Raquel Bernardeth de Almeida

Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano

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

São Paulo
2010

Raquel Bernardeth de Almeida

Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli

São Paulo

2010

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

reprodução não autorizada pelo autor

Almeida, Raquel Bernardeth.

Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano / Raquel Bernardeth Almeida. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Gláucia Maria Machado Santelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da Célula Tumoral

Versão do título para o inglês: A inhibition effects in proliferation and morphology in cells derivated of Hepatocellular Carcinoma.

Descritores: 1. Hepatocarcinoma 2. Aurora A 3. Ciclo celular 4. Citoesqueleto 5. Aberrações nucleares 6. Apoptose I. Santelli, Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós Graduação em Biologia da Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0120/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raquel Bernardeth Almeida.

Título da Dissertação: Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano.

Orientador(a): Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos melhores professores que eu poderia ter em toda a minha vida, meus pais Sebastião Rodrigues de Almeida e Nelsa Caserta de Almeida, e irmãos Cássia, Fátima, Sílvia e Vagner, pela confiança depositada em mim e pela dedicação sem fim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli pelo acolhimento em seu laboratório, pela amizade e por toda a orientação durante todo o período da pós-graduação.

À Marisa Ionta, pela amizade e por todo o auxílio fornecido a mim durante o período da minha formação, desde a graduação.

Aos professores Patrícia Gama, Estela Bevilacqua e Ruy Jaeger pela permissão concedida para uso de equipamentos em seus laboratórios.

Aos professores Maria Inês e Sérgio Oliveira pela amizade e por todo o ensinamento durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino.

Ao Roberto Cabado, pelo trabalho gráfico, que contribuiu muito para o enriquecimento desta dissertação.

À Dona Nancy, por todo o suporte técnico, pelas broncas necessárias e também por todas as orações que fez por mim em momentos difíceis. Muito obrigada, serei eternamente grata por tudo.

À Celiana, que sempre se disponibilizou a me ajudar prontamente nos momentos em que precisei de informações.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB-I pelas informações transmitidas de forma eficiente.

A minha tão querida amiga e irmã Amandita, por tudo...experimentos em que me ajudou, pelas conversas todas, sejam dentro ou fora de hora, pelas broncas e acima de tudo pela eterna amizade, que começou no BioCeM e que levarei para sempre comigo.

A minha amigaça Mari, pela amizade de longos anos, desde as aulas de bio na graduação. Agradeço por tudo que representa e por tudo que fez por mim, seja amizade ou ajuda...inclusive e principalmente em discussões filosóficas sobre o universo paralelo das Auroras quinases.

A minha amiga mais comunicativa, Camis, que passou comigo todos os momentos da minha pós-graduação e que contribui imensamente, principalmente psicologicamente.

Ao meu querido amigo Evandro, que com certeza também merece uma homenagem separada, já que me auxiliou de forma precisa durante a pós, e que é para mim como um irmão.

Aos demais amigos ou ex amigos de laboratório Adam, André, Bia C., Chris, Ciça, Fábio, Humberto, Ísis, Jônatas, Luciana, Lurdes, Marco, Michelle, Paula, Stefânia, Vanessa e Vivian, pelos momentos agradabilíssimos no BioCeM.

À Ana, Ariane (Ari), Luciana (Lu), Priscila (Pri), Tatiane (Tatilene) e Vivian (Bibi), amigas extra-laboratoriais por todas as trocas de informação e risadas durante os horários de almoço ou demais eventos do departamento.

Aos meus demais entes queridos, sejam parentes ou amigos, que estiveram comigo, apoiando-me mesmo quando ausente e suportando-me quando eu mesma me considerava insuportável.

À Fapesp, ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

ALMEIDA, R. B. **Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano.** 2010. 813 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é o mais comum tumor maligno primário do fígado. Apesar dos amplos estudos realizados com HCC, este tipo de carcinoma apresenta baixa resposta ao tratamento convencional. Aurora A é importante durante o ciclo celular, incluindo a maturação centrossômica e sua separação, entrada em mitose, montagem de fuso bipolar, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e citocinese. Expressão alterada de Aurora A tem sido associada com o desenvolvimento do tumor e sua superexpressão ocorre em 60% dos HCCs, sendo considerado um marcador de agressividade. Recentemente, inibidores de Aurora quinases têm sido propostos como drogas antitumorais. 4(4'-Benzamidoanilina)-6,7dimetoxiquizanolina, BADIM, é um recém desenvolvido inibidor da Aurora e seu papel não está bem estabelecido. Nosso estudo investigou os efeitos deste inibidor na linhagem celular HepG2, derivada de HCC. Os tratamentos foram feitos com 300, 600 e 1200nm de BADIM por 24 e 48h. Células tratadas mostraram através de ensaios de citometria de fluxo uma diminuição no seu número em relação ao grupo controle. As culturas tratadas mostravam diminuição do numero de células com aumento nas freqüências de células tetraplóides e parada em G2/M do ciclo celular. Alterações nos microtúbulos foram notadas, como fuso monopolar e extensões incomuns contendo microtúbulos entre as células-filhas, aumento no número de células gigantes e binucleadas, observadas por imunofluorescência. Divisões celulares aberrantes, principalmente metáfases com incorreto alinhamento cromossômico, foram observadas por ensaios de citoquímica fluorescente em todas as concentrações da droga, quando comparadas aos controles. Maiores freqüências de células apoptóticas foram observadas quando células foram submetidas às concentrações mais elevadas de BADIM, como mostraram a técnicas de TUNEL e ensaio para Caspase 9. Portanto, este inibidor é um agente promissor para estudos em HCC, pois atua em pontos críticos relacionados com a tumorigênese.

Palavras-chave: Hepatocarcinoma. Aurora-A. Ciclo celular. Citoesqueleto. Aberrações nucleares. Apoptose.

ALMEIDA, R. B. **Aurora A inhibition effects in proliferation and morphology in cells derivated of Hepatocellular Carcinoma.** 2010. 81 p. Master thesis (Cell Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant tumor of liver. Despite the wide studies performed with HCC, this type of carcinoma has low response to conventional treatment. Aurora A is very important during cell cycle, including centrosome maturation and separation, mitotic entry, bipolar-spindle assembly, chromosome alignment on metaphase plate and cytokinesis. Altered expression of Aurora A has been associated with tumor development. Aurora A overexpression occurs in 60% of HCC and has been considered an aggressiveness marker. Recently, Aurora kinases inhibitors have been proposed as antitumoral drugs, one of the effects is the cell cycle arrest. 4'-(4'-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxyquinoxalina is an Aurora inhibitor, however its role is not well established. Our study aimed to investigate the effects of this inhibitor in HCC cell line, HepG2. Cell line was treated with 300nM, 600nM and 1200nM of inhibitor for 24 and 48h. Cultures treated with Aurora Kinase inhibitor showed decreased number of cells compared to control. Higher frequencies of tetraploid cells and G2/M arrested cells were observed. Microtubules alterations were noted, as monopolar spindle and uncommon tubulin extensions between daughter, as well increased number of giant cells and binucleated cells, were observed by immunofluorescence. Aberrant cell divisions, mainly metaphases showing incorrect chromosome alignment, were observed in all drug concentrations by fluorescent cytochemistry. Caspase 9 assay and TUNEL technique evidenced that 1200nM of Badim was associated with high frequencies of apoptosis. Therefore this inhibitor is a promising agent for studies in HCC, since it acts at critical points related to tumorigenesis.

Key words: Hepatocellular carcinoma. Aurora A. Cell cycle. Cytoskeleton. Nuclear aberrations. Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Curva de crescimento da linhagem HepG2.....	31
Figura 2 – Morfologia celular da linhagem HepG2.....	32
Figura 3 – Morfologia celular após 24 horas de tratamento com inibidor de Aurora quinase	33
Figura 4 – Morfologia celular após 48 horas de tratamento com inibidor de Aurora quinase	35
Figura 5 – Gráfico de viabilidade de células testadas com diferentes concentrações do inibidor de Aurora quinase durante o período de 24 horas.....	37
Figura 6 - Gráfico de viabilidade de células testadas com diferentes concentrações do inibidor de Aurora quinase durante o período de 48 horas.....	37
Figura 7 – Quantificação de DNA por análise de imagem em diferentes concentrações do inibidor de Aurora quinase durante o período de 24 horas.....	40
Figura 8 - Quantificação de DNA por análise de imagem em diferentes concentrações do inibidor de Aurora quinase durante o período de 48 horas.....	40
Figura 9 - Quantificação de DNA por citometria de fluxo em diferentes concentrações do inibidor de Aurora quinase durante o período de 24 horas.....	42
Figura 10 – Quantificação de DNA por citometria de fluxo em diferentes concentrações do inibidor de Aurora quinase durante o período de 48 horas.....	43
Figura 11 – Alterações do citoesqueleto de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 8 horas.....	49

Figura 12 – Alterações do citoesqueleto de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 24 horas.....	51
Figura 13 – Alterações do citoesqueleto de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 48 horas.....	52
Figura 14 – Alterações do citoesqueleto de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 48 horas.....	52
Figura 15 – Alterações do citoesqueleto de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 48 horas.....	53
Figura 16 – Alterações nucleares observadas após 8, 24 e 48 horas de tratamento.....	56
Figura 17 – Gráfico de frequência de células marcadas por TUNEL nos tempos de 24 e 48 horas de tratamento.....	61
Figura 18 – Marcação de Caspase 9 ativada após 24 horas de tratamento.....	63
Figura 19 – Marcação de Caspase 9 ativada após 48 horas de tratamento.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência na distribuição de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 24 horas em diferentes concentrações ao longo das fases do ciclo celular de acordo com citometria de fluxo.....	46
Tabela 2 – Frequência na distribuição de células HepG2 tratadas com inibidor de Aurora quinase por 48 horas em diferentes concentrações ao longo das fases do ciclo celular de acordo com citometria de fluxo.....	47
Tabela 3 – Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com inibidor de Aurora quinase por 8 horas.....	57
Tabela 4 – Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com inibidor de Aurora quinase por 24 horas.....	58
Tabela 5 – Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com inibidor de Aurora quinase por 48 horas.....	59
Tabela 6 – Frequência de células em apoptose após tratamento com inibidor de Aurora quinase por 24 e 48 horas.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Tumorigênese e controle do ciclo celular	15
1.2	Alterações nucleares.....	18
1.3	Aurora Quinase.....	19
1.4	Citoesqueleto e terapias antitumorais.....	21
2	OBJETIVOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Linhagem Celular e condições de tratamento	26
3.2	Inibidor de Aurora Quinase 4'-(4'-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxyquizanolina (BADIM).....	26
3.3	Tratamento	26
3.4	Curva de crescimento	27
3.5	Avaliação de Proliferação Celular.....	27
3.6	Quantificação de DNA por Citometria de Fluxo.....	27
3.7	Reações de imunofluorescência para Citoesqueleto	28
3.8	Análise de Ploidia por análise de imagem	29
3.9	Análise de Morte Celular	29
4	RESULTADOS.....	31
4.1	Curva de crescimento	31
4.2	Morfologia Celular	32
4.3	Ação do Inibidor BADIM sobre proliferação celular.....	36
4.4	Ploidia/Ciclo Celular	38
4.5	Alterações Morfológicas	48
4.6	Alterações Nucleares	54
4.7	Morte Celular Programada.....	60
5	DISCUSSÃO	65
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O fígado é considerado a maior glândula do organismo e tem como unidade funcional o lóbulo hepático, o qual é constituído principalmente por cordões de hepatócitos, dentre as quais passam os capilares sinusóides, o que permite intensa troca de substâncias entre hepatócitos e sangue. As células ovais, também conhecidas como células estreladas correspondem às células tronco deste órgão (KIERSZEMBAUM, 2004). Em condições normais, os hepatócitos e células estreladas desempenham suas funções de metabolização de substâncias ou ainda o armazenamento de moléculas como o glicogênio e vitamina A (KIERSZEMBAUM, 2004). Além disso, os hepatócitos ou células estreladas podem estar quiescentes ou ativar processos de proliferação ou morte celular. Desordem nestes processos pode contribuir para a tumorigênese, levando a formação do Hepatocarcinoma (HCC).

O HCC representa o quinto tipo mais freqüente de câncer no mundo, e o terceiro em relação à causa *mortis* no mundo (LLOVET et al., 2003; SARBAH et al., 2004; FENG et al., 2005; SHIN, 2006; CHENG et al., 2009; LLOVET et al., 2009). Em 80% dos casos, a doença está relacionada com infecção viral crônica (hepatite B ou C). Sabe-se ainda que o risco de desenvolver HCC após contrair HBV aumenta aproximadamente de 5 a 15 vezes (El SERAG e RUDOLPH, 2007), e em relação ao HCV este aumento é de 11,5 a 17 vezes (DONATO et al., 2001).

