

**Marina da Costa Rosa**

**INTERFERINDO NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR PARA  
AVALIAR POSSÍVEIS ALTERAÇÕES DE PLOIDIA EM CÉLULAS  
TUMORAIS DE MAMA HUMANA**

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  
2011

**Marina da Costa Rosa**

**INTERFERINDO NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR PARA AVALIAR  
POSSÍVEIS ALTERAÇÕES DE PLOIDIA EM CÉLULA TUMORAL DE MAMA  
HUMANA**

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. Glaucia Maria Machado Santelli

Versão original

São Paulo  
2011

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

Costa-Rosa, Marina da.  
Interferindo na progressão do ciclo celular para analisar possíveis alterações de ploidia em célula tumoral de mama humana / Marina da Costa-Rosa. -- São Paulo, 2011.

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: Interference in the cell cycle to analyze possible alteration of ploidy in tumor cell of human breast.

Descritores: 1. Aneuploidia 2. Câncer 3. Instabilidade genética 4. Citocinese 5. Amplificação centrossômica 6. Tetraploidia I. Santelli, Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0158/2011

---

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Marina da Costa-Rosa.

Título da Dissertação: Interferindo na progressão do ciclo celular para analisar possíveis alterações de ploidia em célula tumoral de mama humana.

Orientador(a): Gláucia Maria Machado Santelli.

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

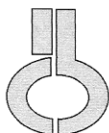
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Nome completo: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Nome completo: .....  
Instituição: .....

Presidente: Nome completo: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 305/09, referente ao projeto intitulado: “*Interferindo na progressão do ciclo celular para avaliar alterações de ploidia em células normais e tumorais de mama humana*” sob a responsabilidade de **Marina da Costa Rosa**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de maio de 2009.

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

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

**DEDICO ESTE ESTUDO,**

*Aos meus queridos pais, Ada, Claudio e Miguel,*

*Á minha irmã Daniela e a minha madrinha Sandra, são para mim uma fonte inesgotável de estímulo, amor e carinho.*

## **MEUS AGRADECIMENTOS,**

À professora Dra Glaucia Maria Machado Santelli por ter me orientado e acreditado em mim para o desenvolvimento dessa dissertação, pela amizade e por todo o carinho em períodos tão difíceis.

À professora Dra Marisa Ionta por quem tenho profunda admiração e carinho, por ter contribuído em minha formação desde o início da graduação, pela infinita amizade, por toda a ajuda (que não foi pouca), pelo carinho e pela companhia dentro e fora do laboratório.

Ao meu amor Alex pelo companheirismo, pelo auxílio em experimentos e idéias, pelos jantares, pela imensa paciência, pelos momentos inesquecíveis e principalmente pelo carinho e dedicação que tem por mim.

À Paula Rezende por todos os ensinamentos em biologia molecular, por todo auxílio em diversos momentos da pós graduação, pelas palavras de incentivo, pela amizade e pelas boas risadas.

Ao professor Dr. Ruy Jaeger e a todos os integrantes do laboratório de biologia tumoral, por permitir a utilização de diversos equipamentos, pelo apoio e troca de idéias e principalmente pela amizade.

Aos amigos da pós graduação Adam, Michelle, Camila e Emerson, pela excelente companhia durante este período, pela troca de experiência, pelas risadas, pelas aflições e principalmente pela amizade.

À dona Nancy por todo suporte ao laboratório, pelas palavras amigas em momentos difíceis, pelos deliciosos bolos de laranja, pelas broncas e principalmente pelas orações.

Ao “Diabólico” JF pela imensa maldade, por todas as discussões científicas ou não, por sempre estar disponível para ajudar, pela amizade e carinho.

Ao Evandro pela amizade, por todas as gargalhadas, pelas “*amalekagens*”, pela companhia no laboratório e fora dele, por toda a ajuda e colaboração.

À Vivian (prima) por sempre me convidar para “jabular”, pelas infinitas palavras de incentivo, pela doçura, pela imensa bondade e por ver o lado positivo de tudo.

À Camila Lauand, por ser um grande exemplo de superação, por sempre estar disposta a me ajudar, por fazer meus dias durante a pós graduação mais alegres, por toda ajuda, por sempre compartilhar das minhas aflições e alegrias, pela eterna amizade e por sempre estar ao meu lado em qualquer situação.

À Queka pela infinita amizade e companhia desde a época da graduação, por compartilhar momentos tão aflitivos, pelos incríveis momentos de diversão, pelas ótimas risadas, por toda a ajuda, pela divertidíssima companhia no Quasi e pelos excelentes momentos no “Clubão”.

À Amandita pela imensa bondade, por dizer as palavras certas nos momentos certos, pela maravilhosa companhia no laboratório, por sempre me chamar para sair, mesmo sabendo que vou “*amalekar*”, pelo “bom gosto”, pela amizade e por todo o carinho.

À Peru por ser tão carinhosa, por todos os doces, pela companhia desde o primeiro dia no laboratório, pelos pratos peruanos e principalmente pela amizade.

Ao Adam por toda a ajuda e amizade em momentos tão aflitivos.

Aos demais amigos do laboratório, Bia, Mingau, Marcel, Fábio, Humberto, Lu, Stefânia, Luciana, Isis, Renan, Lurdes (Ludi), pela constante ajuda e pelos momentos agradabilíssimos no BioCeM.

Ao Roberto Cabado, pela sua grande dedicação na edição de imagens, pela amizade, pelas conversas divertidíssimas no confocal e pelo auxílio durante a elaboração da dissertação.

A toda minha família, tios, primos e avós por sempre acreditarem em mim, pelo intenso carinho e incentivo.

À minhas grandes amigas Juliana, Karolyne e Midori por me fazerem tão feliz e por serem as melhores amigas que alguém pode ter na vida.

