dos cromossomos durante a anáfase do ciclo celular (Kirsch-Volders et al., 2011). Houve um aumento na porcentagem de micronúcleos quando inibido o gene *BUBR1*, inferindo que este gene pode acarretar em um aumento da instabilidade cromossômica (tabela X).

Tabela X – Porcentagem de micronúcleo encontradas em na linhagem celular SF188 no tempo de 120h após a inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1*. * $p < 0,05$ (Holm-sidak).

	% de micronúcleos	Desvio	p*
Controle Negativo	0.93	0.20	-
BUBR1	3.77	0.65	*
BUB1	1.07	0.32	-

4.4.7.Índice Mitótico

O índice mitótico calcula a taxa de mitose, que representa a porcentagem de células que estão em divisão celular. Apesar dos genes em estudo estarem relacionados ao complexo promotor de anáfase (APC/C), aparentemente a inibição destes não afeta abruptamente a porcentagem de células em divisão celular (figura 23).

Figura 23 – Porcentagem de células em divisão celular após a inibição dos genes *BUBR1* e *BUB1* na linhagem SF188 nos tempos de 72, 96 e 120h (A, B e C, respectivamente).

4.4.8. Atipia Celular e Cromossômica

Foram analisadas as atipias celulares e cromossômicas quando inibidos os genes *BUB1* e *BUB1B*. Foram consideradas como atipias celulares: gemações e pontes citoplasmáticas; e como alterações cromossômicas: cromossomos “solto” da placa metafásica, pontes anafásicas e anáfases multipolares. Apesar de estes genes estarem relacionados à instabilidade cromossômica (Kops, et al. 2004), foi encontrada apenas uma tendência de aumento, sendo este de 8% e 6% quando inibido o gene *BUBR1* e *BUB1* para atipias celulares e de 10,7% e 8,7% para as atipias cromossômicas, porém tais diferenças não foram significativas (figura 24A e 24B). As figuras 25 e 26 demonstram alguns exemplos de atipias cromossômicas e celulares, respectivamente.

Figura 24 – Porcentagem de células que apresentam atipia celular (A) e cromossômica (B) nos diferentes tratamentos na linhagem SF188 no tempo de 72h.

Figura 25 – Exemplos de atipias cromossômicas encontradas na linhagem SF188. **A**- cromossomos “soltos” da placa metafásica; **B**- pontes anafásicas; **C** e **D**- anáfases multipolares. Magificação de 1000x.

Figura 26 – Exemplos de atipias celulares encontradas na linhagem SF188. **A-** Gemações e pontes citoplasmáticas; **B-** Gemações e pontes citoplasmáticas; **C-** Gemações e pontes citoplasmáticas; **D-** Gemações **E-** Gemações e pontes citoplasmáticas. Magnificação de 1000x.

4.4.9.Efeitos da Irradiação na Capacidade Clonogênica e na Proliferação Celular

Com o intuito de analisar os efeitos das inibições dos genes *BUB1* e *BUBR1* na sensibilização das células irradiadas, os seguintes testes funcionais foram realizados: proliferação e capacidade clonogênica.

A figura 27 e tabela XI demonstram o efeito da inibição destes genes com ou sem doses de irradiação (2 Gy e 4 Gy) na proliferação da linhagem celular SF188. Pode-se verificar uma diminuição da proliferação em todos os tratamentos quando comparado ao controle negativo, exceto para a inibição de *BUB1*.

No entanto, quando comparado às inibições x inibições+doses, apenas o *BUB1* apresentou uma diminuição quando acoplado as doses de irradiações (figura 27). Este efeito pode ser fruto somente do artefato da transfecção ou apenas da irradiação, pois ao analisar a dose de 2 Gy foi verificado uma diminuição da proliferação em todos os tratamentos utilizando a técnica de transfecção, tanto no controle negativo quanto nos genes inibidos (figura 28A), ou ao analisar a dose de 4 Gy foi observado apenas diminuição do BUBR1+4Gy

(figura 28B), porém entre os tratamentos da inibição deste gene combinado ou não com as doses (BUBR1 x BUBR1+2Gy x BUBR1+4Gy) não foram encontrados diferenças significativas.

Figura 27 – Taxa de proliferação celular em SF188 em diferentes tratamentos. * $p < 0,05$ (Holm-sidak), comparada ao controle (siRNA não alvo) 7 dias após a radiação.

Tabela XI – Porcentagem de proliferação celular em diferentes tratamentos normalizados com controle negativo.

	%
CONTROLE	100,0
CONTROLE+2Gy	57,8
CONTROLE+4Gy	68,8
BUBR1	40,8
BUBR1+2Gy	34,3
BUBR1+4Gy	30,1
BUB1	129,1
BUB1+2Gy	51,3
BUB1+4Gy	63,6

Figura 28 – Análise da proliferação celular em SF188 nos tratamentos com 2 Gy (A) e com 4 Gy (B) * $p < 0,05$ (Holm-sidak).

No teste funcional de capacidade clonogência foi observado um decréscimo na fração de sobrevivência das amostras com os genes inibidos com as doses tanto de 2 como de 4 Gy comparados ao controle negativo, exceto para o BUB1, sendo encontrada uma redução de 92%, 97,9% e 99,4% nos tratamentos BUBR1, BUBR+2Gy e BUBR1+4Gy, respectivamente (figura 29 e tabela XII).

Tabela XII – Porcentagem de colônias normalizadas ao controle negativo na linhagem SF188, 12 dias após a transfecção em diferentes tratamentos com ou sem irradiação.