Na infecção por HBV, que é bem conhecida, sabe-se que ocorre a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, fato que contribui para a instabilidade genética. Estudos mostram que a inserção de genoma viral na região promotora do gene *p16* induz a produção de oncoproteínas como, por exemplo, a HBx (KREMNSDORF et al., 2006; ZUCMAN-ROSSI e LAURENT-PUIG, 2007). A HBx é uma proteína que aumenta a expressão gênica e, conseqüentemente, a replicação do vírus por transativação de seu promotor celular (KREMNSDORF et al., 2006). A ação desta proteína é evidenciada como um evento para o desenvolvimento do HCC, uma vez que está diretamente

envolvida com a inibição gênica da proteína *p53*, a qual realiza funções importantes no controle do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e supressão tumoral (KREMSDORF et al., 2006; FARAZI e DEPINHO, 2006). Além disso, HBx foi associada a esteatose, processo esse considerado como um importante co-fator para o desenvolvimento do HCC (KIM et al., 2007).

A infecção por HCV afeta aproximadamente 130 milhões de indivíduos no mundo todo e permanece como a maior causa de doenças hepáticas (SHEPARD et al., 2005). Na maioria dos casos (60-85%), HCV progride para doenças crônicas hepáticas, como esteatose, cirrose e HCC (SHEPARD et al., 2005). Sabe-se que a infecção por este vírus pode levar a problemas na via de apoptose e transdução de sinais, além de contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio e problemas no metabolismo de lipídeos e ativação transcricional (ANZOLA, 2004; IRSHAD e DHAR, 2006). As proteínas desse vírus podem ainda associar-se a proteínas supressoras tumorais, como *p53*, *p73* e *pRb*, fazendo com que estas deixem de ser responsivas as suas funções, tais como o bloqueio do ciclo celular (ALISI et al., 2003; BENARD et al., 2003) e modulação da expressão da quinase dependente de ciclina *p21*, que é importante para o controle da formação tumoral (YAMANAKA et al., 2002; KWUN e JANG, 2003). Devido à importância destes eventos para homeostase celular, a infecção por HCV, bem como por HBV pode contribuir para instabilidade genética, o que por sua vez irá contribuir para o desenvolvimento do HCC.

Em adição às infecções virais crônicas, outros fatores também contribuem para o processo de carcinogênese hepática como o consumo excessivo de álcool, *diabetes mellitus*, exposição à Aflatoxina B1 e a inalação de fumaça de cigarro (CHEN et al., 1997; HASSAN et al., 2002; MATSUO, 2003; KULKARNI et al., 2004; MCKILLOP e SCHRUM, 2005).

Outro fator de risco para o desenvolvimento do HCC é a cirrose, que é observada em cerca de 80% a 90% dos pacientes afetados por tal doença e está geralmente associada com infecção por HCV ou por consumo excessivo de álcool (FARAZI e DePINHO, 2006). O uso crônico de álcool pode causar a

produção de citocinas através da ativação de monócitos (MCCLAIN et al., 2002), provocando aumento nas concentrações de endotoxinas circulantes, como $\text{TNF}\alpha$, Interleucina- 1β e Interleucina 6. Além disso, também pode ativar prostaglandina E que por sua vez ativam as células de Kupffer, liberando citocinas responsáveis por causar um efeito adverso à sobrevivência de hepatócitos. Sabe-se que hepatócitos submetidos à freqüente exposição ao álcool apresentam aumento na sensibilidade a efeitos citotóxicos do $\text{TNF}\alpha$, o qual inicia o estágio de substituição destas células através de processo regenerativo intenso por meio de ativação de células estreladas. Este processo repetitivo de substituição de hepatócitos pode contribuir para o processo cirrótico, que é caracterizado como formação de nódulos anormais no fígado seguido por deposição de fibras de colágeno pelas células estreladas (FARAZI e DEPINHO, 2006). Nódulos hiperplásicos podem evoluir, devido a sua instabilidade genética, para nódulos displásicos e estes por sua vez, com marcante instabilidade genética e perda de p53, podem evoluir para o HCC (FARAZI e DEPINHO, 2006).

A patogênese do HCC pode envolver, portanto, eventos genéticos e epigenéticos que podem induzir alterações em hepatócitos ou ainda em suas células precursoras. Tais alterações favorecem desequilíbrios entre os processos de proliferação celular e apoptose, contribuindo para a hepatocarcinogênese (THORGEIRSSON, 2002; VOLGELSTEIN e KINZLER, 2004; VILLANUEVA et al., 2007).

1.1 Tumorigênese e controle do ciclo celular

A hepatocarcinogênese, bem como o desenvolvimento de outros tumores tem seu ponto de início a partir de problemas no controle do ciclo celular, mecanismo intrincado que envolve a formação seqüencial, ativação e conseqüente inativação de uma série de complexos protéicos, os quais são constituídos por uma subunidade catalítica (proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina – cdk) associada a uma subunidade regulatória, a ciclina

(MORGAN, 1995; BROWN et al., 2003). Alguns complexos ciclina/cdk estão diretamente envolvidos na maquinaria de progressão do ciclo celular (ciclina D-cdk 4/6, ciclina E-cdk2, ciclina A-cdk2, ciclina A-cdk1 e ciclina B-cdk1), enquanto outros o fazem de modo indireto através da ativação da transcrição gênica que envolve a fosforilação do domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II pelos complexos ciclina H-cdk 7 e ciclina T-cdk9 (SHAPIRO, 2006). Existem ainda as proteínas que inibem a formação e/ou atividade dos complexos cdk-ciclina, as quais contribuem na regulação negativa do ciclo.

Em resposta a estímulos mitogênicos, as células sintetizam ciclina D que se associam às cdks 4 e 6. A progressão pela fase G1, bem como a transição G1/S envolve a formação dos complexos ciclinas D-cdk4/6 e ciclina E/cdk2 que fosforilam seqüencialmente a proteína retinoblastoma (Rb), que hiperfosforilada, libera o fator de transcrição E2F. Dessa forma genes necessários à entrada em S são transcritos. A progressão pela fase S e a transição S/ G2 depende da ativação do complexo ciclina A-cdk2 e a transição G2/M ocorre quando os complexos ciclina A-cdk1 e ciclina B-cdk1 são formados. O retorno à fase G1 ocorre pela degradação das ciclinas A e B e conseqüente inativação da cdk1. Na ausência de sinais que estimulam a progressão do ciclo, a transição G1/S é bloqueada devido ao seqüestro de E2F pela proteína Rb. O complexo Rb-E2F não apenas bloqueia a atividade transcricional de E2F como também impede o recrutamento de desacetilases de histona para as regiões promotoras dos genes que são essenciais à entrada na fase S (SHAPIRO, 2006).

A atividade das proteínas inibidoras de cdks (CKIs) contribui para regular negativamente o ciclo celular, pois são capazes de inativar os complexos cdk-ciclina ou impedir sua formação (MATSUSHIME et al., 1992; HUNTER e PINES, 1994; SHAPIRO, 2006). Duas classes de CKIs foram identificadas. A primeira é conhecida como INK4 e esta inibe especificamente os complexos ciclina D-cdk4, enquanto a segunda é conhecida como Kip/Cip e inibe a maioria dos complexos ciclina-cdk que se formam ao longo do ciclo (SHEER e ROBERTS, 1999; VIDAL e KOFF, 2000). As proteínas p15, p16, p18 e p19 fazem parte da família INK4, enquanto as proteínas p21, p27 e p57

fazem parte da família Kip/Cip (SERRANO et al., 1993; HANNON e BEACH, 1994; HIRAI et al., 1995). O equilíbrio entre a regulação positiva e negativa do ciclo celular é importante nos organismos multicelulares.

Além disso, ao longo do ciclo existem mecanismos de verificação (pontos de checagem) que permitem o monitoramento em relação à integridade do material genético e sua segregação (LUKAS et al, 2004; HAKEM, 2008). Em G_1/S eventuais danos no DNA são detectados e o ciclo celular é bloqueado até que o reparo tenha sido efetuado. Na fase S, o mecanismo de checagem confere se o conteúdo de DNA foi replicado uma única vez. Em G_2/M há a verificação não só quanto ao término do processo de replicação, mas também quanto à integridade do material genético (LUKAS et al., 2004). O ponto de checagem de M detecta se houve ligação correta do fuso mitótico aos cinetócoros e alinhamento cromossômico na placa metafásica (RIEDER et al., 1994; LI e NICKLAS, 1995).

Os componentes do ponto de checagem mitótico regulam a atividade da ubiquitina ligase, um complexo multiprotéico também conhecido por complexo promotor de anáfase, que induz a degradação das coesinas (proteínas que mantêm as cromátides irmãs paralelas após a replicação do DNA) e das ciclinas mitóticas permitindo assim a separação das cromátides e finalização da mitose (KING et al., 1996).

A perda da regulação normal do ciclo celular é uma característica de cânceres humanos, e falhas nos pontos de checagem mitóticos permitem a propagação de cariótipos anormais com o estabelecimento de um estado de instabilidade genética, que pode contribuir para o processo de tumorigênese (LENGAUER et al., 1998; BHARADWAJ e YU, 2004; CHI e JEANG, 2007).

1.2 Alterações nucleares

Células tumorais em geral apresentam número cromossômico alterado por perda e/ou ganho de cromossomos (aneuploidia) (JALLEPALLI; e LENGAUER, 2001; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002; BHARADWAJ e YU, 2004). Theodor Boveri foi o primeiro cientista a relacionar aneuploidia e formação de tumor. Diversos mecanismos estão envolvidos na determinação de aneuploidias em células tumorais, os quais incluem amplificação cromossômica, erros de alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, anormalidades na montagem do fuso mitótico e falhas no processo de citocinese (NIGG, 2002).

Atualmente, sabe-se que muitos tumores sólidos são aneuplóides e possuem grande instabilidade genética, o que permite a perda ou ganho de cromossomos durante o processo de divisão celular (LENGAUER et al., 1997). Além disso, o número alterado de cromossomos pode culminar em alterações gênicas, as quais por sua vez podem causar alterações no perfil de expressão de proteínas envolvidas em processos importantes para a homeostase celular, como p53, contribuindo desta maneira para o desenvolvimento de transformações malignas (LENGAUER et al., 1997). Além disso, estudos têm evidenciado que a aneuploidia pode funcionar de alguma forma como um supressor de tumor, uma vez que o aumento exacerbado no conteúdo do cariótipo poderia ser reconhecido pela maquinaria de reparo celular que imediatamente ativaria a maquinaria de morte celular programada de forma direta (HEDE, 2005) ou de forma indireta, quando associado ao processo de multinucleação (NAKAGAWA, 2006).

Diversas análises podem ser utilizadas para estudar agentes com potencial genotóxico. Estes danos podem ser causados por fragmentações na cromatina ou ainda por distúrbios na formação dos fusos mitóticos, gerando, portanto células com distúrbios nos passos finais da divisão celular.

1.3 Aurora Quinase

Na última década, uma família de proteínas conhecidas como serina/treonina quinases Aurora têm sido diretamente associadas com os processos que garantem a segregação equivalente dos cromossomos durante os processos de divisão celular (SAUNDERS et al., 2002; MARUMOTO et al., 2005).

Sabe-se que em mamíferos essa família de proteínas inclui três membros, sendo elas as Auroras A, B e C, cujos genes localizam-se respectivamente nos cromossomos 20q13.2, 17p13.1 e 19q13.43. Altos níveis de expressão de Auroras A e B são observados no final de G2 e ao longo da mitose. Ambas as Auroras estão envolvidas na maturação e separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e citocinese (KUFER et al., 2003; CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005; LENS e VADER, 2008).

A atividade funcional da Aurora C foi a última a ser pesquisada e estudos iniciais mostraram elevados níveis de RNAm em testículo, indicando seu possível envolvimento no processo de gametogênese, fato corroborado pelos experimentos em que camundongos que tiveram o gene da Aurora C nocauteado apresentaram redução na fertilidade (KIMMINS et al., 2006). Além disso, mutações nesse gene foram identificadas em espermatozóides de homens inférteis (DIETERICH et al., 2007). Ainda segundo esses pesquisadores a ausência de expressão da Aurora C não altera o fenótipo das células somáticas sugerindo que as mesmas não sejam relevantes na mitose. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que Aurora C possui atividade funcional semelhante à Aurora B, agindo durante a parte final da mitose, período este em que a mesma é fundamental para as fases de anáfase e citocinese, já que está envolvida na bi-orientação cromossômica, no checkpoint de mitose e na formação do anel contrátil (VADER et al., 2006; LENS e VADER, G., 2008). Foi também mostrado que algumas células tumorais

apresentam expressão elevada de Aurora C (SASAI et al., 2004; YAN et al., 2005).

O mecanismo molecular envolvido na atividade funcional da Aurora A tem sido o foco principal de alguns estudos. A Aurora A está envolvida na maturação centrossômica agindo na fosforilação da proteína TACC (*transforming acidic coiled-coil*), que quando fosforilada é encaminhada à região centrossômica. A TACC forma um complexo com proteínas que se associam à microtúbulos (Mps/XMAP215), estimulando a polimerização dos mesmos (MARUMOTO et al., 2005). Na separação centrossômica, a Aurora A fosforila a HsEg5, proteína motora, auxiliando no processo de migração dos centrossomos para os pólos opostos (CASTILLO et al., 2007). A Aurora A interage com a proteína TPX2 (*targeting protein for XKLP2*), a qual representa não apenas um substrato, mas também um ativador da Aurora A. Tal interação é relevante para a montagem do fuso mitótico. A entrada em mitose ocorre devido a fosforilação da proteína Ajuba pela Aurora A, evento este que recruta os complexos ciclina B-cdk1 responsáveis pela transição G2/M (CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005).