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

À FAPESP, Capes e CNPq pelo auxílio financeiro



Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

***“Muitas coisas na vida não podem ser  
explicadas, somente presenciadas”***

*Rachel Naomi Renen*

## RESUMO

COSTA–ROSA, M. **Interferindo na progressão do ciclo celular para analisar possíveis alterações de ploidia em célula tumoral de mama humana**. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O câncer de mama representa um grave problema de saúde pública, sendo a causa de milhares de morte por ano. Foi visto que 80% dos tumores apresentam características aneuplóides, que é causada pela perda e/ou ganha de cromossomos durante o processo de divisão celular, o qual pode contribuir para o desenvolvimento da instabilidade genética. Dessa forma, nosso grupo há anos vem trabalhando na tentativa de entender o significado dos desvios de ploidia em células tumorais, e embora a aneuploidia esteja solidamente associado à transformação maligna, o seu papel neste processo ainda não está definido, assim como o mecanismo pelo qual ela ocorre. Nos últimos anos diversas proteínas têm sido descritas como reguladores na orquestra de eventos durante a divisão celular, principalmente os relacionados com a formação do fuso bipolar e segregação equacional dos cromossomos entre as células filhas, pois falhas nesse processo contribuem diretamente para o desenvolvimento da aneuploidia. No presente estudo propomo-nos a analisar os efeitos da interferência em dois pontos críticos da mitose, a segregação cromossômica e a citocinese, em relação à aneuploidia e à instabilidade genética tumoral. Nossos dados mostram que células MCF-7 submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina determinou o surgimento de fusos mitóticos anormais, amplificação centrossômica, localização ectópica de Aurora A e aumento de micronúcleos, está interferência pode levar a um quadro de instabilidade genética e, conseqüentemente, pode estar envolvido na progressão tumoral, abrindo novas possibilidades para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do ponto de checagem mitótico e resistência a quimioterápicos encontrados em células geneticamente instáveis.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. Aneuploidia. Instabilidade cromossômica. Aurora A. Amplificação centrossômica. Tetraploidia.

## ABSTRACT

COSTA-ROSA, M. **Interference in the cell cycle progression to analyze possible alteration of ploidy in tumor cell of human breast.** 2011. 73 p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Breast cancer represents a major public health problem, resulting in thousands of death for year. It was showed that 80% of the tumors presented aneuploidy characteristics, which is caused by gaining or losing whole chromosomes during the process of cell division, and may contribute to the instability genetic development. Therefore, our group has worked to understand the process leading to change of ploidy in tumor cells, although the aneuploidy is associated to malignant transformation, their role in this process still not clear, as well as the mechanism that it occurs. In the last years it has been described many proteins involved in regulation of mitosis, mainly those related to bipolar spindle and chromosome segregation in the daughter cells, failure in this process contributes directly to aneuploidy development. In this work we propose to study the effects in two critical points in the mitosis, the chromosome segregation and cytokinesis, in relation to aneuploidy and genetic tumor instability. Our data showed that MCF-7 cells sequential treated of Monastrol and Blebbistatin showed abnormal mitotic spindle, centrosome amplification, Aurora A ectopic and micronucleus increased, this interference can lead to an genetic instability and may be involved in a tumor progression, opening news possibilities to study the molecular mechanisms involved in regulation the checkpoint mitotic and resistance to chemotherapy found in genetically unstable cells.

**Key Word:** Breast cancer. Aneuploidy. Chromosome instability. Aurora A. Centrosome amplification. Tetraploidy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Esquema representando a anatomia da mama humana feminina normal.....	<b>17</b>
<b>Figura 2:</b> Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico de células MCF-7 em cultura.....	<b>27</b>
<b>Figura 3:</b> Esquema do tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina em células MCF-7.....	<b>28</b>
<b>Figura 4:</b> Curva de crescimento da linhagem MCF-7.....	<b>34</b>
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase da linhagem celular MCF-7 submetida ao tratamento com Monastrol.....	<b>36</b>
<b>Figura 6:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser da linhagem celular MCF-7 submetida ao tratamento com Monastrol.....	<b>37</b>
<b>Figura 7:</b> Células MCF-7 tratadas com 100 µM de Monastrol por 15 horas e recuperadas por 4 horas em meio fresco sem a presença de droga.....	<b>39</b>
<b>Figura 8:</b> Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 tratadas com Monastrol por 15 horas.....	<b>40</b>
<b>Figura 9:</b> Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 recuperada por 4 horas, após tratamento com Monastrol.....	<b>41</b>
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser da linhagem celular MCF-7.....	<b>44</b>
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina (T0).....	<b>47</b>

<b>Figura 12:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 recuperadas por 24 horas em meio fresco após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina.....	<b>48</b>
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 recuperadas por 24 horas após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina.....	<b>49</b>
<b>Figura 14:</b> Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina.....	<b>50</b>
<b>Figura 15:</b> Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 recuperadas por 24 horas, após tratamento com Monastrol e Blebistatina.....	<b>51</b>
<b>Figura 16:</b> O tratamento com Monastrol e Blebistatina (T0) não possuem efeito sobre a apoptose em células MCF-7.....	<b>54</b>
<b>Figura 17:</b> O período de 24 horas de recuperação, após o tratamento com Monastrol e Blebistatina, não mostrou efeito sobre a apoptose em células MCF-7.....	<b>55</b>
<b>Figura 18:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 controle evidenciando o padrão de distribuição de Aurora A.....	<b>57</b>
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina (T0) evidenciando o padrão de distribuição de Aurora A.....	<b>60</b>
<b>Figura 20:</b> Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina e recuperadas por 24 horas (T24) evidenciando o padrão de distribuição de Aurora A.....	<b>61</b>
<b>Figura 21:</b> Bandas obtidas por <i>Western Blotting</i> para análise da expressão proteica de Aurora A total e fosforilada, Cdc20 total e fosforilada e $\beta$ -Tubulina em células MCF-7.....	<b>62</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Anatomia da mama humana normal</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Câncer de mama</b> .....	<b>17</b>
<b>1.3 Origem e classificação dos tumores de mama</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4 Ponto de checagem mitótico</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5 Auroras quinases</b> .....	<b>21</b>
<b>1.6 Instabilidade genética e aneuploidia</b> .....	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Cultura celular</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 Curva de crescimento</b> .....	<b>28</b>
<b>3.3 Tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4 Quantificação de DNA</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5 Imunofluorescência</b> .....	<b>30</b>
3.5.1 $\alpha/\beta$ Tubulina.....	29
3.5.2 Aurora A.....	30
<b>3.6 Frequência de alterações nucleares</b> .....	<b>30</b>
<b>3.7 Ensaio de apoptose</b> .....	<b>31</b>
<b>3.8 Análise ao microscopia confocal</b> .....	<b>31</b>
<b>3.9 Western blotting</b> .....	<b>32</b>
<b>3.10 Análise estatística</b> .....	<b>33</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Curva de crescimento da linhagem MCF-7</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2 Formação de fuso monopolar após tratamento com Monastrol</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3 Alterações no ciclo celular após o tratamento com Monastrol</b> .....	<b>39</b>