	%
CONTROLE	100,0
CONTROLE+2Gy	36,1
CONTROLE+4Gy	24,4
BUBR1	8,0
BUBR1+2Gy	2,1
BUBR1+4Gy	0,6
BUB1	146,4
BUB1+2Gy	24,8
BUB1+4Gy	19,0

Figura 29 – Capacidade clonogênica em SF188, nos tratamentos com inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* com ou sem irradiação de 2 e de 4 Gy. * $p < 0,05$ (Holm-sidak).

Igualmente aos resultados vistos na proliferação, somente o *BUB1* apresentou uma redução significativa quando combinado com as doses de irradiação, comparado ao *BUB1* sem irradiação (figura 29). Este efeito pode ser resultante apenas da irradiação, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas quando analisados *BUB1*+2Gy comparados apenas as células irradiadas com 2 Gy e entre *BUB1*+4Gy, comparado com as células irradiadas com esta dose (figura 30A e 30B, respectivamente). No entanto, houve um aumento na fração de sobrevivência quando analisado o controle negativo com ambas as doses *versus* apenas as doses de 2 e 4 Gy (figura 30A e 30B).

Quando normalizados a fração de sobrevivência de cada tratamento com irradiação pelo sem irradiação, foi verificado um decréscimo maior nas células com os genes inibidos mais irradiação, comparado ao controle negativo (figura 31). Além disso, analisando os dados da taxa de reforço de dose (TRD) pode-se constatar um efeito sinérgico na irradiação para a inibição *BUBR1*, indicando que estes resultados são frutos da somatória tanto da irradiação, quanto da inibição, no entanto a inibição do gene *BUB1* não acarretou em um aumento da irradiação ($TRD < 1$) (tabela XIII).

Figura 30 – Análise da capacidade clonogênica na linhagem SF188 nos tratamentos com 2 Gy (A) e com 4 Gy (B).

Figura 31 – Fração de Sobrevivência dos tratamentos após a irradiação de 2Gy e 4Gy, normalizados com o tratamento na ausência da irradiação, na linhagem SF188.

Tabela XIII – Efeitos da inibição do *BUB1* e *BUBR1* na Taxa de Reforço de Doses na linhagem SF188.

	2Gy	4Gy
<i>BUB1</i>	0.892101	0.369346
<i>BUBR1</i>	10.66309	12.03053

5. *DISCUSSÃO*

O glioblastoma é o tumor cerebral mais frequente do SNC, sendo um dos tipos de neoplasia mais agressiva e letal (Kleihues et al., 2007a; Lim et al., 2011). Apesar dos avanços atuais, o prognóstico dos pacientes com GBM permanece pobre, principalmente devido à invasão inicial de células no SNC, fazendo com que a cura através da ressecção cirúrgica seja quase impossível (Bai et al., 2011).

Com o propósito de aumentar a sobrevida e também melhorar a qualidade de vida dos pacientes, novos alvos terapêuticos vem sendo estudados, entre os quais, o ponto de checagem do fuso mitótico tem sido sugerido como um alvo eficaz na terapia contra o câncer (Kaestner, Bastians, 2010).

A alteração no nível de expressão de genes relacionados ao ponto de checagem do fuso mitótico tem sido relatada em diferentes tipos de câncer, como gástrico, renal, colorretal e pulmão (Grabsch et al., 2003; Pinto et al., 2008; Burum-Auensen et al., 2008; Kato et al., 2011).

No presente trabalho os genes *BUB1* e *BUBR1* apresentaram-se hiperexpressos nas amostras de glioblastoma e nas amostras de glioma grau I, quando comparados às substâncias brancas. A hiperexpressão de tais genes já tem sido relacionada à complexidade genômica em carcinoma renal de células claras estando associada à progressão morfológica neste tipo de tumor (Pinto et al., 2008). Recentemente, a hiperexpressão do *BUBR1* foi indicada como um dos fatores de indução da aneuploidia e da progressão do câncer gástrico (Ando et al., 2010). Sabe-se que as proteínas quinases BUB1 e BUBR1 participam não apenas da checagem do fuso mitótico, mas também estão envolvidas na regulação da ancoragem dos microtúbulos aos cinetócoros e tanto a hiper- como a hipoxpressão podem ocasionar instabilidade cromossômica, um acréscimo de aneuploidia e conseqüentemente, promover uma vantagem proliferativa (Medina-Redondo, Meraldi, 2009; Holland, Cleveland, 2009; Marchetti e Venkatachalam, 2010).

Contribuindo com esta ideia, Hsieh e colaboradores (2010) analisando 120 amostras de carcinomas orais de células escamosas sugeriram que a hiperexpressão do *BUBR1* pode ser um dos fatores envolvidos nesta patogênese, podendo ser considerado um biomarcador putativo. A hiperexpressão de *BUBR1* também foi relatada em carcinomas orais de células escamosas associados ao papilomavirus humano (Lira et al., 2010). Estes dados destacam o valor destes

genes como potenciais alvos envolvidos nos processos de instabilidade cromossômica e de carcinogênese.

Além disso, os genes *BUB1* e *BUBR1* foram pouquíssimos expressos em amostras de substância branca. Resultados semelhantes foram relatados por Ouyang e colaboradores (1998), onde estes não detectaram a expressão do *BUB1* tanto em amostras de partes do cérebro, como em amostras do cérebro como um todo. Este resultado é de grande importância, pois reforça a idéia destes genes serem candidatos a alvos terapêuticos em glioblastoma, uma vez que tais genes são mais expressos nas células tumorais comparados as normais.