A Aurora A também está envolvida com o alinhamento cromossômico na placa metafásica por promover a fosforilação da proteína CENP-A, cuja ativação é essencial para a composição e organização dos cinetócoros. Assim, essa fosforilação é importante não apenas para a ligação dos microtúbulos, mas também para o alinhamento e segregação cromossômica. A Aurora B participa do processo de ligação dos microtúbulos aos cinetócoros.

Os mecanismos envolvidos na citocinese são regulados pelas Auroras A e B, embora esta última tenha uma participação maior (MARUMOTO et al., 2005). Alterações no padrão de expressão das Auroras determinam anormalidades em vários estágios da mitose que incluem amplificação centrossômica, divisão não equivalente do material genético e falhas na citocinese originando alterações na ploidia (CASTILLO et al., 2007; CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005; DE LUCA et al., 2006), o que contribui para o processo de carcinogênese.

Em estudo recente observou-se que a inibição da expressão de Aurora A por RNA de interferência (RNAi) ou por microinjeção de anticorpos promoveu falhas nos processos de alinhamento e segregação cromossômica, contudo algumas células completaram a divisão mitótica, o que indica falhas no ponto de checagem mitótico. Foram observadas também pontes cromatínicas na telófase, o que contribui para a regressão da citocinese e determinação de tetraploidia ou aneuploidia (HOAR et al., 2007). Shi e King (2005) demonstraram que a regressão da citocinese em células tumorais leva ao surgimento de células tetraplóides, as quais podem originar células aneuplóides nos próximos ciclos de divisão. Esses autores sugerem que a Aurora A pode estar diretamente envolvida na regressão da citocinese.

No fígado, desvios nos valores normais de ploidia estão associados tanto a eventos fisiológicos normais como patológicos incluindo a carcinogênese. Lu et al. (2007) demonstraram que populações de hepatócitos normais poliplóides 4N e 8N são constituídas por células binucleadas (70% e 80%, respectivamente), entretanto não foram observadas alterações no padrão de expressão gênica nessas células poliplóides, ao contrário do que ocorre em hepatocarcinoma, onde se observa desvios de ploidia com alterações no perfil de expressão e, em geral, o conteúdo de DNA é aneuploide e está associado com instabilidade genética.

1.4 Citoesqueleto e terapias antitumorais

Portadores de hepatocarcinoma têm como sobrevida média de um ano. No momento do diagnóstico apenas 40% dos pacientes são candidatos a terapias convencionais que compreendem cirurgia (transplante ou ressecção hepática), quimioterapia e radioterapia. Desta forma, muito tem sido estudado para que novas abordagens terapêuticas sejam aplicadas em pacientes que não são aptos aos tratamentos convencionais.

Algumas moléculas têm sido utilizadas como agentes antitumorais por serem capazes de interferir no ciclo celular agindo de forma direta sobre o citoesqueleto. Estes agentes atuam sobre proteínas que controlam parte da orquestra de eventos que são realizadas pelos microtúbulos, os quais correspondem a um dos principais constituintes do citoesqueleto. Sabe-se que estes têm papel fundamental durante a divisão celular, já que estão relacionados com eventos mitóticos importantíssimos, como o alinhamento cromossômico na placa metafásica e a separação das cromátides irmãs (MITCHISON, 2010). Foi observado que estes agentes antitumorais podem ser alvo-específicos para microtúbulos, uma vez que seu uso causa distúrbios na sua função, podendo ocasionar formação de fusos monopolares ou de forma geral, bloqueio celular da mitose (SAITO, 2009).

Os microtúbulos são estruturas filamentosas compostas por heterodímeros de tubulina α e β . Sua polimerização depende de uma área de nucleação, constituído por polímeros curtos a partir dos quais irá ocorrer o processo conhecido como alongação, no qual ocorre adição não-covalente de novas subunidades, sendo este processo reversível e dinâmico (SAITO, 2009). O processo dinâmico entre polimerização e despolimerização é importante para a divisão celular, sendo necessário para o crescimento e retração dos filamentos de forma que os microtúbulos associem-se aos cinetócoros dos cromossomos e sejam capazes de posteriormente separá-los.

Estudos demonstram que freqüentemente ocorrem alterações no citoesqueleto de células tumorais, o que permite que estas células se tornem hábeis na realização de atividades diferenciadas das células normais, como crescimento anormal, habilidade de aderência a diferentes tecidos e metástase (FRIEDL e BRÖCKER, 2000).

Os microtúbulos são considerados estruturas muito importantes por desenvolver tarefa fundamental na divisão celular. Devido a sua importância neste evento e pela sua função, agentes vem sendo estudados para atuar na sua estrutura, permitindo não só a sua estabilização, como também a sua desestabilização (MITCHISON, 2010).

Alguns compostos foram amplamente pesquisados e são eles conhecidos como venenos do fuso, nome este que se deve ao efeito que causa

no mesmo durante o período de divisão celular. O primeiro agente antimitótico caracterizado foi a colchicina, posteriormente a este, outros alcalóides derivados da vinca como vincristina, vimblastina e vindesina foram descobertos. Sabe-se que estes possuem a capacidade de desestruturar os microtúbulos, impedindo, portanto a sua estabilidade (JOHNSON et al., 1963; SAITO, 2009). Outras substâncias também foram estudadas e mostraram características inversas. Estes agentes são conhecidos como taxóides e são capazes de manter os microtúbulos estáveis (RINGEL e HORWITZ, 1991; MANFREDI e HORWITZ, 1991).

Sabe-se que células submetidas a tratamentos com as drogas supracitadas sofrem bloqueio na fase M, mas que o retorno às condições normais de cultura celular pode causar diferentes efeitos, como continuidade pelo ciclo celular e finalização da divisão, encaminhamento destas células para apoptose ou para a formação de células tetraplóides e/ou aneuplóides por regressão de citocinese (MCGROGAN et al., 2008).

Na última década, novos compostos têm sido testados como agentes antitumorais, que incluem VX680, VE465, PHA680632, AZD1152, MLN8054 e ZM447439. Entretanto, estes agentes não têm como alvo os microtúbulos, mas sim outra proteína diretamente relacionada a desordens durante o ciclo celular, a Aurora A. Testes *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que esses agentes podem inibir as Auroras quinases atuando como agentes anti-mitóticos para a utilização como drogas antitumorais em possíveis terapias (CHENG et al., 2009; EYERS et al., 2007).

Foi observado que os níveis de expressão de Aurora A estão aumentados em 60% dos casos de HCC (KATAYAMA et al., 2003; JENG et al., 2004; MARUMOTO et al., 2005), aspecto que tem sido associado à maior malignidade e pior prognóstico da doença (JENG et al., 2004), fazendo com que esta proteína seja uma possível candidata a terapia alvo-específica. Portanto, compostos específicos para Aurora A têm sido testados quanto a sua habilidade de inibir a atividade de Aurora quinases.

O inibidor VX-680, também conhecido como MK-0457 foi o primeiro inibidor de Aurora quinase a demonstrar amplo efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo*, bem como seu análogo VE-465, o qual reprime a viabilidade de células tumorais derivadas de fígado, interferindo na mitose e causando a formação de mitoses aberrantes, causando o bloqueio do ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose (LIN et al., 2009). Outro composto utilizado para estudos em hepatocarcinoma foi o composto PHA-739358, que também se mostrou efetivo como agente antitumoral (BENTEN et al., 2009).

O composto 4'-(4'-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxyquizanolina (BADIM) foi recentemente desenvolvido e também tem atividade de inibição da aurora quinase (MELMED et al., 2008). Entretanto, a literatura não apresenta informações sobre seus efeitos em HCC. Desta forma, é relevante o estudo mais detalhado dos efeitos desta droga sobre a biologia celular do HCC, enfocando principalmente o ciclo celular para que seja possível o estabelecimento de novas terapias.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos verificar os efeitos do inibidor BADIM sobre o fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano, bem como a indução de bloqueio de fases específicas do ciclo celular, indução de alterações nucleares como binucleações e multinucleações e indução no processo de morte celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem Celular e condições de tratamento

A linhagem celular utilizada foi HepG2, derivada de hepatocarcinoma humano, obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂).

3.2 Inibidor de Aurora Quinase 4'(4'-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxyquizanolina (BADIM)

O inibidor de Aurora quinase, 4'(4'-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxyquizanolina (Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, USA), foi obtido na forma sólida e diluído em tampão PBSA numa concentração de 250µM, considerada solução de estoque. Esta solução estoque foi por sua vez diluída para a concentração de 250nM, a qual foi utilizada para a realização dos experimentos, sendo novamente diluída nas concentrações de uso no dia do tratamento.

3.3 Tratamento

Para os tratamentos, as células foram semeadas em Placas de Petri de 35mm ou 60mm de diâmetro a uma densidade de 3X10⁴ ou 5x10⁴ células/placa. Após 2 dias em cultura, as células foram tratadas por 8h, 24h e 48h com o inibidor BADIM (Merck & Co). As concentrações utilizadas foram

300nM, 600nM e 1200nM. Solução estoque foi preparada em DMSO (250 μ M) e as diluições foram feitas em meio de cultura fresco no dia do tratamento.

3.4 Curva de crescimento

As células foram semeadas em placa de Petri de 35mm com inóculo inicial de 1×10^4 células/placa. As contagens foram realizadas no 3^o, 5^o, 7^o, 9^o dias após plaqueamento.

3.5 Avaliação de Proliferação Celular

Para avaliar proliferação celular, as células foram semeadas em placas de Petri de 35mm com inóculo inicial de 3×10^4 células/placa. Após o período de 48h as células foram submetidas às diferentes condições estudadas, sendo elas Controle, 300nM, 600nM e 1200nM. Nos tempos de interesse, 8, 24 e 48h, suspensões de células foram obtidas por tripsinização. Após inativação da tripsina com meio de cultura, as células foram passadas para tubos cônicos de 1,5ml e contadas por citômetro de fluxo MINI da Guava Technologies. Os resultados foram obtidos em triplicatas.

3.6 Quantificação de DNA por Citometria de Fluxo

A linhagem foi incubada nas condições já mencionadas em placas de Petri de 35 mm durante 48 horas, com inóculo inicial de 3×10^4 células/placa. Após os tratamentos das células, estas foram soltas do fundo das placas por tripsinização. Após neutralização da tripsina com meio de cultura e transferência das células para tubos Falcon de 1 5 mL, a suspensão foi

centrifugada por 7 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi ressuspenso em 1,0 mL de PBSA.

Foram acrescentados 3,0 mL de metanol 100% a 4 °C e, após delicada agitação, os tubos foram colocados no gelo por 1 hora. Foi realizada nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores e, após retirada do sobrenadante, as células foram lavadas com 1,0 mL de PBSA. Após nova centrifugação seguida de retirada do sobrenadante, cada precipitado foi ressuspenso em uma solução contendo 200 µL de PBSA, 20 µL de RNAase (10 mg/mL) e 20 µL de iodeto de propídeo (10 mg/mL). A solução foi delicadamente agitada e deixada no gelo por 1 hora.

Para análise do ciclo celular, o DNA de cada amostra foi quantificado pelo citômetro de fluxo EasyCyte MINI da Guava Technologies. Os resultados foram obtidos em triplicatas.

3.7 Reações de imunofluorescência para Citoesqueleto

As células foram cultivadas por 48 horas em placas de Petri de 35mm, com inóculo inicial de 3×10^4 células/placa. No dia de interesse, as células foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos ou metanol por 10 minutos e permeabilizadas com TRITON X-100 (0,2%) por 10 minutos. Posteriormente anticorpos primários anti- α / β -tubulina (Sigma), Aurora-A (Abcam) foram incubados *overnight* em câmara úmida e escura nas concentrações de 1:100 e 1:200, 1:50 respectivamente. No dia seguinte, as células foram lavadas em PBSA e, em seguida, o anticorpo secundário, IgG anti-*mouse*-FITC (1:100) foi incubado por 1:30h. Após novas lavagens em PBSA, os núcleos foram corados com Iodeto de Propídeo e as lâminas foram montadas em lâminas com *anti-fading* (Vecta-Shield-Vector)

3.8 Análise de Ploidia por análise de imagem

As células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, com inóculo inicial 3×10^4 células/placa. Após 24h e 48h, as células foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1) por 30 minutos. Após 3 lavagens em PBSA, as lamínulas foram completamente secas a temperatura ambiente e montadas com Entellan (MERCK&CO) sobre lâminas com as células voltadas para cima. No dia seguinte, as lâminas foram coradas pela reação de Feulgen (30 minutos em HCL 5N e 1h30min em Reativo de Schiff). Foi realizada uma série de lavagens em água corrente. A quantificação de DNA foi então realizada por análise de imagem com o software CIREs-Kontron, um sistema que converte a medida densitométrica em ploidia de DNA.

3.9 Análise de Morte Celular

As células foram cultivadas em placas de Petri de 35mm de diâmetro com inóculo inicial de 3×10^4 células/placa. Após 48 horas em crescimento as células foram tratadas pelo período de 24h e 48h com inibidor de Aurora quinase nas concentrações supracitadas. Após períodos de tratamento, as células foram submetidas à dissociação enzimática por tripsina/EDTA. As células foram fixadas em formol 3,7 por 30 minutos e permeabilizadas em Triton X-100 por 10 minutos. Após permeabilização as lâminas foram preparadas por citocentrifugação nas seguintes condições: 1000rpm em 1 minuto. Foram lavadas em PBSA e incubadas em 37 °C em solução contendo 1µl de enzima e 4µl de tampão, para reação de *TUNEL*. Após uma hora, as células foram coradas com Sytox-Green e analisadas.