---

<b>4.4 Alterações morfológicas após tratamento com Blebistatina.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Efeito do tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina na morfologia celular de MCF-7.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 Alterações morfológicas em células MCF-7 submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina, seguidas de 24 horas de recuperação em meio fresco.....</b>	<b>45</b>
<b>4.7 Ação do tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina no ciclo celular de células MCF-7.....</b>	<b>45</b>
<b>4.8 Análise do ciclo celular de células MCF-7 submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina, seguidas de 24 horas de recuperação em meio fresco.....</b>	<b>52</b>
<b>4.9 O tratamento de Monastrol e Blebistatina não induzem apoptose em células MCF-7.....</b>	<b>52</b>
<b>4.10 Perfil de localização de Aurora – A após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina.....</b>	<b>53</b>
<b>4.11 Expressão de proteínas envolvidas no processo de divisão celular em células MCF-7.....</b>	<b>56</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>

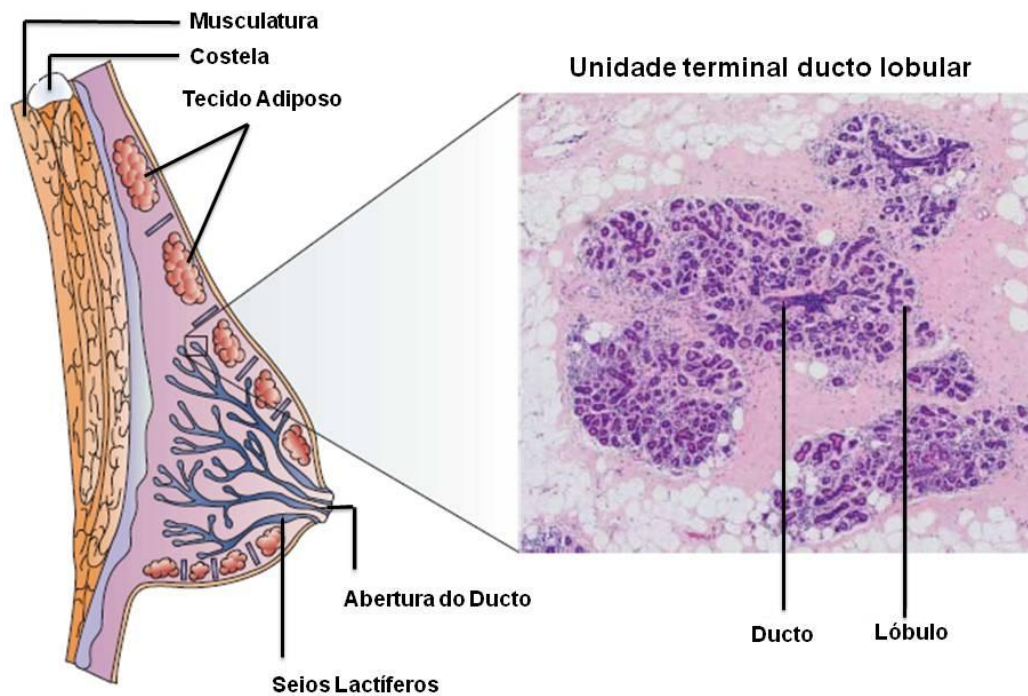


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Anatomia da mama humana*

A mama humana é formada por um sistema de ductos ramificados a partir do mamilo, os quais são envoltos por um denso estroma constituído de tecido adiposo e tecido conjuntivo fibroso. O complexo sistema de ductos ramificados de mama pode ser dividido em dois grupos: a unidade terminal ducto – lobular (UTDL) e os grandes ductos. A UTDL também conhecida por lóbulo mamário que representa a porção secretória da glândula. Durante a gravidez ou lactação, os pequenos ductulos do lóbulo formam uma estrutura glandular esférica, com uma cavidade interna, denominada ácinos. A secreção mamária é conduzida desde os ácinos até os mamilos por meio dos ductos mamários (SCHMITT e GOBBI, 2006). A Figura 1 representa a anatomia de uma mama humana normal e suas principais estruturas.

Os ductos e os lóbulos são revestidos internamente por dois tipos de células epiteliais, as luminais e as mioepiteliais. A camada interna de células é composta por células luminais, que são células colunares com capacidade de secreção e absorção de fluidos e a camada externa ou basal é formada por células mioepiteliais, as quais possuem morfologia variável desde arredondadas a alongadas. Estas duas camadas de células são apoiadas em uma membrana basal rica em lamina e colágeno tipo IV (SCHMITT e GOBBI, 2006; SMALLEY e ASHWORTH, 2003). Este mesmo ambiente orienta as células epiteliais a estabelecerem a extremidade apical e basal, sendo este contato físico entre a célula e a membrana basal regulado através da combinação de diversas junções aderentes (BISSEL et al., 2002).