Em relação a sobrevida dos pacientes, no presente trabalho apenas a hipoeexpressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* foram associados com melhor sobrevida livre de eventos no grupo total de pacientes (tanto de glioblastoma quanto de pacientes portadores de gliomas de baixo grau – I e II), sugerindo que a baixa expressão pode indicar um efeito benéfico relacionado ao prognóstico. Porém, como ressaltado anteriormente, estes dados devem ser vistos com cautela, uma vez que estes resultados devem ser decorrentes apenas do tipo de tumor, como mostrado pela análise de Cox, lembrando que estes tipos de tumores são doenças diferentes, tanto em relação a sua biologia quanto ao seu prognóstico. Colaborando com este resultado, Bie e colaboradores (2011) demonstraram que os níveis baixos de expressão de *BUBR1* foram correlacionados com maior sobrevida de pacientes com gliomas de graus II, III e IV e que a expressão dos genes do ponto de checagem do fuso mitótico, como *BUB1*, *BUBR1*, *BUB3* e *CENPE*, demonstraram um acréscimo significativo relacionado com o aumento dos graus de gliomas (II, III e IV).

Além disso, pacientes com altos níveis de expressão da proteína MAD2 foram relacionados significativamente a menor sobrevida em pacientes com câncer de pulmão e que a combinação de expressão de *BUBR1* e *PINK1* foram a melhor preditora de sobrevida global em tumores adrenocorticais quando avaliados por *microarrays* (Kato et al, 2011; Reynie`s et al., 2009).

O aumento de expressão gênica em amostras de glioblastoma conduziu nosso trabalho para a inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* através de siRNAs, com o objetivo de avaliar a funcionalidade destes, neste tumor. Esta técnica tem sido amplamente utilizada para silenciar genes que estejam alterados em diversos

tipos de neoplasia (Hu et al., 2009; Kaestner et al., 2011). Além disso, a mesma pode ajudar a desenvolver novas terapias moleculares, sendo utilizadas como modelos para guiar a criação de novas drogas e ao mesmo tempo permitir que as hipóteses biológicas deste alvo sejam analisadas farmacologicamente (Collins, Workman, 2006).

Sabe-se que a tumorigênese é um processo em que certas mutações propiciam uma vantagem de proliferação seletiva, assim a alta taxa na proliferação celular é uma das características encontradas nos tumores (Spencer, et al., 2006; Kleihues et al., 2007a; Ohgaki, Kleihues, 2009). A inibição de *BUB1* e *BUBR1* propiciou um decréscimo significativo na taxa de proliferação celular, sugerindo assim um importante papel destes genes na proliferação de células neste tipo de tumor. Kops e colaboradores (2004) silenciando o gene *BUBR1* e *MAD2* verificaram um decréscimo na proliferação celular tanto na linhagem de tumor cervical, HeLa, como na linhagem de glioblastoma, T98G, podendo esta diminuição ser decorrente da perda de cromossomos durante a divisão celular.

Contribuindo com estes dados, a inibição de *MPS-1*, gene também envolvido no ponto de checagem do fuso mitótico, provocou uma diminuição na proliferação em 33% em linhagem de tumor de colorretal, comparado com o controle DMSO, 96 horas após a transfecção (Kwiatkowski et al., 2010). Em carcinoma de colon, o silenciamento da proteína *MAD2*, causou uma significativa redução no crescimento da neoplasia quando comparado ao grupo controle, reduzindo em 30% o volume do tumor, em modelo xenográfico (Kaestner et al., 2011).

Apesar de a proliferação ter diminuído em relação ao controle, não foi encontrado efeito aditivo quando combinado os siRNAs com a TMZ. Diferentemente, outros pesquisadores demonstraram que a inibição de *RRM2*, uma subunidade 2 da ribonucleotídeo redutase, acarretou em uma diminuição na proliferação com um aumento sinérgico combinado a temozolomida em linhagem celular de melanoma, mostrando o potencial desta combinação (Zuckerman et al., 2011)

Kaestner e colaboradores (2011) relatam que, em contraste com outros mecanismos do ciclo celular, o ponto de checagem do fuso mitótico é essencial para viabilidade celular. Embora os dados no presente trabalho, não foram

significativos para a porcentagem de células viáveis utilizando o método de exclusão azul de tripan, estes foram significativos para a redução na proliferação celular e na capacidade clonogênica, métodos estes que podem inferir sobre a viabilidade celular (Kops et al., 2004, Michel et al. 2004)

Adicionalmente, Michel et al. (2004) demonstraram que o silenciamento de *MAD2* induziu rápida perda na capacidade proliferativa e quase perda completa de viabilidade em células somáticas, analisado pelo separador de células ativada por fluorescência (FACS), mostrando que este gene também é exigido na viabilidade de células somáticas (Michel et al., 2004). Apoiando estes dados, foi observado uma perda de viabilidade celular na linhagem de carcinoma cervical, HeLa e na linhagem de glioblastoma, T98G, quando inibidos os genes *BUBR1* e *MAD2* (Kops et al., 2004)

No presente trabalho, houve um decréscimo na capacidade clonogênica tanto no silenciamento de *BUBR1* como de *BUB1*. O silenciamento de *BUBR1* e *MAD2* também revelou ser capaz de impedir a formação de colônias em linhagem de tumor cervical e de glioblastoma T98G, no entanto, a inibição de *MAD2* reduziu apenas em torno de 50%, as colônias em linhagem de carcinoma de colon (Kops et al. 2004; Kaestner et al. 2011). Esta diminuição também tem sido relatada no silenciamento de *MPS-1* em linhagem de tumor colorretal (Kwiatkowski et al., 2010). Estes dados sugerem a importância do papel das proteínas do *checkpoint* mitótico na capacidade das células em formar colônias.