Para realização de Caspase 9, células foram soltas do substrato, contadas e deixadas em suspensão com concentração mínima de 1×10^5 células/mL. Em um volume de 100 µL de cada amostra, foram adicionados 10 µL de Caspase

Reagent Working Solution e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Após esse período, foram adicionados 100 µL de 1x *Apoptosis Wash Buffer* às amostras que foram centrifugadas a 300 G por 7 minutos. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200 µL de *Caspase 7-AAD Working Solution* diluído a 1:40 com 1x *Apoptosis Wash Buffer*. Estas instruções estão no manual do kit In Situ Cell Death Detection (ROCHE). Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente longe de luminosidade as amostras foram lidas em citômetro de fluxo EasyCyte MINI da Guava Technologies.

Os resultados foram obtidos em triplicatas.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento

A curva de crescimento da linhagem HepG2 foi fundamental para determinar os inóculos adequados para cada experimento e também o dia de tratamento com o inibidor de Aurora quinase, BADIM (Figura 1). Os dados obtidos mostraram que as células desta linhagem atingem a fase exponencial a partir do 3^o dia em cultura, dia este então escolhido para a realização do tratamento e o plateau é observado a partir do 7^o dia em cultura. Os tempos em cultura também foram analisados, de forma a respeitar o limite máximo de crescimento da linhagem celular.

Figura 1 – Curva de crescimento da linhagem HepG2.

4.2 Morfologia Celular

As células da linhagem de Hepatocarcinoma Humano (HepG2) são células de origem epitelial e crescem aderidas ao substrato. Quando observadas em cultura, é possível notar que estas proliferam e formam aglomerados em culturas sub confluentes e confluentes. Estas células não se apresentam na forma de monocamada típica, diferentemente de outras linhagens celulares, ou seja, à medida que a cultura atinge estágios de confluência, grande quantidade de células sobrepostas pode ser observada com maior concentração na região central do aglomerado celular (Figura 2).

Figura 2 – Fotomicrografia mostrando aspecto morfológico da linhagem HepG2 com 5 dias em cultura, observadas ao microscópio de contraste de fase.

Células submetidas aos tratamentos com inibidor BADIM foram primeiramente avaliadas através de microscopia de fase, na qual pudemos observar sua morfologia e seu comportamento ao longo de todo o período de tratamento, correspondente a 24 e 48 horas.

Através de observações ao microscópio de luz e imagens obtidas, pudemos inferir que houve diferente densidade celular entre os grupos estudados, sendo que o grupo controle apresentou maior densidade em relação aos grupos tratados, indicando, portanto, possível atividade antiproliferativa do inibidor. Foram observadas possíveis alterações morfológicas induzidas pelo tratamento, e pudemos verificar que diferentemente das células do grupo controle de 24 horas de tratamento (Figura 3A), as células submetidas ao inibidor de Aurora quinase passaram a apresentar maior quantidade de vacúolos citoplasmáticos. Algumas células apresentaram aspecto arredondado, sugerindo possível divisão celular. Observamos também a presença de prolongamentos incomuns entre células-irmãs aparentemente em final de divisão (Figura 3B, C, D).

Após 48 horas de tratamento pudemos observar que similarmente ao obtido no tempo de 24 horas, o grupo controle apresentou maior densidade celular quando comparados aos grupos tratados. As alterações morfológicas já descritas, tais como presença de vacúolos e prolongamentos citoplasmáticos incomuns e presença crescente de células gigantes e binucleadas nos grupos submetidos a tratamento (Figura 4).

Figura 3 – Morfologia celular da linhagem HepG2 no tempo de 24 horas de tratamento obtida por microscopia de fase. A) grupo controle; B) grupo tratado com 300nM de inibidor BADIM; C) grupo tratado com 600nM de inibidor BADIM; D) grupo tratado com 1200nM de inibidor BADIM.

Figura 4 – Morfologia celular de cultura no tempo de 48 horas de tratamento obtida por microscopia de fase. A) controle; B e C) grupo tratado com 300nM do inibidor de BADIM; D) grupo tratado com 600nM do inibidor BADIM; E e F) grupo tratado com 1200nM do inibidor BADIM.

4.3 Ação do Inibidor BADIM sobre proliferação celular

Para determinar se o composto possuía atividade antiproliferativa foi realizado ensaio de proliferação celular para determinar se as células observadas no que inferimos ser mitose, eram provenientes devido a bloqueio no ciclo celular causado pelo tratamento. Foram realizados ensaios por análise de imagem e de citometria de fluxo, através dos quais pudemos verificar a ação do inibidor em relação ao seu mecanismo de ação quando interferindo no comportamento na linhagem celular após tratamento.

Os resultados obtidos nos ensaios de proliferação celular por citometria de fluxo estão representados nas figuras 5 e 6, nas quais observamos a porcentagem de inibição da proliferação celular após tratamento com BADIM nos períodos de 24h e 48h, nas diferentes concentrações do agente.

Após 24h tratamento, observamos que a diminuição no número de células ocorreu em todas as concentrações utilizadas do inibidor. A população controle apresentou média de 228 células/ μ l, enquanto as populações tratadas apresentaram médias de 147 células/ μ l, 168 células/ μ l e 129 células/ μ l quando inibidor foi utilizado nas concentrações de 300, 600 e 1200nM, respectivamente (Figura 5).

Em 48h, similarmente ao tempo testado anteriormente houve redução das populações celulares expostas ao inibidor. A população celular controle apresentou média de 469 células/ μ l, enquanto populações tratadas com inibidor nas concentrações de 300, 600 e 1200nM tiveram médias de 234 células/ μ l, 239 células/ μ l e 201 respectivamente (Figura 6).

Os dados obtidos para os diferentes tempos de tratamento mostram que as concentrações que obtiveram maior eficiência quanto a diminuição no número de células foram 1200nM e 300nM, respectivamente, seguido por 600nM. Esses dados corroboram com as observações realizadas por microscopia, no qual foi visto maior densidade de células nos grupos controles.

Figura 5 – Curva de células testadas com diferentes concentrações do inibidor BADIM durante o período de 24 horas.

Figura 6 – Curva de células testadas com diferentes concentrações do inibidor BADIM durante o período de 48 horas.

4.4 Ploidia/Ciclo Celular

Após constatação da diminuição do número de células nas culturas de HepG2 tratadas com inibidor, indicando efeito antiproliferativo, foram realizados ensaios para observação de conteúdo de DNA, através do qual pudemos traçar um perfil das células ao longo do ciclo celular.

Primeiramente foi realizada quantificação de DNA por análise de imagem, através da qual pudemos determinar o conteúdo de DNA de núcleos interfásicos. Esta análise foi realizada para os tempos de 24 e 48 horas (Figuras 7 e 8). Após quantificar os grupos controle e tratados, os dados foram separados em cinco classes:

- 1) Células com conteúdo de DNA entre 0 a 1,49C, as quais foram consideradas como hipodiplóides;
- 2) Células com conteúdo de DNA entre 1,5C a 2,49C, as quais foram consideradas na fase G0/G1;
- 3) Células com conteúdo de DNA entre 2,5C a 3,79C, as quais foram consideradas na fase S;
- 4) Células com conteúdo de DNA entre 3,8C a 4,59C, as quais foram consideradas na fase G2;
- 5) Células com conteúdo de DNA acima de 5C, as quais foram consideradas hipertetraplóides.

Células submetidas a 24 horas de tratamento com BADIM mostraram que células diplóides foram mais freqüentes no grupo controle (38,23%) em relação aos grupos tratados com 300nM (25,96%), 600nM (34,44%) e 1200nM (21,53%). Valores de DNA intermediários entre 2,5C e 3,79C também apresentaram maior percentual no grupo controle (34,31%) enquanto as freqüências destes valores nos grupos tratados foram de 22,42%, 19,49% e 20,10% para as concentrações de 300, 600 e 1200nm, respectivamente. As populações de células tetraplóides estavam aumentadas na concentração de

1200nM (22,76%) em relação aos demais grupos tratados 18,44% e 16,96% para 300nM e 600nM e 19,52% para grupo controle.

No tempo de 48 horas de tratamento, pudemos observar que houve diminuição nos percentuais de células diplóides quando tratadas nas concentrações de 300nM (49,50%), 600nM (58,21%) e 1200nM (54,45%) em relação ao grupo controle (64,73%). Células analisadas como hiperdiplóides, apresentou aumento no grupo tratado com 300nM do inibidor (32,84%), em relação ao grupo controle (22,70%) e demais grupos tratados, 22,065% (600nM) e 12,87% (1200nM). Foi observado menor percentual de células tetraplóides no grupo controle (5,31%), quando comparado aos grupos tratados com 300nM, 600nM e 1200nM, correspondendo a 10,29%, 15,49% e 28,71%, respectivamente.

Figura 7 – Quantificação de DNA das células HepG2 por análise de imagem. Tratamento de 24 horas. Controle: azul; 300nM: laranja; 600nM: verde; 1200nM: roxo.

Figura 8 – Quantificação de DNA das células HepG2 por análise de imagem. Tratamento de 48 horas. Controle: azul; 300nM: laranja; 600nM: verde; 1200nM: roxo.

Posteriormente, foi realizada a análise do ciclo celular através da quantificação de DNA por citometria de fluxo, a qual mostrou para a linhagem HepG2 controle e tratada com inibidor de Aurora quinase a presença de dois picos bem estabelecidos. O primeiro pico evidenciado trata-se da população celular caracterizada como G0/G1 do ciclo celular, na qual é observado conteúdo diplóide (2C), e o segundo pico evidenciado trata-se da população em G2/M do ciclo celular, uma vez que neste ensaio também são analisadas células em divisão, nas quais é observado conteúdo tetraplóide (4C) (Figura 9 e 10).

A análise dos resultados obtidos pelos ensaios de citometria de fluxo mostrou que o tratamento interferiu na dinâmica de progressão do ciclo celular. Análises de amostras submetidas a 24 horas de tratamento mostraram percentual de 26,56% para o grupo controle, enquanto observou-se diminuição dos percentuais nos grupos tratados com 300nM (23,44%) e 600nM (25,13%). Entretanto o grupo tratado com 1200nM do inibidor apresentou aumento nesta fase de 28,94%.

A frequência de células na fase S das culturas não apresentou alterações significativas, permanecendo o controle com um percentual de 7,78%, enquanto populações tratadas apresentaram percentual de 7,31%, 8,70% e 7,56% para concentrações de 300, 600 e 1200nM, respectivamente. Análise de células na fase G2/M do ciclo celular permitiu verificar aumento na frequência de células do grupo tratado na concentração de 1200nM (22,96%) em relação ao grupo controle (20,73%) e demais grupos tratados 19,62% (300nM) e 17,94% (600nM), indicando talvez que nas primeiras 24 horas de tratamento, apenas a maior concentração do inibidor tenha tido efeito em relação ao comportamento proliferativo, bloqueando o ciclo em G0/G1 e G2/M (Tabela 1).

Figura 9 – Quantificação de DNA por citometria de fluxo de células HepG2 tratadas com BADIM nas concentrações de 300nM, 600nM e 1200nM após 24 horas. Vermelho = células hipodiplóides, Marinho = fases G0/G1 do ciclo celular, Rosa = fase S, Verde = fases G2/M, Azul = hipertetraplóides.

Figura 10 – Quantificação de DNA por citometria de fluxo de células HepG2 tratadas com BADIM nas concentrações de 300nM, 600nM e 1200nM após 48 horas. Vermelho = células hipodiplóides, Azul = fases G0/G1 do ciclo celular, Rosa = fase S, Verde = fases G2/M, Azul = hipertetraplóides.

Ainda para o tempo de 24 horas de tratamento, podem-se avaliar as populações hipodiplóides e hipertetraplóides. Células tratadas com inibidor de Aurora quinase nas concentrações de 300nM e 600nM apresentaram aumento nas populações celulares hipodiplóides (conteúdo de DNA inferior a 2C), 29,69% e 26,77%, respectivamente em relação ao grupo controle, 23,87%. O grupo tratado com 1200nM do agente apresentou diminuição quando comparado a todos os grupos, apresentando percentual de 16,44%. Em relação às células hipertetraplóides (conteúdo superior a 4C) foi observado 21,04% na cultura controle e 19,98% e 20,22% nas culturas tratadas com inibidor nas concentrações de 300nM e 600nM, respectivamente. Porém, tratamento de 1200nM, apresentou percentual de 24,1%, mostrando desta forma que o tratamento nesta concentração acomete aumento na população celular com conteúdo de DNA superior a 4C, sugerindo portanto que estas células submetidas a este tratamento tenham sido expostas a erros no processo de segregação celular, ocasionando portanto aumento no conteúdo de DNA.