**Figura 1:** Esquema representando a anatomia da mama humana feminina normal (esquerda) e uma fotomicrografia corada por HE de um corte transversal da região terminal do ducto lobular (direita).  
Fonte: Smalley e Ashworth, 2003.

## 1.2 Câncer de mama

No mundo, mais de 1 milhão de novos casos de câncer de mama são diagnosticados anualmente, sendo a neoplasia mais comum entre as mulheres e o segundo tipo de tumor mais freqüente no mundo (BRAY; MCCARRON; PARKIN, 2004). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimou que em 2010, 49.240 novos casos seriam diagnosticados (INCA, 2011). Em geral as altas taxas do desenvolvimento do câncer de mama podem estar relacionadas a diversos fatores de riscos, como hábitos alimentares (ingestão de álcool e gorduras), predisposição genética, faixa etária e aspectos da vida reprodutiva como: menarca precoce, menopausa tardia, idade da primeira gestação, gestação em idade avançada e nuliparidade (nunca ter tido filhos) (PIKE et al., 1983; TRICHOPOULOS et al., 2008). A faixa etária tem uma grande influência na incidência do câncer de mama, sendo menos frequente antes dos 25 anos de idade. Sua incidência aumenta a partir dos

35 anos, e a cada década de vida este risco aumenta consideravelmente (SCHMITT e GOBBI, 2006). A partir da menopausa, a incidência de câncer de mama apresenta uma redução, o que não é observada em outros tipos de câncer (TRICHOPOULOS et al., 2008).

Esta incidência no desenvolvimento do câncer de mama pode ser decorrente da contínua exposição do estrogênio ao tecido mamário. Nas últimas décadas, diversos estudos mostram que o estrogênio influencia na carcinogênese de mama, através de mecanismos moleculares, que ainda não estão totalmente elucidados. Porém três grandes mecanismos são descritos como provenientes da ação do estrogênio, os quais são: (1) estímulo da proliferação celular, pela ativação dos receptores de estrogênio, (2) efeitos genotóxicos decorrentes de espécies reativas de oxigênio, que são formados a partir dos metabólitos de estrogênio, contribuindo dessa maneira para anormalidades cromossômicas e (3) regulação da atividade de algumas enzimas e fatores de transcrição que podem levar a transformação celular. Estes mecanismos podem contribuir fortemente para o início e progressão tumoral da mama (CHANG, 2011; RUSSO e RUSSO, 2006; YAGER et al., 2006). Dentro deste contexto, é de certa forma também esperado que a nuliparidade e/ou a idade tardia de gestação influencie na carcinogênese da mama (BUTT et al., 2009), devido a um aumento de exposição aos hormônios. Considerando que o tecido mamário só termina seu desenvolvimento durante a primeira gestação, quanto mais tarde, maiores as chances do desenvolvimento de mutações nas células indiferenciadas, que possuem uma maior capacidade proliferativa. O uso de contraceptivos orais ainda tem sido extremamente debatido, pois os resultados são divergentes e acredita-se que existam outros fatores biológicos e ambientais que favoreçam o risco do desenvolvimento da doença (HAILE et al., 2006).

Acredita-se que 90 a 95% dos cânceres humanos sejam do tipo esporádico (sem origem familiar) decorrente de mutações somáticas durante a vida e que 5 a 10% sejam de origem hereditária, no qual freqüentemente são encontrados mutações nos oncogenes BRCA1 e BRCA2. Estes oncogenes participam do mecanismo de reparo do DNA e mutações nos mesmos podem acarretar no desenvolvimento de tumores (TURNER; TUTT; ASHWORTH, 2004).

### 1.3 Origem e classificação dos tumores de mama

A origem do carcinoma de mama ainda permanece desconhecida, porém existe uma hipótese de que o câncer de mama invasivo se inicia na região UTDL. A progressão do carcinoma mamário pode ser decorrente de anormalidades celulares marcadas por excessiva proliferação. De acordo com este modelo, ocorre uma excessiva proliferação das células epiteliais luminais, com concomitante aumento de angiogênese, perda da integridade da membrana basal e invasão destas células para o estroma (CICHON et al., 2010).

O carcinoma de mama *in situ* é definido por uma proliferação anormal de células epiteliais, onde ocorre um aumento de fibroblastos e células imunológicas infiltrantes no estroma celular e aumento da angiogênese, porém a membrana basal continua intacta. Este carcinoma pode ser dividido em ductal *in situ* (80% de frequência) e lobular *in situ* (20% de frequência). O carcinoma *in situ* corresponde apenas a 15 – 20% do total de cânceres de mama humana (CICHON et al., 2010; SCHMITT e GOBBI, 2006). O carcinoma invasivo corresponde a todos os tipos carcinomas mamários que infiltram no estroma e são caracterizados, pela perda da integridade da membrana basal, perda das células mioepiteliais e invasão das células tumorais nos tecidos adjacentes e vasos, representando de 70 a 85 % dos casos de câncer de mama humana (CICHON et al., 2010; SCHMITT e GOBBI, 2006).

Um conjunto complexo de alterações moleculares está envolvido no processo de tumorigênese e evolução tumoral. Tais alterações podem conferir às células tumorais maior potencial proliferativo, evasão à apoptose, angiogênese sustentada e capacidade de invadir e formar metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2000). A perda da regulação normal do ciclo celular é uma característica de cânceres humanos e, normalmente, envolve falhas nos pontos de checagem do processo de divisão celular (NEBERT, 2002). Nos últimos anos, o ponto de checagem mitótico, tem sido amplamente estudado com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos moleculares que regulam a segregação cromossômica durante a mitose, considerando que erros nesse processo contribuem diretamente para a formação de progênies aneuplóides e subsequente um fenótipo maligno (BARTEK e LUKAS, 2001).

#### 1.4 Ponto de checagem mitótico

O ponto de checagem mitótico detecta se houve ligação correta do fuso mitótico aos cinetócoros e se os cromossomos estão perfeitamente alinhados na placa metafásica. Caso existam cromossomos não ligados ao fuso e/ou não alinhados corretamente, não haverá progressão para a anáfase. Tal mecanismo previne a segregação não equacional de cromossomos entre as células filhas (LI e NICKLAS, 1995; RIEDER et al., 1994).