Além disso, a progressão na mitose é mediada pelo ponto de checagem do fuso mitótico que atrasa a separação das cromátides e a saída da fase mitótica, na presença de cinetócoros não ligados ao fuso, demonstrando assim a relevância destas proteínas no ciclo celular (Rieder, 2011). Nossos dados demonstraram diferença significativa entre as fases G1 e G2/M, quando analisados os tratamentos com siRNAs acoplados ao TMZ, nos tempos de 96 e 120 horas comparadas com o controle negativo. Este resultado provavelmente seja decorrente apenas do efeito da droga. Colaborando com este achado, linhagens celulares de carcinoma de colon com *MAD1* silenciado, não apresentaram mudanças significativas em relação à distribuição do ciclo celular, inferindo que a repressão deste gene não é capaz de afetar o ciclo celular (Kienitz et al., 2005).

Algumas drogas que atuam na dinâmica dos microtúbulos, como o nocodazole e o taxol, impedem a saída da célula da mitose, porém a diminuição das proteínas BUB1, BUBR1, MAD2 e MPS1 resultou na saída da mitose mesmo depois do tratamento com tais drogas em células HeLa (Vogel et al., 2007). No entanto, a redução de BUBR1 ou MAD2 permitiu que a células entrassem na anáfase, com muitos cromossomos não alinhados, produzindo na subsequente intérfase, células com uma variedade de anomalias nucleares (Kops et al., 2004). Estes dados sugerem que estas proteínas provavelmente não sejam capazes de alterar a distribuição das células nas fases do ciclo celular, mas podem acarretar em uma anormalidade cromossômica decorrente da falha de ativação do ponto de checagem do fuso mitótico.

A instabilidade cromossômica é característica das células cancerosas, sendo o ponto de checagem do fuso mitótico, uma importante via de sinalização envolvendo a prevenção desta instabilidade (Suijkerbuijk, Kops, 2008; Fang, Zhang, 2011). Uma das consequências da instabilidade cromossômica é a formação de micronúcleos, que juntamente com as aberrações cromossômicas, favorecem a associação entre tais alterações e o risco de desenvolvimento de câncer (Fenech et al., 2011; Kirsch-Volders et al., 2011). No presente trabalho, houve um aumento significativo na quantidade de micronúcleos quando inibido *BUBR1*, demonstrando o importante papel deste gene na instabilidade cromossômica.

Colaborando com estes dados, alguns estudos demonstraram que a inibição de *BUBR1* e *MAD2* pode provocar o aparecimento de anormalidades mitóticas, como micronúcleos, fragmentos e pontes cromossômicas (Kops et al., 2004; Michel et al., 2004). No entanto, vale ressaltar que linhagens celulares derivadas de neoplasias possuem alta instabilidade cromossômica, sendo que no presente trabalho, apesar de observada uma tendência de aumento nas atipias celulares e cromossômicas, não foi encontrada diferenças significativas nestas, quando silenciados os genes *BUB1* e *BUBR1*.

O índice mitótico também foi calculado, porém nenhum tempo analisado de nenhuma das inibições apresentou diferenças em relação ao controle negativo. Contrariamente, alguns trabalhos relataram uma diminuição no índice mitótico quando silenciados genes do ponto de checagem do fuso mitótico (Kienitz et al.,

2005; Vogel et al., 2007). Além disso, trabalhos demonstraram um decréscimo na taxa mitótica, mesmo quando este silenciamento estava associado a drogas, como taxol e nocodazole (Kienitz et al., 2005; Vogel et al., 2007; Kaestner et al., 2011).

Um dos processos responsáveis pela morte celular, eficaz tanto no desenvolvimento quanto na prevenção de neoplasias é a apoptose (Cotter, 2009). Apesar de ser um mecanismo muito importante, o silenciamento do *BUB1* e *BUBR1* não apresentou aumento no número de células apoptóticas, sendo este aumento significativo apenas quando combinado a inibição destes genes e também do controle negativo com a temozolomida. Assim, este efeito pode ser decorrente da metodologia de transfecção que provavelmente sensibiliza a célula para a droga TMZ na linhagem de glioblastoma. Resultado semelhante foi encontrado em células de carcinoma de colon, onde a inibição de *MAD1* não afetou a porcentagem de células em apoptose, porém quando combinado estas células a taxol ou monastrol, observou-se um aumento na apoptose (Kienitz et al., 2005).

Apesar deste resultado semelhante, ainda não está bem elucidado como as proteínas do ponto de checagem do fuso mitótico podem afetar a apoptose. Células de neoplasia de cólon com inibição de *CHK1*, *BUBR1*, *BUB1* e *BUB1* apresentaram um aumento na apoptose dependente de p53, principalmente em células tetraplóides (Vilate et al., 2007).

Corroborando com estes dados, células somáticas humanas, com o *MAD2* inibido, apresentaram um aumento de 69% na taxa de apoptose, após 6 dias da transfecção e células de carcinoma colorretal também apresentaram um aumento na apoptose, com este gene inibido (Michel et al., 2004; Kaestner et al., 2011). Contrariamente, linhagens celulares de câncer gástrico, com silenciamento de *MAD2*, resultaram em uma diminuição na apoptose induzida por cisplatina (Wang et al., 2010). Além disso, alguns estudos utilizando drogas que ocasionaram em um aumento nos níveis de proteínas do ponto de checagem do fuso mitótico, como *BUBR1* e *MAD2*, em linhagem celular de carcinoma de mama e de carcinoma de células escamosas do esôfago, demonstraram um aumento na apoptose (Banerjee et al., 2010; Wang et al., 2012).