Frequência de células nas fases G0/G1 referente ao tempo de 48 horas de tratamento na cultura controle foi de 36,44% e o tratamento com o inibidor apresentou diminuição nestes percentuais para 32,81% (300nM), 27,79% (600nM) e 32,76% (1200nM). A população de células na fase S após este tempo também não apresentou diferenças significativas entre os grupos, permanecendo o controle com percentual de 9,41%, 300nM (8,64%), 600nM (9,44%) e 1200nM (8,91%).

As populações celulares nas fases G2/M foram maiores nas culturas tratadas 26,1% (300nM), 20,97% (600nM) e 23,27% (1200nM) em relação a cultura controle (19,63%), indicando novamente um possível bloqueio nestas fases do ciclo celular devido a atividade do inibidor (Tabela 2).

Frequência de células com conteúdo hipodiplóides observadas não mostraram grandes alterações quando comparado grupo controle (10,99%), 300nM (11,36%) e 1200nM (11,63%). Já o grupo tratado com inibidor à concentração de 600nM apresentou aumento (21,07%). Entretanto, células

com conteúdo hipertetraplóide pareceu não sofrer grandes alterações neste período de tratamento, apresentando-se os seguintes percentuais para controle (22,03%), 20,69% (300nM), 20,72% (600nM) e 22,09% (1200nM).

Tabela 1 - Frequência na distribuição de células HepG2 tratadas com inibidor BADIM por 24 horas em diferentes concentrações ao longo das fases do ciclo celular de acordo com citometria de fluxo.

24h	Hipotetraplóides	G0G1	S	G2M	Hipertetraplóides
C	23,87%	26,57%	7,78%	20,74%	21,05%
300nM	29,69%	23,45%	7,31%	19,63%	19,98%
600nM	26,78%	25,14%	8,7%	17,95%	20,22%
1200nM	16,44%	28,95%	7,56%	22,96%	24,1%

Tabela 2 - Frequência na distribuição de células HepG2 tratadas com BADIM por 48 horas em diferentes concentrações ao longo das fases do ciclo celular de acordo com citometria de fluxo.

48h	Hipotetraplóides	G0G1	S	G2M	Hipertetraplóides
C	10,99%	36,45%	9,42%	19,64%	22,03%
300nM	11,36%	32,81%	8,64%	26,1%	20,7%
600nM	21,07%	27,79%	9,44%	20,98%	20,72%
1200nM	11,64%	32,76%	8,92%	23,28%	22,19%

4.5 Alterações Morfológicas

Posteriormente as análises de ciclo celular foram realizados ensaios de imunofluorescência para verificar possíveis alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com BADIM. Tais alterações foram de fato observadas, sugerindo, portanto, que o referido agente tem como alvo de sua ação o citoesqueleto. Diferentemente dos ensaios descritos anteriormente, foram realizados para observação de morfologia, ensaios de imunofluorescência nos tempos de 8, 24 e 48 horas de tratamento. Para analisar os grupos tratados, foi previamente estudado o perfil normal de distribuição de tubulina, o qual pode ser observado na figura 11A. Observamos que no grupo controle os microtúbulos estão distribuídos em forma de rede por todo citoplasma celular. Nesta imagem mostrada na figura 11, podemos observar a presença de uma célula em divisão, na qual os microtúbulos estão organizados em fuso bipolar.

Células submetidas aos tratamentos com BADIM após 8 horas de tratamento apresentam alterações nos padrões de distribuição de tubulina. As células tratadas com inibidor na concentração de 300nM as quais exibem microtúbulos difusos no citoplasma como pode ser visto na figura 11B. Nesta imagem podemos observar ainda a presença de uma figura mitótica em telófase, mostrando que eventualmente os microtúbulos se estabelecem de forma adequada para finalizar a divisão celular. Porém nesta concentração, foi freqüente a observação de figuras mitóticas, nas quais o citoesqueleto não se organizava formando fuso bipolar (Figura 11C), ou ainda a presença de acúmulos de microtúbulos em regiões específicas do citoplasma.

O tratamento na concentração de 600nM do inibidor apresentou padrão de distribuição de microtúbulos difuso, bem como a presença de figuras mitóticas atípicas devido a problemas na montagem dos fusos bipolares (Figura 11D). Tratamentos com a droga na concentração de 1200nM, assim como em todos os demais grupos tratados apresentou mitoses atípicas (Figura 11E) decorrente a problemas nos microtúbulos e presença de células binucleadas (Figura 11F).

Figura 11 – Imagens de células HepG2 obtidas por microscopia confocal de varredura a laser, mostrando microtúbulos (verde). Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo (vermelho). A) células controle; B e C) células tratadas com 300nM de inibidor por 8 horas; D) células tratadas com 600nM de inibidor por 8 horas; E e F) células tratadas com 1200nM de inibidor por 8 horas.

Após 24 horas de tratamento foi observada maior diversidade de alterações morfológicas. Células submetidas ao tratamento com concentração de 300nM apresentaram aumento na frequência em fim de divisão celular, mostrando divisões celulares gerando três células as quais ainda permanecem unidas por microtúbulos (Figura 12A). Além disso, foi observado aumento na frequência de células gigantes multinucleadas (Figura 12B). Tal comportamento também foi observado em células tratadas com 600nM do inibidor, as quais apresentaram aumento na presença de células gigantes binucleadas (Figura 12C). A concentração de 1200nM apresentou além de células binucleadas ou multinucleadas a presença freqüente de figuras mitóticas consideradas aberrantes (Figura 12D), devido ao não estabelecimento correto dos microtúbulos.

Após 48 horas de tratamento, as células tratadas com 300nM do inibidor de Aurora quinase apresentaram acúmulos de microtúbulos em regiões específicas do citoplasma, enquanto em algumas partes o padrão do mesmo encontra-se difuso (Figura 13A e 13C). Foi ainda notado a presença de fusos monopolares, conforme mostrado na figura 14B. As preparações provenientes dos tratamentos com o inibidor de Aurora nas concentrações de 600nM e 1200nM, apresentam figuras de divisão celular, algumas das quais com características aberrantes (Figura 15). Foi possível observar drástico alongamento de algumas células tratadas com o inibidor (Figura 15A e 15B).

Figura 12 - Imagens de células HepG2 obtidas por microscopia confocal de varredura a laser, mostrando microtúbulos (verde). Os núcleos foram corados com iodeto de propídeo (vermelho). A e B) células tratadas com 300nM de inibidor por 24 horas; C) células tratadas com 600nM de inibidor por 24 horas; D) células tratadas com 120nM de inibidor por 24 horas.

Figura 13 – Imagens de células HepG2, mostrando microtúbulos em verde e núcleos corados com TOPRO3. Células tratadas com 300nM do inibidor por 48 horas. Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser.

Figura 14 – Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células tratadas com 300nM no tempo de 48 horas. Em verde (tubulina) e em azul (núcleo). A1) tubulina de célula em divisão normal apresentando centrossomos duplicados; A2) núcleo em prófase; A3) dois canais juntos mostrando marcação de centrossomos em célula em prófase. B1) tubulina de célula em divisão anormal apresentando marcação para um único centrossomo; B2) núcleo em prófase; B3) dois canais juntos.

Figura 15 – Células HepG2, mostrando em verde microtúbulos e em azul, núcleos, corados com TOPRO3. A1) tubulina de células em divisão, mostrando prolongamento citoplasmático anormal; A2) núcleo de célula em divisão, mostrando disposição incorreta de cromossomos durante metáfase; A3) fusão dos 2 canais mostrando preparações tratadas na concentração de 600nM de inibidor de Aurora quinase após 48 horas de tratamento. B1) tubulina de células em divisão, mostrando prolongamento anormal; B2) mitoses atípicas; B3) canais juntos.

4.6 Alterações Nucleares

Como pudemos observar através dos resultados obtidos por ensaios de imunofluorescência, o inibidor BADIM interfere com a organização dos microtúbulos, levando a uma série de alterações morfológicas, dentre as quais agora destacaremos as causadas durante as divisões celulares, que como pôde ser observado, ocasiona problemas principalmente na montagem e desmontagem dos fusos bipolares.

Para analisar alterações nucleares, foram realizados ensaios nos quais os núcleos foram corados com iodeto de propídeo após os tempos de 8, 24 e 48 horas de tratamento (Figura 16). Imagens foram obtidas por microscopia confocal de varredura a laser e as células foram contadas levando-se em conta as diferentes fases da mitose. Pudemos observar que as células do grupo controle apresentaram distribuição ao longo de todas as fases da mitose, similarmente aos grupos tratados com inibidor. Entretanto, estes grupos apresentaram aumento de células em divisão com características aberrantes, nas quais houve grande aumento no número de células em que cromossomos não estavam corretamente alinhados na placa metafásica.

No tempo de 8 horas de tratamento observamos, conforme tabela 03, que frequência de células mitóticas foi similar nos grupos estudados, entretanto, aumento de células em prófase foi observado no grupo controle (2,49%) em contraste com 0,49%, 1,11% e 0,34% nos grupos tratados com 300, 600 e 1200nM, respectivamente. Observamos ainda que o número de células em metáfase foi menor nos grupos tratados, apresentando percentuais de 1,36% (300nM), 2,60% (600nM) e 0,45% (1200nM), comparando-se com o grupo controle (2,65%). Além disso, notamos aumento de mitoses aberrantes nos grupos submetidos a tratamento com inibidor nas concentrações de 300nM (6,07%), 600nM (3,16%) e 1200nM (2,28%), quando comparado com controle, que apresentou 0,46% de células em mitoses atípicas.

Em 24 horas, nós observamos que de forma geral houve diminuição nas células em fases de divisão quando expostas a tratamento, em contrapartida, estas apresentaram aumento na frequência de células com características consideradas atípicas. Grupo controle não apresentou alterações na mitose, já os grupos tratados com 300nM, 600nM e 1200nM apresentaram entretanto percentuais de 1,26%, 162%, 1,71%, respectivamente (Tabela 2).

No tempo de 48 horas, a frequência de células mitóticas foi menor nas culturas tratadas quando comparadas às controles. Cerca de 5 a 7% de mitoses foram observadas nas culturas tratadas e 13% na cultura controle. Foi marcante o aparecimento de mitoses aberrantes entre células tratadas com pico na concentração de 600nM. Houve também redução de células em prófase, de 2.8% (controle) para 1,5% (300nM), 1,2% (600nM) e 1,75% (1200nM) (Tabela 3).

Ao analisarmos os dados de índice mitótico e de ploidia por citometria de fluxo, pudemos inferir que associados esses resultados demonstram que pode ocorrer diminuição de células em divisão celular nos grupos submetidos a tratamento, devido a bloqueio na fase de G2, mas também na fase M, indicando desta forma uma interferência na dinâmica de divisão celular, controlando a mesma de forma negativa.

Figura 16 – Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser de células controle e tratadas com 300nM, 600nM e 1200nM nos tempos de 8, 24 e 48 horas. Em vermelhos observamos núcleos corados com iodeto de propídeo. A1, A2 e A3) células do grupo controle nos tempos de 8, 24 e 48 horas em cultura apresentando divisões normais; B1, B2 e B3) células tratadas com 300nM do inibidor nos tempos de 8, 24 e 48 horas, apresentando mitoses atípicas; C1, C2 e C3) células tratadas com 600nM do inibidor nos tempos de 8, 24 e 48 horas, apresentando grande aumento de mitoses atípicas, principalmente no tempo de 48 horas; D1, D2 e D3) células tratadas com 1200nM do inibidor nos tempos de 8, 24 e 48 horas, apresentando mitoses atípicas.

Tabela 3 - Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com BADIM por 8 horas.

T8	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Mitose Anormal
Controle	92,82%	2,50%	2,65%	0,96%	0,62%	0,48%
300nM	91,08%	0,49%	1,36%	0,99%	0,0%	6,07%
600nM	92,36%	1,12%	2,61%	0,56%	0,19%	3,16%
1200nM	96,23%	0,34%	0,46%	0,34%	0,34%	2,28%

Tabela 4 - Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com BADIM por 24 horas.

T24	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Mitose Anormal
Controle	95,86%	0,89%	2,47%	0,67%	0,11%	0,00%
300nM	97,66%	0,16%	0,59%	0,33%	0,00%	1,26%
600nM	95,93%	0,30%	1,70%	0,38%	0,07%	1,62%
1200nM	96,08%	0,80%	1,21%	0,20%	0,00%	1,71%

Tabela 5 - Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após tratamento com BADIM por 48 horas.

T48	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Mitose Anormal
Controle	87%	2,80%	2,80%	2,80%	1,60%	0,00%
300nM	95%	1,50%	0,25%	0,50%	0,00%	2,25%
600nM	93%	1,20%	1,45%	0,60%	0,60%	3,20%
1200nM	95%	1,75%	0,35%	0,70%	0,70%	1,75%

4.7 Morte Celular Programada

O processo apoptótico é complicado de ser analisado, uma vez que as células em apoptose sofrem alterações na membrana, as quais permitem que estas se descolem do substrato, podendo por este motivo muitas vezes não ser observada em microscopia de fluorescência, entretanto foram observadas algumas imagens apoptóticas após tratamento com inibidor BADIM que nos levou a buscar se estas eram ou não decorrentes do tratamento.

A fragmentação de DNA, característica tardia de apoptose foi analisada pela técnica de *TUNEL-Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*. Para a realização deste ensaio foi adicionado um controle positivo, que consistiu de um grupo de células com a mesma densidade celular dos demais, submetido à radiação UV por dois minutos 24 horas antes das análises. Estas células apresentaram frequência aumentada de células positivas para apoptose, devido à exposição das mesmas a radiação. Portanto, este teste serviu para nós como parâmetro para análises dos grupos tratados em relação ao nosso controle negativo.