Os componentes do ponto de checagem mitótico regulam a atividade ubiquitina ligase do complexo promotor de anáfase (APC). O complexo APC é composto de diversas subunidades e cofatores adicionais, um desses cofatores essenciais é a proteína Cdc20 (*cell division cycle 20*), que atua ativamente durante o início da mitose, regulando a atividade do complexo. A Cdc20 contém um domínio conhecido como WD40, que é capaz de reconhecer e se ligar ao complexo APC. Esta ligação do complexo com a proteína Cdc20 leva a degradação de diversas proteínas, incluindo a Securina (PETER, 2002), permitindo que a Separase se torne ativa, clivando a proteína Coesina, presente entre as cromátides irmãs, permitindo assim que os cromossomos se separem, dando início a anáfase (KING et al., 1996; VADER et al., 2008).

Caso existam cinetócoros não ligados ao fuso mitótico ou cromossomos desalinhados, a anáfase é atrasada pela atividade do complexo APC, que não é ativado pela Cdc20 efetuando assim a ubiquitinização das proteínas envolvidas no processo de divisão, as quais devem ser degradadas para a entrada na anáfase (BHARADWAJ e YU, 2004; CLEVELAND; MAO; SULLIVAN, 2003). Dessa forma, falhas no ponto de checagem mitótico permitem a propagação de cariótipos anormais, gerando grande instabilidade genética, a qual contribui para o processo de carcinogênese (BHARADWAJ e YU, 2004; CHI e JEANG, 2007; LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998).

Diversas proteínas estão envolvidas no ponto de checagem mitótico, as quais incluem as proteínas que são essenciais para a ligação dos cinetócoros no fuso (CENP-E e a MACK) e as que monitoram essa ligação (Mad1, Mad2, Mad3, Bub1, Bub3 e BubR1). Mutações nos genes que codificam estas proteínas e/ou alteração no padrão de expressão proteica podem levar a falhas no mecanismo de verificação

do ponto de checagem e geralmente estão envolvidas no processo carcinogênico (BABU et al., 2003; BAKER et al., 2004; MICHEL et al., 2001).

### 1.5 Auroras quinases

Nos últimos anos, tem sido descrita uma família de proteínas serina/treonina quinases denominadas Auroras que, em mamíferos, inclui três membros (Auroras A, B e C), cujos genes localizam-se respectivamente nos cromossomos 20q13.2, 17p13.1 e 19q13.43. Essas proteínas estão diretamente envolvidas a vários eventos durante a mitose (MARUMOTO et al., 2005; SAUNDERS et al., 2000). 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 do centrôssomo, formação do fuso mitótico, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e citocinese (CARMENA e EARNSHAW, 2003; KUFER; NIGG e SILLJÉ, 2003; MARUMOTO et al., 2005). A atividade funcional da Aurora C ainda não foi bem caracterizada, contudo, estudos mostram que ela é altamente expressa em testículo e sua atividade é, portanto, relevante no processo de gametogênese. Curiosamente, células tumorais apresentam expressão elevada de Aurora C e foi proposto que sua atividade funcional seja semelhante à de Aurora B (SASAI et al., 2004; YAN et al., 2005).

Atualmente dentre todas as quinases mitóticas conhecidas, a Aurora A tem sido a mais intensivamente estudada. Aurora A está localizada no centrôssomo e é essencial para a progressão da mitose. A expressão de Aurora A é observada em praticamente todo o ciclo celular, sendo que no final de G1, é encontrada na matriz pericentriolar dos centrôssomos, aumentando seu nível de expressão durante o ciclo celular (STENOIEN et al., 2003). A Aurora A está envolvida na maturação centrôssômica agindo na fosforilação da proteína TACC (*transforming acidic coiled-coil*), que quando fosforilada é encaminhada à região centrôssômica. A TACC por sua vez, forma um complexo com proteínas que se associam à microtúbulos (Mps/XMAP215), estimulando polimerização dos mesmos (MARUMOTO et al., 2005).

Durante a separação centrôssômica, a Aurora A atua fosforilando a proteína motora Eg5, auxiliando no processo de migração dos centrôssomos 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. Além disso, a Aurora A permite a entrada em mitose devido a fosforilação da proteína Ajuba, evento que recruta os complexos Ciclina B-Cdk1 responsáveis pela transição G2/M no ciclo celular (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 (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, o que contribui para o processo de carcinogênese (CASTILLO et al., 2007; CARMENA e EARNSHAW, 2003; DELUCA, LAVIA; GUARGUAGLINI, 2006; MARUMOTO et al., 2005).

A Aurora B representa a subunidade catalítica e as proteínas INCEP, Survivina e Borealina representam a subunidade regulatória do complexo CPC (*chromosomal passenger complex*). A atividade do complexo CPC é essencial para a segregação equacional dos cromossomos entre as células filhas e a Aurora B está diretamente envolvida no recrutamento de proteínas do ponto de checagem mitótico (VADER; MEDEMA e LENS, 2006).

A progressão pela anáfase envolve a movimentação dos cromossomos para os pólos opostos. Na zona equatorial da célula, os microtúbulos interpolares se agregam e formam o fuso central (GLOTZER, 2005; STRAIGHT e FIELD, 2000), o qual estimula o início da constrição celular (MCCOLLUM, 2004; OEGEMA; MITCHISON, 1997; WHEATLEY e WANG, 1996). Durante a progressão do anel contrátil, os microtúbulos ficam extremamente compactados e ocupam uma região de estrangulamento de membrana denominada corpo intermediário (OTEGUI; VERBRUGGHE; SKOP, 2005). Nessa região, os microtúbulos estão sobrepostos e interagem com proteínas que constituem a matriz do corpo intermediário. Vale ressaltar que os microtúbulos desta região são mais estáveis à despolimerização e

estas proteínas da matriz do corpo intermediário estão diretamente envolvidas nesse processo de formação do anel contrátil (SKOP et al., 2004).