Com o interesse de verificar se a inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* poderiam radiosensibilizar as células foram analisadas a proliferação e a capacidade clonogênica destas inibições combinados a irradiação, 7 e 12 dias após a transfecção, respectivamente. Em ambas as técnicas foram encontradas diminuições quando acoplados a irradiação, porém apenas para *BUBR1*, verificou-se um efeito sinérgico quando combinado a irradiação. De acordo com este dado, Rodel et al (2010) demonstraram que a diminuição de *PLK1*, utilizando siRNAs, resultou em uma radiosensibilização em células de carcinoma retal. Esta radiosensibilização também foi reportada quando inibido o gene da *Aurora B*, essencial para progressão mitótica, em linhagens celulares de câncer colorretal e de pulmão (Tao et al., 2008). Além da inibição gênica, a superexpressão de genes também pode acarretar em um aumento na sensibilização à irradiação, como reportado por He e colaboradores (2010) para o gene *Siah* em câncer de mama.

Assim, os resultados encontrados na expressão gênica indicam uma associação entre a hiperexpressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* no processo de carcinogênese de glioblastoma. Os dados obtidos pelos ensaios funcionais indicam a importância das proteínas do controle do fuso mitótico no processo de proliferação, na capacidade clonogênica, assim como no aumento de micronúcleos, inferindo a possibilidade de estas proteínas serem alvos terapêuticos em glioblastoma, porém mais estudos são necessários para reforçar tal ideia.

6. CONCLUSÕES

- Tanto *BUB1* quanto *BUBR1* foram hiperexpressos nas linhagens celulares, nos glioblastomas e nos gliomas de baixo grau em relação à substância branca.
 - A hipoexpressão dos genes *BUB1* e *BUBR1* foi relacionada a uma melhor sobrevida quando analisado o total de todos os pacientes.
 - A inibição dos genes *BUB1* e *BUBR1* através de RNA de interferência na linhagem pediátrica SF188 resultou em uma diminuição da proliferação e da capacidade clonogênica, além de um aumento na apoptose quando combinado com TMZ.
 - Os experimentos com inibições destes genes com ou sem a presença de irradiação acarretou em uma diminuição tanto da proliferação quanto da capacidade clonogênica.
 - Os genes *BUB1* e *BUBR1* podem ser interessantes alvos para o tratamento e o entendimento da biologia do glioblastoma.
-

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarsen FK, Paquier PF, Reddingius RE, Streng IC, Arts WF, Evera-Preesman M, Catsman-Berrevoets CE. Functional outcome after low-grade astrocytoma treatment in childhood. *Cancer*. 2006; 106:396-402.
- Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Limori M, Zhao Y, Yoshida R, Oki E, Yoshinaga K, Matumoto T, Morita M, Sakaguchi Y, Maehara Y. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Science*. 2010; 101, 3: 639-345.
- Argyriou AA, Antonacopoulou A, Iconomou G, Kalofonos HP. Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Mar; 69(3): 199-210.
- Babcock MA, Kostova FV, Guha A, Packer RJ, Pollack IF, Maria BL. Tumors of the Central Nervous System: clinical aspects, molecular mechanisms, unanswered questions, and future research directions. *Journal of Child Neurology*. 2008; 23: 1103-1121.
- Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in Molecular Medicine*. 2011 Mar 14.
- Banerjee M, Singh P, Panda D. Curcumin suppresses the dynamic instability of microtubules, activates the mitotic checkpoint and induces apoptosis in MCF-7 cells. *FEBS Journal*. 2010; 277, 3437–3448.
- Bax, DA, Little SE, Gaspar N, Perryman L, Marshall L, Viana-Pereira M, Jones TA, Williams RD, Grigoriadis A, Vassal G, Workman P, Sheer D, Reis RM, Pearson ADJ, Hargrave D, Jones C. Molecular and Phenotypic Characterisation of Paediatric Glioma Cell Lines as Models for Preclinical Drug Development. 2009; 4: 1-9.
- Beckman RA, Loeb IA. Genetic instability in cancer: Theory and experiment. *Seminars in Cancer Biology*. 2005; 15 423–435.
- Bie L, Zhao G, Rondeau G, Porwollik S, Ju Y, Xia X, McClelland M. The accuracy of survival time prediction for patients with glioma is improved by measuring mitotic spindle checkpoint gene expression. *Plos ONE*. 2011; 6, 10.
- Bohers E, Sarafan-Vasseur N, Drouet A, Paresy M, Latouche JB, Flaman JM, Sesboué E, Frebourg T. Gradual reduction of BUBR1 protein levels results in premature sister-chromatid separation then in aneuploidy. *Human Genetics* 2008; 124: 473-478.
-