As frequências de células positivas obtidas encontram-se na tabela 06. No tempo de 24 horas, foi observado aumento na frequência de células consideradas em apoptose para os grupos tratados com concentração de 600nM (4,97%) e 1200nM (9,64%), quando comparado ao grupo controle, no qual a frequência de células positivas para apoptose foi de 4,86%. O mesmo foi observado para o tempo de 48 horas, que apresentou aumento na frequência de células nos grupos tratados, 300nM (10,48%) 600nM (10,83%) e 1200nM (20,41%), tendo o grupo controle apresentado porcentagem de 8,16, indicando portanto que o tratamento com o inibidor nestas concentrações poderiam estar levando as células a morte celular.

Tabela 6 - Frequência de células em apoptose, marcadas por *TUNEL* para os tempos de 24 e 48 horas pós tratamento com BADIM.

	24 horas	48 horas
Controle (UV)	7,17%	20,46%
Controle	4,86%	8,16%
300nM	3,51%	10,48%
600nM	4,97%	10,83%
1200nM	9,64%	20,41%

Figura 17 – Frequência de células HepG2 marcadas com *TUNEL* nos diferentes tempos de tratamento, indicando percentual de células em processo de apoptose.

Apoptose foi também avaliada por um ensaio de ativação da Caspase 9, evento característico de fases iniciais. Os gráficos obtidos por citometria de fluxo representados nas figuras 18 e 19, representam a distribuição de células: 1) não fluorescentes no quadrante inferior esquerdo (células vivas com membranas íntegras); 2) fluorescentes apenas em vermelho no quadrante superior esquerdo (células com injúria de membrana plasmática, mas que não tiveram ativação de caspase 09); 3) fluorescentes apenas em amarelo no quadrante inferior direito (células em início de apoptose, com ativação de caspase 09); e 04) fluorescentes em vermelho e amarelo no quadrante superior direito (células em apoptose tardia).

No período de 24 horas após tratamento células expostas a maior concentração do inibidor, 1200nM apresentaram aumento na frequência de células consideradas positivas para ativação de caspase 9, correspondendo a 9,25% em relação ao controle 7%. Após 48 horas de tratamento os grupos 600nM (13,93%) e 1200nM (24,71%) apresentaram aumento em relação ao grupo controle (9,19%). Os resultados obtidos por ensaio de Caspase 9 no períodos após 24 e 48 horas de tratamento corroboraram com os resultados obtidos por *TUNEL*, indicando portanto que células submetidas ao tratamento com inibidor nas maiores concentrações de BADIM podem fazer com que células sejam encaminhadas a apoptose.

Figura 18 – Gráfico de representação de células HepG2 marcadas com caspase 9 e/ou 7-AAD obtidos por citometria de fluxo. A) Grupo controle 24 horas; B) grupo tratado com 300nM de inibidor por 24 horas; C) grupo tratado com 600nM de inibidor por 24 horas; D) grupo tratado com 1200nM de inibidor por 24 horas.

Figura 19 - Gráfico de representação de células HepG2 marcadas com caspase 9 e/ou 7-AAD obtidos por citometria de fluxo. A) Grupo controle 48 horas; B) grupo tratado com 300nM de inibidor por 48 horas; C) grupo tratado com 600nM de inibidor por 48 horas; D) grupo tratado com 1200nM de inibidor por 48 horas.

5 DISCUSSÃO

Aurora-A pertence a uma família conservada de serina/treonina quinases que também incluem Aurora-B e Aurora-C. Aurora A e B são melhores caracterizadas e responsáveis pela regulação de processos distintos durante a mitose, os quais são importantes para a correta divisão celular. Sabe-se ainda que estas proteínas interagem com outras as quais são constituintes do ponto de checagem mitótico. Na última década superexpressão de Auroras A e B têm sido associadas com o desenvolvimento de diversos tipos de tumores, como câncer hepático, mama, ovariano, próstata e esôfago (ZHOU et al., 1998; KAMADA et al., 2004).

A superexpressão das Auroras é freqüentemente associada com agressividade e malignidade em muitos tipos de tumores, incluindo o hepatocarcinoma (JENG et al., 2004). Há evidências de que sua superexpressão esteja associada com resistência a quimioterápicos. Devido a isso, elas são atualmente consideradas como marcadores biológicos e, portanto, apresentam grande potencial a alvo terapêutico (TANAKA et al., 2005; REITER et al., 2006).

Moléculas inibidoras de Aurora quinases têm emergido como importantes agentes antitumorais e tem sido testada para o tratamento do câncer. Estas são extremamente importantes devido ao comprometimento das Auroras com o estabelecimento e progressão do câncer, portanto devem atuar bloqueando a função destas células, agindo desta forma como uma nova classe de agentes quimioterápicos (KEEN e TAYLOR, 2004; ANDREWS, 2005; CARVAJAL et al., 2006).

O inibidor de Aurora quinase BADIM foi recentemente desenvolvido e foi estudado no presente trabalho quanto aos seus efeitos sobre a proliferação, ploidia, comportamento ao longo do ciclo celular, fenótipo e apoptose em células derivadas de hepatocarcinoma humano.

Os nossos dados mostraram que o referido composto apresenta regulação negativa sobre a progressão do ciclo celular em células da linhagem HepG2. Testando as diferentes concentrações de 300nM, 600nM e 1200nM, verificamos que BADIM promove efeitos biológicos diferentes dependendo da concentração utilizada. Assim sendo, é possível que o mesmo atue sobre proteínas distintas, uma vez que são muitos os substratos que podem ser fosforilados por Aurora-A, dependendo da concentração considerada.

Sabe-se que a Aurora-A fosforila proteínas específicas ao longo do ciclo celular. É responsável pelo recrutamento do complexo ciclinaB-CDK1, que permite a entrada da célula em mitose; fosforila Eg5, proteína motora responsável pela migração dos pares de centríolos para os pólos opostos; fosforila TACC, responsável pela maturação centrossômica e polimerização dos mesmos; e também fosforila TPX2, proteína esta responsável para a montagem do fuso bipolar mitótico. Dessa forma, inibição de Aurora-A poderia causar problemas ao longo de todo o ciclo celular, uma vez que pode atuar indiretamente sobre todas essas proteínas (CARMENA e EARNSHOW, 2003; MARUMOTO et al., 2005).

Nós observamos que em todas as concentrações utilizadas do inibidor, houve diminuição do número de células em aproximadamente 50% após 24 e 48 horas de tratamento, o que nos indicou que o agente estaria causando efeito antiproliferativo em células derivadas de hepatocarcinoma. Efeito similar foi observado por Tomita e Mori (2010), que usando o inibidor MLN8237 nas concentrações de 50nM, demonstrou que células leucêmicas têm proliferação diminuída em 60 a 80% após 72 horas de tratamento. Este mesmo inibidor (MLN8237) mostrou afetar proliferação de células da medula óssea em cerca de 70 a 90%, usando concentrações de 0,1 μ M após tratamento por 72 horas (GÖRGÜN et al., 2010).

Sendo a Aurora-A considerada reguladora chave da mitose e observando que o número de células diminuiu em consequência do tratamento com inibidor BADIM, realizamos ensaios para observar a ploidia de DNA dessas células através de análise de imagem por CIRCOS. De acordo com os dados obtidos, observamos que para o tempo de 24 horas houve aumento no

conteúdo tetraplóide de células (3,8C a 4,59C) quando tratadas com este inibidor na concentração de 1200nM. Isso pode ser relacionado ao tempo de exposição ao agente, já que outros trabalhos apresentam efeitos similares aos que obtivemos para o tempo de 48 horas de tratamento, no qual todos os grupos tratados por BADIM apresentavam conteúdos tetraplóides. (TOMITA e MORI, 2010; Li et al., 2010).

Análises obtidas por citometria de fluxo nos mostraram que houve aumento nas populações celulares correspondentes a G2/M. Ao contrário da quantificação da ploidia por análise de imagem em que apenas as células interfásicas são consideradas, a citometria de fluxo também analisa conteúdo de DNA de células em mitose. Efeito similar foi observado para este ensaio, mostrando aumento na população G2/M (tetraplóides) após 24 horas de tratamento para a concentração de 1200nM do inibidor, bem como aumento em todas as concentrações utilizadas neste estudo após 48 horas de tratamento. Sabe-se que a Aurora A começa a ser expressa em G2, período este em que é responsável pelo recrutamento do complexo ciclinaA-cdk2. Desta forma, a mesma quando inibida impede que este complexo seja fosforilado, impedindo por sua vez a entrada destas células em mitose (MARUMOTO et al., 2005) e mesmo progredindo de G2 para mitose, pode sofrer bloqueio logo em prófase, primeira fase da mitose, que apresenta grande expressão de Aurora A, devido a sua importância para a maturação dos centrôssomos bem como início da migração dos mesmos para os pólos opostos (CARMENA e EARNSHAW, 2003).

Benten et al. (2009) observaram efeito diferencial sobre a progressão do ciclo celular quando utilizaram o inibidor de Auroras quinase PHA-739358, em células de hepatocarcinoma. O grupo demonstrou que quando o inibidor foi usado na concentração de 50nM houve inibição de proliferação acompanhada de endoduplicação, ao passo que quando o inibidor foi usado em concentrações superiores a 500nM houve bloqueio drástico da proliferação acompanhado de completo bloqueio do ciclo celular especificamente nas fases G2/M. Os diferentes efeitos biológicos foram atribuídos à inibição de Aurora A e B no primeiro e no segundo caso, respectivamente. Görgün et al., (2010)

também mostraram efeito diferencial na progressão do ciclo celular após submeter células derivadas de mieloma múltiplo a tratamento com inibidor de Aurora quinase MLN8237. Foi observado que concentração de 0,5 μ M promoveu nessas células acúmulo nas fases G2/M.

Em ensaios de imunofluorescência, quando utilizamos a concentração de 300nM, observamos nos distintos tempos de tratamento (8, 24 e 48 horas) diferenças na organização dos microtúbulos, sendo essas formação difusa de microtúbulos em algumas partes do citoesqueleto e distribuição anormal de centrossomos, que leva a organização de fuso monopolar. Glover et al., 1995 mostraram que quando Aurora-A está inibida, os centrossomos podem não se dividir e conseqüentemente não se separam para que haja posteriormente a formação de fuso bipolar. A presença de fusos monopolares pode ser responsável pelo aparecimento de populações de células binucleadas, bem como células gigantes. Provavelmente, o inibidor na concentração de 300nM está inibindo a Aurora A que está diretamente envolvida na maturação e migração dos centrossomos (CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005; CASTILLO et al., 2007).

Tratamento com 600nM e 1200nM mostrou efeitos similares na morfologia celular. Estas concentrações levaram ao aumento de metáfases aberrantes, células binucleadas ou gigantes e presença de prolongamentos incomuns de células em divisão celular, o que parece impedir a citocinese. Aumento na frequência de metáfases aberrantes pode ser devido à inibição de Aurora-A, uma vez que através das imagens obtidas foi observada a presença de alguns cromossomos incorretamente alinhados, o que sugere falhas no processo de ligação entre microtúbulos aos cinetócoros, tarefa esta de responsabilidade de Aurora-A (MARUMOTO et al., 2005).

A análise das figuras de divisão celular nas imunofluorescências com anticorpo anti α e β -tubulina evidenciou o aumento de metáfases aberrantes em todas as concentrações usadas, indicando falha na organização do fuso mitótico bipolar, indício de inibição de Aurora-A, uma vez que a mesma está relacionada com correto alinhamento cromossômico na placa metafásica. De forma similar, Shinomura et al. (2010) testaram os efeitos de um inibidor

específico para a Aurora A MK-5108 em células derivadas de mama, ovário, pâncreas e cólon humanos e observaram aumento da frequência de mitoses com fuso monopolar. Nossos dados são, portanto, indicativos de que a droga BADIM, nas condições experimentais utilizadas, regulou negativamente o ciclo das células HepG2 por inibir a atividade de Aurora A.

A caracterização morfológica da linhagem HepG2, bem como o acompanhamento de possíveis alterações morfológicas ao longo dos períodos de tratamento nas diferentes concentrações de BADIM, apresentou aumento crescente no número de células gigantes, possivelmente multinucleadas e da presença de prolongamentos citoplasmáticos incomuns em células em divisão, dado este que afirma os obtidos por imunofluorescência, que demonstram que poderia ser possível a funcionalidade de Aurora-B, impedindo que esta célula termine divisão celular, devido a ponto de checagem mitótico.

Görgün et al. (2010) observaram após submeter células de medula óssea a tratamento com MLN8237, que ocorriam anormalidades na montagem do fuso mitótico. Realizamos ensaios para quantificação das fases ao longo da mitose e constatamos que células submetidas a todas as concentrações estudadas de BADIM apresentavam estas alterações, causando mitoses atípicas. Observamos também que ocorreu percentual diminuído de células em divisão. Tais dados corroboram, portanto, com os obtidos por citometria de fluxo, indicando que este bloqueio em G2/M poderia ser devido a inibição de Aurora-A, bem como as alterações nucleares já que em metáfase esta proteína está diretamente envolvida com o correto alinhamento cromossômico na placa metafásica, sendo responsável por verificar se houve correta ligação dos microtúbulos aos cinetócoros.