Dentre as proteínas presentes na matriz do corpo intermediário está a Aurora B (ADAMS; CARMENA; EARNSHAW, 2001; VADER et al., 2006), que é essencial para a interação dos microtúbulos com o córtex celular. Estudos mostram que o silenciamento gênico de Aurora B resulta em falhas no processo de citocinese, devido a falhas no anel contrátil (MINOSHIMA et al., 2003; MIYAUCHI et al., 2007). Dessa forma, as Auroras atuam regulando e organizando o ponto de checagem mitótico durante o processo de divisão celular, permitindo a propagação de um cariótipo normal.

### **1.6 Instabilidade genética e aneuploidia**

A instabilidade genética é um dos *hallmarks* do câncer, onde os tumores humanos exibem uma grande variedade de alterações genéticas, tais como: mutação pontuais, translocações, amplificações, deleções e números alterados de cromossomos (RAJAGOPALAN e LENGAUER, 2004b). Durante a divisão celular, o genoma é precisamente duplicado e dividido de forma equacional entre as células filhas. No entanto, se falhas ocorrerem neste processo, às células filhas podem herdar um número alterado de cromossomos e esta condição é conhecida como aneuploidia.

Há mais de cem anos, Theodor Boveri mostrou que embrião de ouriços do mar submetido a divisões celulares anormais resultava em falhas no desenvolvimento, alteração atribuída ao diferente conteúdo de DNA entre as células. Baseando-se em seus resultados e na observação de Von Hansemann, de figuras mitóticas anormais em células tumorais, Boveri propôs que a constituição anormal de cromossomos poderia promover o desenvolvimento do câncer (HOLLAND e CLEVELLAND, 2009). No entanto, os mecanismos que regulam a segregação cromossômica continuam sendo um desafio para ciência. Atualmente, a aneuploidia é uma característica encontrada na maioria dos tumores sólidos humanos (WEAVER e CLEVELLAND, 2006). Entretanto, se aneuploidia é causa ou consequência da transformação maligna ainda permanece um grande debate.

Existem diversas vias que podem contribuir para o desenvolvimento da aneuploidia, ou seja, pela ganha e perda de cromossomos, entre elas estão; (1)



defeitos na sinalização do ponto de checagem mitótico, como por exemplo, mutações nos genes codificantes das proteínas BubR1 e Mad2 que monitoram e sinalizam se há cromossomos soltos do fuso mitótico; (2) perda prematura da coesão entre as cromátides irmãs; (3) ligações merotéticas, onde microtúbulos do mesmo pólo mitótico se ligam ao mesmo cinetócoro; e (4) fuso multipolar, que pode acontecer em células que possuem mais de dois centrossomos, tal evento pode culminar na formação de múltiplos fusos mitóticos. Estudos recentes mostram que a aquisição de centrossomos extras pode ser decorrente de células que sofreram falhas no processo de citocinese (HOLLAND e CLEVELAND, 2009; KOPS; WEAVER; CLEVELAND, 2005). Falhas neste processo podem ser provocadas pela desregulação ou mutação de genes que monitoram a progressão mitótica. A super expressão de Aurora A, induz amplificação centrossômica e formação de progênie tetraplóide (NADLER et al., 2008). Foi observado que estas progênies tetraplóides podem promover erros na segregação cromossômica e rearranjos estruturais que contribuem para a tumorigênese em modelos de tumores de mama (FUJIWARA et al., 2005).

Estudos na literatura têm investigado os mecanismos moleculares envolvidos na determinação da instabilidade genética e desvios dos valores de ploidia em tumores sólidos (CASTILLO et al., 2007; DELUCA, LAVIA; GUARGUAGLIN, 2006; KOPS; WEAVER e CLEVELAND, 2005). Diversos mecanismos estão envolvidos na determinação do fenótipo aneuplóide em células tumorais, anormalidades na montagem do fuso mitótico bipolar e interrupção da citocinese representando eventos importantes na progressão tumoral. Dessa forma, estes eventos do processo de divisão celular têm sido amplamente investigados na tentativa de identificar compostos que possam ser utilizados em novas abordagens terapêuticas (NIGG, 2002).

Diferentemente das drogas que impedem a polimerização e despolimerização dos microtúbulos como os alcalóides da Vinca e o Taxol, respectivamente, o Monastrol não apresenta efeito sobre a dinâmica dos microtúbulos, mas inibe a atividade da proteína motora Eg5. Essa proteína pertence à subfamília BimC, a qual está diretamente envolvida na movimentação do centrossomo e formação do fuso bipolar durante a divisão celular (DEBONIS et al., 2003). Estudos mostram que alterações nessas proteínas podem causar falhas na separação dos centrossomos, formação e manutenção do fuso mitótico. Adicionalmente, a inibição de Eg5 por

silenciamento gênico ou por moléculas inibidoras, como o Monastrol, resulta em parada da mitose e fuso monopolar (SAWIN et al., 1992).

Estudos prévios do nosso laboratório têm investigado os mecanismos envolvidos no processo de poliploidização em células normais e tumorais de fígado (IONTA, 2005). No fígado a poliplodização está associada a eventos fisiológicos normais e também a processos patológicos incluindo a carcinogênese. Lu et al. (2007) demonstraram que populações de hepatócitos normais poliplóides 4N e 8N não apresentam mudanças no perfil normal de expressão gênica e, portanto, o desvio de ploidia está, provavelmente, associado às funções específicas desse tipo celular, contrariamente ao observado em hepatocarcinoma, cujo aumento de ploidia é acompanhado de alterações no perfil de expressão gênica e, portanto, deve estar associado à instabilidade genética.