- Bolanos-Garcia VM. Assessment of the mitotic spindle assembly checkpoint (SAC) as the target of anticancer therapies. *Current Cancer Drug Targets*. 2009; 9: 131-141.
- Bolanos-Gracia, VM, Blundell TL. BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. 2011; 36, 3:141-150.
- Boyarchuk Y, SalicA, Dasso M, Arnaoutov A. Bub1 is essential for assembly of the functional inner centromere. *The Journal of Cell Biology*. 2007; 176 (7): 919-928.
- Brandes AA, Tososni A, Enrico F. Glioblastoma in adults. *Critical Review in Oncology/Hematology*. 2008; 67:139-152.
- Brennan C. Genomic Profiles of Glioma. 2011; 11:291-297.
- Bristol RE. Low-Grade Glial Tumors: Are they all the same? *Seminars Pediatric Neurology*. 2009; 16:23-26.
- Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. *Mayo Clinic Proceedings*. 2007; 82 (10): 1271-1286.
- Burum-Auensen E, DeAngelis PM, Schjolberg AR, Roislien J, Mjaland O, Clausen OPF. Reduced level of the spindle checkpoint protein Bub1B is associated with aneuploidy in colorectal cancer. *Cell Proliferation* 2008; 41: 645-659.
- Canman CE. Replication checkpoint: preventing mitotic catastrophe. *Current Biology*. 2001;11(4):R121-4.
- CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008 (March 23, 2012 Revision). Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. website: www.cbtrus.org
- Clarke J, Butowski N, Chang S. Recent Advances in Therapy for Glioblastoma. *Archives of Neurology*. 2010; 67: 279-283
- Collins I, Workman P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *NATURE CHEMICAL BIOLOGY*. 2006; 2 (12): 689-700.
- Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:501-507.
- Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS. Aurora B couples chromosome alignment with
-

- anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of Cell Biology*. 2003; 161: 267-280.
- Fang G, Yu H, Kirschner MW. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes & Development*. 1998; 12: 1871-1883.
- Fang X, Zhang P. Aneuploidy and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2011; doi:10.1016/j.semcdb.2011.03.002.
- Faria C, Miguens J, Antunes JL, Salgado D, Nunes S, Carroso C, Martins MC, Nunes VM, Roque L. Pediatric brain tumors: genetics and clinical outcome. *J Neurosurg Pediatrics*. 2010; 263-270.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455, 81–95.
- Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*. 2003; 534, 65–75.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surrallés J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 2011; 26(1):125-32.
- Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 2007; 448:767-774.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 2006; 1(5): 2315-9.
- Fry AM, Yamano H. APC/C-mediated degradation in early mitosis: how to avoid spindle assembly checkpoint inhibition. *Cell Cycle*. 2006; 5: 1487-1491.
- Fukasawa K. Oncogenes and tumor suppressors take on centrosomes. *Nature Reviews, Cancer*. 2007; 7:911-924.
- Grabsch H, Takeno S, Parsons W, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE, Mueller W. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in the gastric cancer – association with tumor cell proliferation. *Journal of Pathology* 2003; 200: 16-22.
-

- Grant R. Overview: brain tumour diagnosis and management: Royal College of physicians guidelines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75(Suppl II):S18-S23.
- Geigl JB, Obenauf AC, Schwarzbraun T, Speicher MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends in Genetic*. 2008; 24(2): 64-69.
- Gjoerup OV, Wu J, Chandler-Militello D, Williams GL, Zhao J, Chaffhausen B, Jat PS, Roberts TM. Surveillance mechanism linking Bub1 loss to the p53 pathway. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2007; 104 (20): 8334-8339.
- Ha G, Back K, Kim H, Jeong S, Kim C, Mckeon F, Lee C. p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BurR1-mediated phosphorylation. *Cancer Research*. 2007; 67 (15): 7155-7164.
- Hanahan D, Weinberg AR. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- He H, Fokas E, You A, Engenhardt-Cabillic R, An H. Siah1 proteins enhance radiosensitivity of human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2010, 10:403.
- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2001; 61 (5):1957-63
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001; 411(6835):366-74.
- Holland AJ, Cleveland DW. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2009; 10: 478-487.
- Hoyt MA, Totis I, Roberts BT. S. *Cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*. 1991; 66: 507-517.
- Hsieh PC, Chen YK, Tsai KB, Shieh TY, Chang YY, Chang JG, Wu HL, Lin SF. Expression of BUBR1 in human oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109: 257-267.
- Hu K, Lee C, Qiu D, Fotovati A, Davies A, Abu-Ali S, Wai D, Lawlor ER, Triche TJ, Pallen CJ, Dunn SE. siRNA library screen of human kinases and phosphatases identifies polo-like kinase 1 as a promising new target for the
-

- treatment of pediatric rhabdomyosarcomas. *Mol Cancer Ther.* 2009; 8(11): 3024–3035.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistic, 2008. *CA Cancer Journal for Clinicians.* 2008; 58: 71-96.
- Kaestner P, Bastians H, Mitotic drug targets. *J. Cell. Biochem.* 2010; 111: 258–265.
- Kaestner P, Aigner A, Bastians H. Therapeutic targeting of the mitotic spindle checkpoint through nanoparticle-mediated siRNA delivery inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Letters.* 2011; 304: 128–136.
- Kang J, Yang M, Li B, Qi W, Zhang C, Shokat KM, Tomchick DR, Machius M, Yu H. Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1. *Molecular Cell.* 2008; 32: 394-405.
- Kato T, Daigo Y, Aragaki M, Ishikawa K, Sato M, Kondo S, Kaji M. Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients, *Lung Cancer.* 2011 Jan 31.
- Khasraw M, Lassman AB. Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep.* 2010 Jan; 12(1): 26-33.
- Kienitz A, Vogel C, Morales I, Muller R, Bastians H. Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene.* 2005; 24, 4301–4310.
- Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, Lukamowicz M, Gonzalez L, Loock K V, Decordier I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol.* 2011 May 03
- Kleihues P, Ohgaki H. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicologic Patology.* 2000; 28 (1):167-170.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke IB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 2002; 61 (3): 215-225.
- Kleihues P, Burger PC, Adalpe, KD, Brat, DJ, Biernat W, Bigner DD, Nakazato Y, Plate KH, Giangaspero F, Deimling AV, Ohgaki H, Cavenee WK. Gliolastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiesther OD, Cavenee WK. (Eds) WHO
-