Apesar de observarmos uma série de alterações citoplasmáticas, como prolongamentos incomuns e nucleares, como incorreto alinhamento cromossômico, não foram observadas diferenças drásticas na frequência de células hipertetraplóides que poderiam ser originadas devido a essas alterações após tratamento com inibidor de Aurora quinase em nenhum dos tempos expostos a ação do BADIM. Isso nos indica que possivelmente exista uma rota alternativa para células que foram bloqueadas em mitose. Tomita e

Mori (2010) demonstraram que após tratamento com inibidor MLN8237, células derivadas mieloma não apresentaram aumento na poliploidização, mas sim em apoptose. Além disso, eles sugeriram que apoptose poderia estar associada com funcionalidade da via p53 que está diretamente ligada ao ponto de checagem pós-mitótico.

O gene supressor de tumor p53 regula a expressão de vários genes envolvidos com apoptose, reparo de DNA, e bloqueio no crescimento celular em resposta a estresse celular causado por agentes quimioterápicos (KO e PRIVES, 1996; JOHNSTONE et al., 2002). Vários relatos indicam que Aurora-A está relacionada com a proteína p53 e que ambas trabalham juntas na regulação do bloqueio do ciclo celular (KATAYAMA et al., 2004; LIU et al., 2004; VADER e LENS, 2008). Foi visto que a Aurora-A regula atividade de p53 via AKT/HDM2 (DAR et al., 2008).

Células HepG2 apresentam via p53 funcional, e estas quando submetidas a tratamento com BADIM apresentaram aumento em apoptose após tempos de 24 e 48 horas nas concentrações de 600nM e 1200nM, observado por ensaios de TUNEL e Caspase 9. Li et al. (2010) utilizaram inibidor de Aurora-A VX680 em linhagens celulares derivadas de carcinoma renal (A-498 e Caki1) e observaram que de forma similar ao nosso estudo, após exposição das células ao agente, ocorreu primeiramente parada de células em G2/M com conseqüente indução destas à apoptose. Outros trabalhos associam estes efeitos causados por VX-680 à inibição de Aurora-A (HARRINGTON et al., 2004; VADER e LENS, 2008). Estudo recente mostrou que células expostas a MK-0457, inibidor específico de Aurora-A, atingem conteúdo de DNA igual ou maior que 4C e são encaminhadas a apoptose quando via p53 está ativa, indicando dessa forma que p53 reconhece danos ao DNA e opera normalmente mesmo em caso de problemas na expressão de Aurora-A (DREIER et al., 2009). Estes dados concordando com os obtidos utilizando o inibidor BADIM.

Aproximadamente 50% dos cânceres humanos não possuem a via do p53 ativa, devido a diversas mutações e deleções, as quais podem estar intimamente relacionadas com o processo de carcinogênese (MARKS et al.,

1991). No entanto, células que possuem comprometimento na via do p53, podem por sua vez apresentar a ativação da via da p73. Esta proteína é considerada membro da família p53, possuindo características estruturais e funcionais similares a da p53, bem como atividade pró-apoptótica (OZAKI et al., 2005; ZAIKA et al., 2006). Similarmente a p53, a p73 é ativada quando ocorre danos ao DNA causados por radiação gama ou tratamento com drogas quimioterápicas, incluindo cisplatina e taxol (SHIMODAIRA et al., 2003; IRWIN et al., 2004).

Dar et al. (2008) demonstraram o efeito do inibidor MLN8054 em células deficientes de p53. Eles comprovaram, de acordo com outros estudos (ZHU et al., 1998; MELINO et al., 2003) que p73 pode induzir ação de alvos como PUMA e p21/WAF1, levando portanto a apoptose, independentemente da funcionalidade do p53. Portanto, mesmo que a via p53 esteja com uma mutação, o processo de morte celular pode ser desencadeado por outras proteínas.

Desta forma, estes inibidores de Aurora quinases representam promissores agentes terapêuticos para diversos tipos de cânceres, uma vez que atuam sobre proteínas que estão diretamente relacionadas com os processos de estabelecimento e progressão tumoral. O inibidor BADIM, utilizado neste estudo mostrou-se efetivo para células derivadas de hepatocarcinoma, uma vez que foi capaz de atuar em pontos considerados chave para a progressão do mesmo. Portanto, o mesmo pode ser estudado de forma mais aprofundada e futuramente atuar como um novo composto quimioterápico, já que seu mecanismo de ação ainda não é conhecido na literatura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi apresentado neste trabalho quanto ao uso do inibidor de Aurora quinase, BADIM, sobre células HepG2, podemos inferir que:

- O tratamento com inibidor apresentou efeito antiproliferativo em todas as concentrações estudadas quando comparado ao grupo controle, não exposto ao agente.
- Aumento na frequência de células tetraplóides foi observado após tratamento por 24 horas na concentração de 1200nM e após 48 nas concentrações de 300nM, 600nM e 1200nM.
- Bloqueio de células em G2/M do ciclo celular foi observado em 24 e 48 horas após tratamento com as concentrações estudadas de BADIM.
- Alterações morfológicas foram observadas utilizando a concentração de 300nM, como presença de divisões celulares originando três células filhas a partir de uma única célula mãe após 24 horas de tratamento, aumento na frequência de células formando fusos monopolares após 48 horas de tratamento, bem como presença de células binucleadas.
- As concentrações de 600nM e 1200nm levaram a alterações na morfologia celular, causando aumento na quantidade de células binucleadas ou gigantes e presença de prolongamentos incomuns de microtúbulos em células em divisão após 24 e 48 horas de tratamento.
- Frequências aumentadas de alterações nucleares foram observadas para todas as concentrações do inibidor a partir de 8 horas de tratamento, levando ao aparecimento de mitoses atípicas, apresentando células em metáfase com incorreto alinhamento cromossômico.
- Indução de morte celular foi observada a partir de 24 e 48 horas para as concentrações de 600nM e 1200nM.

REFERÊNCIAS¹

ANDREWS, P. D. Aurora Kinases: shining lights on the therapeutic horizons. **Oncogene**, v. 24, p. 5005-15, 2005.

ANZOLA, M.; SAIZ, A.; CUEVAS, N.; LOPEZ-MARTINEZ, M.; MARTINEZ DE PANCORBO, M. A.; BURGOS, J. J. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 mutations in hepatocellular carcinoma. **J. Viral. Hepat.**, v. 11, n. 3, p. 502-10, 2004.

BENTEN, D.; KELLER, G.; QUAAS, A.; SCHRADER, J.; GONTAREWICZ, A.; BALABANOV, S.; BRAIG, M.; WEGE, H.; MOLL, J.; LOHSE, A. W.; BRUMMENDORF, T. H. Aurora kinase inhibitor PHA-739358 suppresses growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in a xenograft mouse model. **Neoplasia**, v. 11, n. 9, p. 934-44, 2009.

BHARADWAJ, R.; YU, H. The spindle checkpoint, aneuploidy and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 11, p. 2016-27, 2004.

BROWN, G.; HUGHES, P. J.; MICHELL, R. H. Cell differentiation and proliferation--simultaneous but independent? **Exp. Cell Res.**, v. 291, n. 2, p. 282-8, 2003.

CARMENA, M.; EARNSHAW, W. C. The Cellular Geography of Aurora Kinases. **Nature**, v. 4, p. 842-854, 2003.

CARVAJAL, R. D.; TSE, A.; SCHWARTZ, G. K. Aurora Kinases: New targets for cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 6869-75, 2006.

CASTILLO, A.; MORSE, H. C 3rd; GODFREY, V. L.; NAEEM, R.; JUSTICE, M. J. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. **Cancer Res.**, v. 67, n. 21, p. 10138-47, 2007.

CHAN, A. O. O.; YUEN, M. F.; LAM, C. M.; FONG, C. Y.; WONG, B. C. Y.; LAI, C. L. Prevalence and characteristics of familial hepatocellular carcinoma caused by chronic hepatitis B infection in Hong Kong. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 19, p. 401-6, 2004.

CHEN, C. Y.; LU, C. L.; CHIU, C. F. Primary biliary cirrhosis associated with mixed type autoimmune hemolytic anemia and sicca syndrome. A case report and review of literature. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 92, n. 9, p. 1547-4549, 1997.

CHENG, A. L.; LIN, Z. Z.; HSU, H. C.; HSU, C. H.; YEH, P. Y.; HUANG, C. Y. F.; HUANG, Y. F.; CHEN, T. J.; KUO, S. H.; HSU, C.; HU, F. C.; JENG, Y. M.; CHUNG, Y. The Aurora kinase inhibitor VE-465 has anticancer effects in pre-

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

clinical studies of human hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 50, p. 518-527, 2009.

CHI, Y.H.; JEANG KT. Aneuploidy and cancer. **J. Cell Biochem.**, v. 102, n. 3, p. 531-8, 2007.

DAR, A. A.; BELKHIRI, A.; ECSEDY, J.; ZAIKA, A.; EL-RIFAI, W. Aurora Kinase A inhibition leads to p73-dependent apoptosis in p53-deficient cancer cells. **Cancer Res.**, v. 68, n. 21, p. 8998-9004, 2008.

DAR, A. A.; ZAIKA, A.; PIAZUELO, M. B. Frequent overexpression of Aurora kinase A in upper gastrointestinal adenocarcinomas correlates with potent antiapoptotic functions. **Cancer**, v. 112, p. 1688-98, 2008.

DE LUCA, M; LAVIA, P.; GUARGUAGLINI, G. A Functional Interplay Between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at Spindle Poles: Plk1 Controls Centrosomal Localization of Aurora-A and TPX2 Spindle Association. **Landes Biosci.**, v. 5, n. 3, p. 296-303, 2006.

DIETERICH, K.; RIFO, R. S.; FAUREL, A. K.; HENNEBICQ, S.; AMAR, B. B.; ZAH, M.; PERRIN, J.; MARTINEZ, D.; SELE, B.; JOUK, P. S.; OHLMANN, T.; ROUSSEAU, S.; LUNARDI, J.; RAY, P. F. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 5, p. 661-665, 2007.

DONATO, F.; GELATTI, U.; TAGGER, A.; FAVRET, M.; RIBEIRO, M. L.; CALLEA, F.; MARTELLI, C.; SAVIO, A.; TREVISI, P.; NARDI, G. Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatitis C and B virus infection, alcohol intake, and hepatolithiasis: a case-control study in Italy. **CCC, Cancer causes control.**, v. 12, n.10, p. 959-64, 2001.

DREIER, M. R.; GRABOVICH, A. Z.; KATUSIN, J. D.; TAYLOR, W. R. Short and long-term tumor cell responses to Aurora kinase inhibitors. **Exp. Cell Res.**, v. 315, p. 1085-1099, 2009.

EL-SARAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-76, 2007.

EYERS, P.A.; MARQUEZ, R.; SHPIRO, N.; TYLER, R.K. VX-680 Inhibits Aurora A and Aurora B Kinase Activity in Human Cells. **Cell Cycle**, v. 22, n. 6, p. 2846-2854, 2007.

FARAZI, P. A. e DEPINHO, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 9, p. 674-87, 2006.

FEITELSON, M. A.; SUN. B.; SATIROGLU TUFAN, N. L.; LIU, J.; PAN, J.; LIAN, Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Oncogene**, v. 21, n. 16, p. 2593-604, 2002.

FENG, J. T.; LIU, Y. K.; SONG, H. Y.; QIN, L. X.; ALMOFTI, M. R.; FANG, C. Y.; LU, H. J.; YANG, P. Y.; TANG, Z. Y. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 17, p. 4581-8, 2005.

FRIEDL, P.; BROCKER, E.B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 1, p. 41-64, 2000.

GIANNINI, E.; RISSO, D.; BOTTA, F.; ROMAGNOLI, P.; Malfatti, F.; FUMAGALLI, A.; TESTA, E.; PODESTA, E.; CHIARBONELLO, B.; POLEGATO, S.; TESTA, R. Prognosis of hepatocellular carcinoma in anti-HCV positive cirrhotic patients: a single-centre comparison amongst four different staging systems. **J. Intern. Med.**, v. 255, n. 3, p. 399-408, 2004.

GLOVER, D. M.; LEIBOWITZ, M. H.; MCLEAN, D. A.; PARRY, H. Mutations in Aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. **Cell**, v. 81, p. 95-105, 1995.

GÖRGÜN, G.; CALABRESE, E.; HIDESHIMA, T.; ECSEDY, J.; PERRONE, G.; MANI, M.; IKEDA, H.; BIANCHI, G.; HU, Y.; CIRSTE, D.; SANTO, L.; TAI, Y. T.; NAHAR, SABIKUN.; ZHENG, M.; BANDI, M.; CARRASCO, R. D.; RAJE, N.; MUNSHI, N.; RICHARDSON, P.; ANDERSON, K. C. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. **Blood**, v. 115, n. 25, p. 5202-5213, 2010.

HAKEM, R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **Embo J. (Online)**, v. 27, p. 589-605, 2008.

HANNON, G. J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 257-61, 1994.