Do exposto acima fica claro que embora a aneuploidia esteja solidamente associada à transformação maligna, o seu papel neste processo ainda não está claro, assim como o mecanismo pelo qual ela ocorre. Os estudos que buscam a elucidação destes aspectos relacionados ao desenvolvimento do câncer convergem para o estabelecimento de moléculas que atuem preferencialmente na mitose como alvos a novas e mais eficientes propostas de terapia da doença. A relevância destes estudos é reforçada pelo grave problema que representa o desenvolvimento de resistência a drogas que, freqüentemente, ocorre durante o tratamento dos diferentes tipos de tumores malignos.

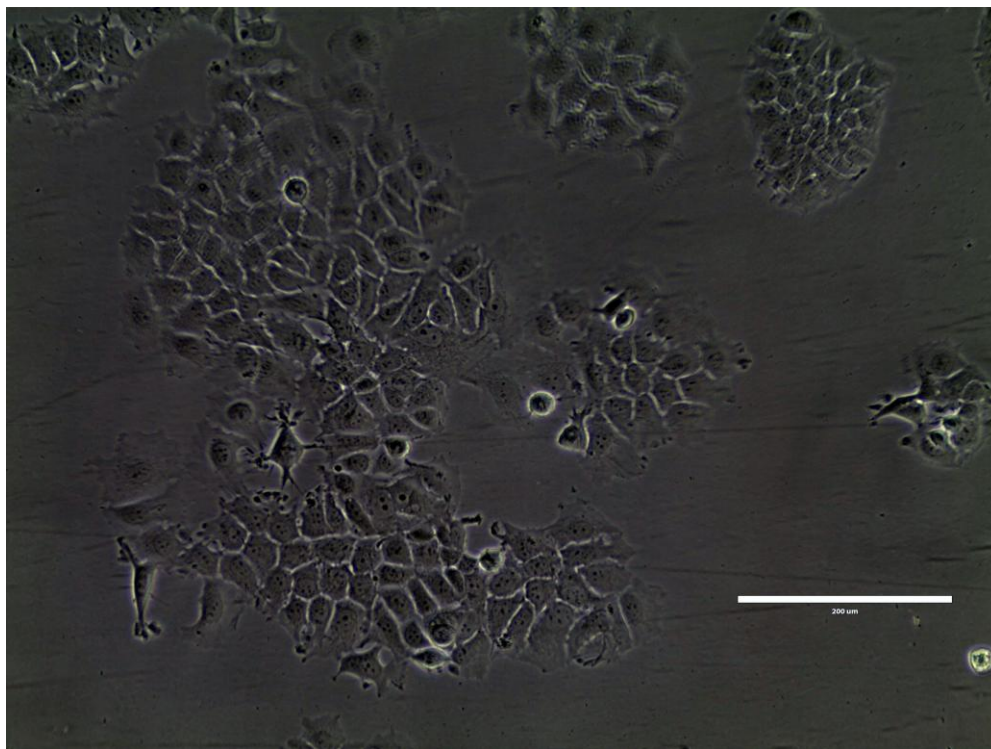
## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos da interferência em dois pontos críticos da mitose, a segregação cromossômica e a citocinese, em relação à aneuploidia e à instabilidade genética tumoral.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura celular

Neste trabalho foi utilizada a linhagem MCF-7 (Figura 2), proveniente de adenocarcinoma mamário, estabelecida por Soule et al., 1973. A linhagem MCF-7 foi obtida através da ATCC (*American type culture collection cell line and hybridomas*, EUA). As células foram mantidas em DMEM – F12 (*Dulbecco,s Modified Eagle’s Minimum Essential Medium*, Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). As culturas foram mantidas em atmosfera controlada com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. As subculturas foram realizadas a cada 2 ou 3 dias por meio de digestão enzimática contendo solução tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02%. O estoque da linhagem foi congelado em meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino e 10% de crioprotetor (Dimetilsulfóxido – DMSO, Sigma-Aldrich, EUA), acondicionadas em ampolas e mantidas em nitrogênio líquido.



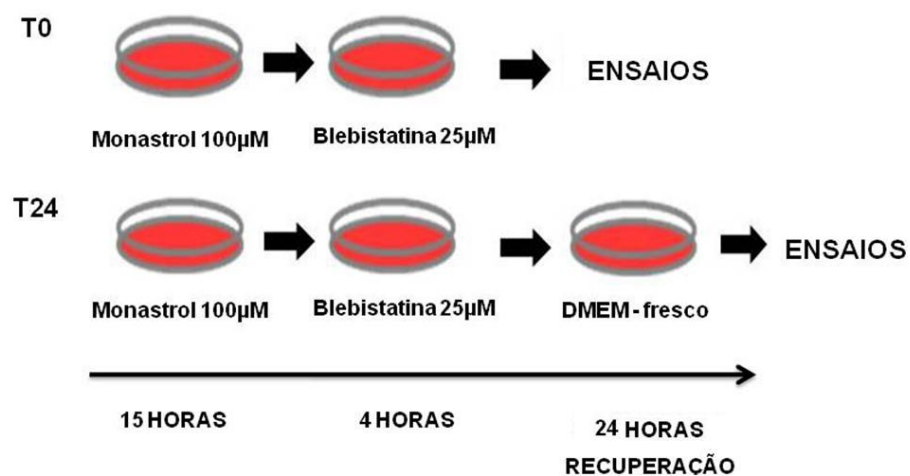
**Figura 2:** Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase, mostrando o aspecto morfológico de células MCF-7 em cultura. Escala: 200 µM.

### 3.2 Curva de crescimento

As células foram semeadas em triplicatas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro com o inóculo inicial de  $1 \times 10^4$  células por placa. As contagens foram realizadas no 2º, 4º, 6º e 8º dia após o plaqueamento, com o auxílio do citômetro de fluxo (EasyCyte MINI da Guava Technologies, EUA). Os dados obtidos a partir de triplicatas são mostrados como média e desvio padrão.

### 3.3 Tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina

A fase exponencial de crescimento foi determinada a partir da curva de crescimento e o esquema de tratamento foi realizado na fase exponencial da cultura (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema do tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina em células MCF-7.