- classification of tumors of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 4th ed., 2007a; pp. 33-49.
- Kleihues P, Louis DN, Wiesther OD, Burger PC, Scheithauer BW. WHO grading of tumors of the central nervous system In: Louis DN, Ohgaki H, Wiesther OD, Cavenee WK. (Eds) WHO classification of tumors of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 4th ed., 2007b; 10-11.
- Kops GJPL, Foltz DR, Cleveland DW. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint, PNAS.2004; 101 (23):8699–8704.
- Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Nature Reviews. 2005; 5:773-785.
- Kwiatkowski N, Jelluma N, Filippakopoulos P, Soundararajan M, Manak MS, Kwon M, Choi HG, Sim T, Deveraux QL, Rottmann S, Pellman D, Shah JV, Kops GJPL, Knapp S, Gray NS. Small Molecule Kinase Inhibitors Provide Insight into Mps1 Cell Cycle Function. Nat Chem Biol. 2010; 6 (5): 359–368.
- Lapenn S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. Nature Reviews. 2009; 8: 547-566.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human. Cancers Nature. 1998; 396:643-649.
- Li R, Murray AW. Feedback control of mitosis in budding yeast. Cell. 1991; 66: 519-531.
- Lim SK, Llaguno SRA, McKay RM, Parada LF. Glioblastoma multiforme: a perspective on recent findings in human cancer and mouse models. BMB reports. 2011 Feb 26.
- Lira RCP, Miranda FA, Guimaraes MCM, Simoes RT, Donadi EA, Soares CP, Soares EG. BUBR1 expression in benign oral lesions and squamous cell carcinomas: Correlation with human papillomavirus. Oncology Reports. 2010; 23: 1027-1036.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402-8.
-

- Lopes CS, Sunkel CA. The spindle checkpoint: From Normal cell Division to Tumorigenesis. *Archives of Medical Research*. 2003;34:155-165.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System *Acta Neuropathol*. 2007; 114:97–109.
- MacDonald TJ, Aguilera D, Kramm CM. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. *Neuro-Oncology*. 2011; 1-10.
- Marchetti F, Venkatachalam S. The multiple roles of Bub1 in chromosome segregation during mitosis and meiosis. *Cell Cycle*. 2010; 9,1: 58-63
- May KM, Hardwick KG. The spindle checkpoint. *Journal of Cell Science*. 2006; 119 (20): 4139-4142.
- Medina-Redondo M, Meraldi P. A life outside kinetochores for Bub1 kinases? *Cell Cycle*, 2009; 8,2: 3250-3256.
- Meraldi P, Sorger PK. A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *The EMBO Journal*. 2005; 24 (8): 1621-1633.
- Mhaidat N M, Zhang X D, Allen J, Avery-Kiejda K A Scott R J, Hersey P. Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res*. 2007; 97 (9): 1225-1233.
- Michel L, Diaz-Rodriguez E, Narayan G, Hernando E, Murty VVVS, Benezra R. Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells, *PNAS*. 2004; 101 (13): 4459–4464.
- Musacchio A, Hardwick KG. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:731-41.
- Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature Reviews, Cancer*. 2006; 6:369-381.
- Niikura Y, Dixit A, Scott R, Perkins G, Kitagawa K. BUB1 mediation of caspase-independent mitotic death determines cell fate. *The Journal of Cell Biology*. 2007; 178 (2): 283-296.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*. 2007; 170(5):1445-1453.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*. 2009 Dec; 100(12): 2235-41.
-

- Ouyang B, Lan Z, Meadows J, Pan H, Fukasawa K, Li W, Dai W. Human Bub1: A Putative Spindle Checkpoint Kinase Closely linked to Cell Proliferation. *Cell Growth & Differentiation*. 1998; 9: 877-885.
- Park HY, Jeon YK, Shin HJ, Kim IJ, Kang HC, Jeong SJ, Chung DH, Lee CW. Differential promoter methylation may be a key molecular mechanism in regulating BubR1 expression in cancer cells. *Experimental and Molecular Medicine* 2007; 39 (2): 195-204.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321:1807 –12
- Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Asamowicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D, Lowe J, Gajjar A, Zhao W, Broniscer A, Ellison DW, Grundy RG, Baker SJ. integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 28, 18: 3061-3068.
- Pinto M, Vieira J, Ribeiro FR, Soares MJ, Henrique R, Oliveira J, Jeronimo C, Teixeira MR. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1 and BUBR1 is associated with genomic complexity in clear cell kidney carcinomas. *Cellular Oncology*. 2008; 30: 389-395.
- Reddy AT, Wellons JC, III. Pediatric high-grade gliomas. *Cancer J* . 2003;9:107 – 112.
- Reifenberger G, Blümcke I, Pietsch T, Werner P. Pathology and classification of tumors of the nervous system. In: Tonn JC, Westphal M, Rutka JT, Grossman SA. *Neuro-Oncology of CNS Tumors*, Springer, 2006; pp. 3-72.
- Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertegna X, Clauser e, Bertherat. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumor and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *Journal of clinical oncology*. 2009; 27: 1108-1115.
- Ricke, RM, Jeganathan, KB, Deursen JM. Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation *J. Cell Biol* 2011, 6: 1-16
- Rieder CL. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res*. 2011; 19:291–306.
-