HARRINGTON, E.A.; BEBBINGTON, D.; MOORE, J.; RASMUSSEN, R. K.; AJOSE-ADEOGUN, A. O.; NAKAYAMA, T.; GRAHAM, J. A.; DEMUR, C.; HERCEND, T.; DIU-HERCEND, A.; SU, M.; GOLEC, J. M.; MILLER, K. M. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora Kinases, suppresses tumor growth in vivo. **Nat. Med**, v. 10, p. 262-267, 2004.

HASSAN, M. I.; KASSIM, S.K.; ALI, H.S.; SAYED EL-DA; KHALIFA, A. Evaluation of nitric oxide (NO) levels in hepatitis C virus (HCV) infection: relationship to schistosomiasis and liver cirrhosis among Egyptian patients. **Dis. Markers**, v. 18, n. 3, p. 137-142, 2002.

HEDE, K. Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, n. 2, p. 87-89, 2005.

HIRAI, H.; ROUSSEL, M. F.; KATO, J. Y.; ASHMUN, R.A.; SHERR, C. J. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 5, p. 2672-81, 1995.

HOAR, K.; CHAKRAVARTY, A.; RABINO, C.; WYSONG, D.; BOWMAN, D.; ROY, N.; ECSEDY, J. A. MLN8054, a Small-Molecule Inhibitor of Aurora A, Causes Spindle Pole and Chromosome Congression Defects Leading to Aneuploidy. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 12, p. 4513-4525, 2007.

HUANG, H. C.; SHI, J.; ORTH, J. D.; MITCHISON, T. J. Cell death when the SAC is out of commission. **Cell Cycle**, v. 9, n.11, p. 2453-98, 2010.

HUNTER, T.; PINES, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 573-82, 1994.

IONTA, M. **O efeito do ácido retinóico sobre células normais e tumorais de fígado: uma perspectiva promissora em terapia de diferenciação para hepatocarcinoma.** Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

IRSHAD, M.; DHAR, I.; JOSHI, Y. K. Significance of hepatitis C virus core protein in the diagnosis of hepatitis C virus infection in different liver diseases. **J. Investig. Med.**, v. 54, n. 8, p. 478-83, 2006.

IRWIN, M. S.; MILLER, F. D. p73:regulator in cancer and neural development. **Cell Death Differ.**, v. 11, p.17-22, 2004.

JALLEPALLI, P. V.; LENGAUER, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, n. 2, p. 109-17, 2001.

JENG, Y. M; PENG, S. Y; LIN, C. Y; HSU, H. C. Overexpression and amplification of Aurora-A in Hepatocellular Carcinoma. **Clin. Cancer Res. (Online)**, v. 10, p. 2065-2071, 2004.

JOHNSON, I. S; ARMSTRONG, J. G; GORMAN, M; Jr, P.B. The vinka alkaloids: a new class of oncolytic agents. **Cancer Res.**, v. 23, 1963.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, p.153-64, 2002.

KAMADA, K.; YAMADA, Y.; HIARO, T. Amplification/overexpression of Aurora kinase A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis. **Oncol. Rep.**, v. 12, p. 593-9, 2004.

KATAYAMA, H.; BRINKLEY, W. R.; SEN, S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 4, p. 451-64, 2003.

KATAYAMA, H.; SASAI, K.; KAWAI, H. Phosphorylation by Aurora kinase A induces Mdm-2 destabilization and inhibition of p53. **Nat. Genet.**, v. 36, p. 55-62, 2004.

KEEN, N. J.; TAYLOR, S. S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 927-36, 2004.

KIERSZEMBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 499-509.

KIMMINS, S; CROSSIO, C.; KOTAJA, N; HIRAYAMA, J.; MONACO, L.; HOOG, C.; VAN DUIN, M.; GOSSEN, J. A.; SASSONE-CORSI, P. Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, n. 3, p. 726-39, 2006.

KING, R. W.; DESHAIES, R. J.; PETERS, J. M.; KIRSCNER, M. W. How proteolysis drives the cell cycle. **Science**, v. 274, p. 1652, 1996.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWART, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat. Res**, v. 504, n. 1-2, p. 137-48, 2002.

KO, L. J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes Dev.**, v. 10, p. 1054-72, 1996.

KREMSDORF, D.; SOUSSAN, P.; PATERLINI-BRECHOT, P. ; BRECHOT, C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 25, p. 3823-33, 2006.

KUFER, T. A.; NIGG, E. A.; SILLJ, H. H. W. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. **Chromosoma**, v. 112, p. 159-163, 2003.

KULKARNI, K.; BARCAK, E.; EL-SERAG, H. GOODGAME, R. The impact of immigration on the increasing incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 20, n. 4, p. 445-450, 2004.

KWUN, H.J.; JANG, K.L. Dual effects of hepatitis C virus Core protein on the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. **J. Viral Hepat.**, v. 10, n. 4, p. 249-55, 2003.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-9, 1998.

LI, X; NICKLAS, R. B. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. **Nature**, v. 373, p. 630, 1995.

LI, Y.; ZHANG, Z. F.; CHEN, J.; HUANG, D.; DING, Y.; TAN, M. H.; QIAN, C. N.; RESAU, J. H.; KIM, H.; THE, B. T. VX-680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma. **Am. J. Transl. Res.**, v. 2, n. 3, p. 296-308, 2010.

LIN, B.; WHITE, J.T.; WU, J.; LELE, S.; OLD, L.J.; HOOD, L.; ODUNSI, K. Deep depletion of abundant serum proteins reveals low-abundant proteins as potential biomarkers for human ovarian cancer. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 3, n. 7, p. 853-861, 2009.

LIU, Q.; KANEDO, S.; YANG, I. Aurora A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 52175-82, 2004.

LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1907-17, 2003.

LLOVET, J. M.; MÍNGUEZ, B.; TOVAR, V.; CHIANG, D.; VILLANUEVA, A. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, p. 186-194, 2009.

LU, P.; PROST, S.; CALDWELL, H.; TUGWOOD, J. D.; BETTON, G. R.; HARRISON, D. J. Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. **Mamm. Genome**, v. 18, p. 617-626, 2007.

LUKAS, J.; BARTEK, J. Watching the DNA Repair Ensemble Dance. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 666-668, 2004.

MARKS, J. R.; DAVIDOFF, A. M.; KERNS, B. J. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2979-84, 1991.

MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; SAYA, H. Aurora A - A Guardian Of Poles. **Nature**, v. 5, p. 42-50, 2005.

MATSUO, M. Association between diabetes mellitus and hepatocellular carcinoma: results of a hospital- and community-based case-control study. **Kurume Med. J.**, v. 50, n. 3-4, p. 91-98, 2003.

MATSUSHIME, H.; EWEN, M. E.; STROM, D. K.; KATO, J. Y.; HANKS, S. K.; ROUSSEL, M. F.; SHERR, C. J. Identifications and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 323-334, 1992.

MCCLAIN, M.T.; SCOFIELD, R.H.; KURIEN, B.T.; GROSS, T.F.; JAMES, J.A. Selective small antigenic structures are capable of inducing widespread autoimmunity which closely mimics the humoral fine specificity of human SLE. **Scand. J. Immunol.**, v. 56, n. 4, p. 399-407, 2002.

MCGROGAN, B. T.; GILMARTIN, B.; CARNEY, D. N.; MCCANN, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. **Biochem. Biophys Acta**, v. 1785, n. 2, p. 96-132, 2008.

MCKILLOP, I. H.; SCHRUM, L. W. Alcohol and liver cancer. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p. 195-203, 2005.

MELINO, G.; LU, X.; GASCO, M.; CROOK, T.; KNIGHT, R. A. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, p. 663-70, 2003.

MELMED, S.; TONG, Y.; BEN-SHLOMO, A.; ZHOU, C.; WAWROWSKY, K. Pituitary tumor transforming gene 1 regulates Aurora kinase A activity. **Oncogene**, v. 27, p. 6385-6395, 2008.

MORGAN, D. O. Principles of CDK regulation. **Nature**, v. 374, n. 6518, p. 131-4, 1995.

NAKAGAWA, E. K. **Estudo do significado biológico da multinucleação induzido por vincristina em células em cultura**. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NIGG, E. A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 11, p. 815-25, 2002.

OZAKI, T; NAKAGAWARA, A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. **Cancer Sci.**, v. 96, p. 729-37, 2005.

REITER, R.; GAIS, P.; JUTTING, U. Aurora A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 5136-41, 2006.

RIEDER, C. L.; SCHULTZ, A.; COLE, R.; SLUDER, G. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. **J. Cell. Biol.**, v. 127, p. 1301, 1994.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Effect of alkaline pH on taxol-microtubule interactions. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 259, n. 2, p. 855-60, 1991.

SAITO, S. Toxins affecting actin filaments and microtubules. **Prog. Mol. Subcell Biol.**, v. 46, p. 187-219, 2009.

SARBAH, S. A.; GRAMLICH, T.; YOUNOSA, A.; OSMACK, P.; GOORMASTIC, M.; GROSSO, L.; COOPER, J. N.; DI BISSEGLIE, A.; SENECA, R.; YOUNOSS, Z. M. Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, n. 5, p. 850-853, 2004.

SASAI, K.; KATAYAMA, H.; STENOIEN, D. L.; FUJII, S.; HONDA, R.; KIMURA, M.; OKANO, Y.; TATSUKA, M.; SUZUKI, F.; NIGG, E. A.; EARNSHAW, W. C.; BRINKLEY, W. R.; SEN, S. Aurora-C Kinase Is a Novel Chromosomal Passenger Protein That Can Complement Aurora-B Kinase Function in Mitotic Cells. **Cell Motil. Cytoskelet.**, v. 59, p. 249–263, 2004.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTA, M.; HUANG, X.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, J.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proc. Natt. Acad. Sci USA**, v. 97, n. 1, p. 303-8, 2002.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704-707, 1993.

SHAPIRO, G. I. Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 11, p. 1770-1783, 2006.

SHEER, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. **Genes Dev.**, v. 13, n. 12, p. 1501-12, 1999.

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P. Epidemiology of hepatitis B and hepatitis B virus infection in United States children. **Ped. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 9, p. 755-60, 2005.

SHI, Q.; KING, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. **Nature**, v. 437, p. 1038-1042, 2005.

SHIMODAIRA, H.; YOSHIOKA-YAMASHITA, A.; KOLODNER, R. D.; WANG, J. Y. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 2420-5, 2003.

SHIMOMURA, T.; HASAKO, S.; NAKATSURU, Y.; MITA, T.; ICHIKAWA, K.; KODERA, T.; SAKAI, T.; NAMBU, T.; MIYAMOTO, M.; TAKAHASHI, I.; MIKI, S.; KAWANISHI, N.; OHKUBO, M.; KOTANI, H.; IWASAWA, Y. MK-5108, a Highly Selective Aurora-A Kinase Inhibitor, Shows Antitumor Activity Alone and in Combination with Docetaxel **Mol. Cancer Ther.**, v. 9, n. 1, p. 157-166, 2010..

SHIN, H. R. Epidemiology of hepatitis C virus in Korea. **Intervirolgy**, v. 49, n. 1-2, p. 18-22, 2006

TANAKA, E.; HASHIMOTO, Y.; ITO, T. The clinical significance of Aurora A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 1827-34, 2005.

TATSUKA, M. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and lpl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4811-4816, 1998.

THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nat. Genet.**, v. 31, n. 4, p. 339-46, 2002.

TOMITA, M.; MORI, N. Aurora A selective inhibitor MLN8237 suppresses the growth and survival of HTLV-1-infected T-cells in vitro. **Cancer Sci.**, v. 101, n. 5, p. 1204-1211, 2010.

TYLER, R. K.; SHPIRO, N.; MARQUEZ, R.; EYERS, P. A. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. **Cell Cycle**, v. 6, n. 22, p. 2846-2854, 2007.

VADER, G.; LENS, S.M. The Aurora kinase family in cell division and cancer. **Biochem. Biophys Acta**, v. 1786, n. 1, p. 60-72, 2008.

VADER, G.; MEDEMA, R. H.; LENS, S. M. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. **J. Cell Biol.**, v. 173, n. 6, p. 833-7, 2006.

VIDAL, A.; KOFF, A. *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause.* **Gene**, v. 247, n. 1-2, p. 1-15, 2000.

VILLANUEVA, A.; NEWELL, P.; CHIANG, D. Y.; FRIEDMAN, S. L.; LLOVET, J. M. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. **Semin. Liver Dis**, v. 27, n.1, p. 55-76, 2007.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat. Med.**, v. 10, n. 8, p. 789-99, 2004.

YAN, X.; CAO, L.; LI, Q.; WU, Y.; ZHANG, H.; SAIYIN, H.; LIU, X.; ZHANG, X.; SHI, Q.; YU, L. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. **Genes Cells**, v. 10, p. 617-626, 2005.

ZAICA, A. I.; EL-RIFAI, W. The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 935-40, 2006.

ZHOU, H.; KUANG, J.; ZHONG, L. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nat. Genet.**, v. 20, p. 189-93, 1998.

ZHU, J.; JIANG, J.; ZHOU, W.; CHEN, X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. **Cancer Res.**, v. 58, p. 5061-5, 1998.

ZUCMAN-ROSSI, J.; LAURENT-PUIG, P. Genetic diversity of hepatocellular carcinomas and its potential impact on targeted therapies. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 8, p. 997-1003, 2007.