- Rischitor PE, May KM, Hardwick KG. Bub1 is a fission yeast kinetochore scaffold protein, and is sufficient to recruit other spindle checkpoint proteins to ectopic sites on chromosomes. *Plos One* 2007; 12 (e1342): 1-6.
- Rizzardi C, Torelli L, Barresi E, Schneider M, Canzonieri V, Biasotto M, Lenarda RD, Melato M. Bubr1 Expression In Oral Squamous Cell Carcinoma And Its Relationship To Tumor Stage And Survival. *Head Neck*. 2011; 33(5):727-33.
- Rodel F, Keppner S, Capalbo G, Bashary R, Kaufmann M, Rodel C, Strebhardt K, Spankuch B. Polo-Like Kinase 1 as Predictive Marker and Therapeutic Target for Radiotherapy in Rectal Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2010, 177, 2: 000-000
- Schliekelman M, Cowley DO, O'Quinn R, Oliver TG, Lu L, Salmon ED, Dyle TV. Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function to aneuploidy and tumorigenesis *Cancer Research*. 2009; 69 (1): 45-54.
- Silva P, Barbosa J, Nascimento AV, Faria J, Reis R, Bousbaa. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Proliferation*. 2011; 44:391-400.
- Spencer SL, Gerety RA, Pienta KJ, Forrest S. Modeling Somatic Evolution in Tumorigenesis. *PLoS Comput Biol*. 2006; 2(8): e108, 0939-0947.
- Stark A, Nabavi A, Mehdorn A, Blömer U. Glioblastoma multiforme: report of 267 cases treated at a single institution. *Surg Neurol*. 2005;63:62-196.
- Stupp R, Mason WP, Van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England of Journal Medicine*. 2005; 352:987-986.
- Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Anaplastic astrocytoma in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2007; 63: 72–80.
- Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of Cell Bioloy*. 2001; 154: 925-936.
- Suijkerbuijk SJE, Kops GJPL. Preventing aneuploidy: The contribution of mitotic checkpoint proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1786: 24-31.
-

- Tao Y, Zhang P, Frascogna V, Lecluse Y, Auperin A, Bourhis J, Deutsch E. Enhancement of radiation response by inhibition of Aurora-A kinase using siRNA or a selective Aurora kinase inhibitor PHA680632 in p53-deficient cancer cells. *Br J Cancer*. 2007; 97, 12:1664-1672.
- Tao Y, Zhang P, Girdler F, Frascogna V, Castedo M, Bourhis J, Kroemer G, Deutsch E. Enhancement of radiation response in p53-deficient cancer cells by the Aurora-B kinase inhibitor AZD1152. *Oncogene*. 2008; 27, 23:3244-55.
- Tchoghandjian A, Fernandez C, Colin C, Ayachi IE, Voutsinos-Porche B, Fina F, Scavarda D, Piercecchi-Marti M, Intagliata D, Ouafik L, Fraslon-Vanhulle C, Figarella-Branger D. Pilocytic astrocytoma of the optic pathway: a tumour deriving from radial glia cells with a specific gene signature. *Brain*. 2009; 1-13.
- Tran B, Rosenthal MA. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2010; 17:417-421.
- Vitale I, Galluzzi L, Vivet S, Nanty L, Dessen P, Senovilla L, Olaussen KA, Lazar V, Prudhomme M, Golsteyn RM, Castedo M, Kroemer G. Inhibition of Chk1 Kills Tetraploid Tumor Cells through a p53-Dependent Pathway. *PLoS ONE*. 2007; 2(12), e1337.
- Vogel C, Hager C, Bastians H. Mechanisms of Mitotic Cell Death Induced by chemotherapy-Mediated G2 Checkpoint Abrogation *Cancer Res*. 2007; 67; 339-345.
- Zuckerman JE, Hsueh T, Koya RC, Davis ME, Ribas A. siRNA Knockdown of Ribonucleotide Reductase Inhibits Melanoma Cell Line Proliferation Alone or Synergistically with Temozolomide. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011; 131, 453–460.
- Wang L, Yin F, Du Y, Chen B, Liang S, Zhang Y, Du W, Wu K, Ding J, Fan D. Depression of MAD2 inhibits apoptosis and increases proliferation and multidrug resistance in gastric cancer cells by regulating the activation of phosphorylated survivin. *Tumor Biol*. 2010; 31:225–232.
- Wang L, Guo B, Wang R, Jiang Y, Qin S, Liang S, Zhao Y, Guo W, Li K, Fan X. Inhibition of cell growth and up-regulation of MAD2 in human oesophageal squamous cell carcinoma after treatment with the Src/Abl inhibitor dasatinib. *Clinical Science*. 2012; 122, 13–24.
-

- Wang X, Cheung HW, Chun ACS, Jin D, Wong Y. Mitotic checkpoint defects in human cancers and their implications to chemotherapy. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13: 2103-2114.
- Weaver BAA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer? *Current Opinion in Cell Biology*. 2006; 18:658-667.
- Wei L, Liang X, Zhang Q, Li M, Yuan J, Li S, Sun S, Ouyang Y, Schatten H, Suri Q. BubR1 is a spindle assembly checkpoint protein regulating meiotic cell cycle progression of mouse oocyte. *Cell Cycle*. 2010; 9, 5:1112-1121.
-