As concentrações utilizadas das drogas foram baseadas na literatura. A concentração utilizada de Monastrol foi de 100 µM (KAPPOR et al., 2009) e de Blebistatina as concentrações variaram na literatura entre 25 e 100 µM (DUXBURY et al., 2003; STRAIGHT, 2004), para avaliar o efeito de Blebistatina na linhagem MCF-7, utilizamos as concentrações de 25 µM, 50 µM e 100 µM, nas diferentes concentrações o efeito obtido foi mesmo.

As células foram semeadas numa concentração de  $3 \times 10^4$  ou  $5 \times 10^4$  células por placa dependendo do ensaio. Após 24 horas em cultura as células foram tratadas

com Monastrol (Sigma) por 15 horas numa concentração de 100  $\mu\text{M}$ , após esse período o meio foi substituído por meio de cultura DMEM fresco contendo 25  $\mu\text{M}$  de Blebistatina por 4 horas. Os ensaios foram realizados logo após o tratamento (T0) e em tempo de recuperação (T24), onde as células permaneceram em meio fresco livre de drogas por 24 horas

### **3.4 Quantificação de DNA**

As células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm, com inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  células/placa. Após os tratamentos, as células foram soltas das placas por digestão enzimática, seguidas de inativação por soro fetal bovino e transferidas para tubos Falcon de 15 mL, a suspensão celular foi centrifugada por 5 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 cuidadosa agitação, os tubos foram colocados no gelo por 1 hora. Houve nova centrifugação, nas mesmas condições anteriores e, após a retirada do sobrenadante, as células foram lavadas com 1,0 mL de PBSA, seguidas de nova centrifugação e retirada do sobrenadante, o precipitado foi ressuspenso em solução contendo 200  $\mu\text{L}$  de PBSA, 20  $\mu\text{L}$  de RNAase (10 mg/mL) e 20  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo (10 mg/mL). A solução foi cuidadosamente agitada e deixada no gelo por 1 hora. Após este período o DNA das amostras foi pelo citometro de fluxo EasyCyte MINI da Guava Technologies. Os dados foram obtidos em triplicatas.

### **3.5 Imunofluorescência**

#### **3.5.1 $\alpha/\beta$ - Tubulina**

Para os ensaios de imunofluorescência as células foram semeadas sobre lamínulas de 18x18 cm em placas de Petri de 35 mm de diâmetro. O inóculo inicial foi de  $3 \times 10^4$  células por placa. Após o tratamento, as células foram fixadas em formaldeído (3,7%) por 30 minutos e com Triton X-100 (0,5%) por 15 minutos, para a permeabilização das membranas. As preparações foram lavadas três vezes com PBSA e 5  $\mu\text{L}$  de anticorpo anti- $\alpha$  tubulina e 5  $\mu\text{L}$  anti- $\beta$  tubulina (1:250, Sigma Aldrich) foram adicionados sobre as lamínulas onde permaneceram em contato com as

células durante a noite em câmara úmida. Após novas lavagens em PBSA, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo FITC (1:1000) foi incubado por 2 horas, sendo o material neste momento mantido em câmara úmida e escura. As células foram tratadas com RNase (10 µg/mL) por 35 minutos, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo 3 µl de iodeto de propídio (10 µg/mL) para a coloração dos núcleos e 7 µl de *anti-fading* (Vecta-Shield, Vector-Lab, EUA).

### 3.5.2 Aurora A

Para o ensaio de imunofluorescência de Aurora A, as células foram semeadas em lamínulas de 18x18 cm em placas de petri de 35 mm, sendo o inóculo inicial de  $3 \times 10^4$  de células por placa. As células foram fixadas em metanol gelado (Merck, ALE) por 10 minutos, seguida de lavagens com PBSA e adicionado 10 µl do anticorpo monoclonal anti-aurora A na diluição de 1:100 (Abcam, EUA) sobre a lamínula durante a noite a 4 °C. Após novas lavagens em PBSA, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo FITC (1:1000) foi incubado por 2 horas, sendo o material neste momento mantido em câmara úmida e escura. As células foram tratadas com RNase (10 µg/mL) por 35 minutos, as lamínulas foram montadas em lâminas contendo 3 µl de iodeto de propídio (10 µg/mL) para a coloração dos núcleos e 7 µl de *anti-fading* (Vecta-Shield, Vector-Lab).

## 3.6 Frequência de alterações nucleares

As células foram cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro com uma densidade inicial de  $3 \times 10^4$  células/placa. Após o período do tratamento o meio foi retirado e realizado as preparações de imunofluorescência. As lamínulas, foram lavadas em PBSA 3 vezes e fixadas em formaldeído (3,7%) por 30 minutos e submetidas a permeabilização com Triton X-100 (0,5%) por 15 minutos seguindo-se, então, tratamento com RNAase a 10 mg/mL durante 35 minutos. Para coloração do DNA foi utilizado iodeto de propídeo na concentração de 10 mg/mL, onde as lâminas foram montadas com "*anti-fading*" (Vecta-Shield-Vector). A análise consistiu na contagem de 2.000 células por lâmina, em média, e as alterações nucleares como: micronúcleo e binucleação foram contadas em microscópio de fluorescência segundo a classificação de Tolbert et al. (1992), modificada por



Manelli-Oliveira e Machado-Santelli (2001). Foram contadas 3 preparações citológicas de cada grupo obtidas a partir de experimentos independentes.

### **3.7 Ensaio de apoptose**

Para avaliar se o tratamento com Monastrol e Blebistatina poderia induzir apoptose. Células MCF-7 foram tratadas com Monastrol e Blebistatina ou DMSO (solução veículo). Para o controle positivo da apoptose as células foram irradiadas por luz U.V por 5 minutos. Em seguida, a taxa de células em apoptose foi avaliada utilizando o *kit ApoTarget Annexin-V FITC Apoptosis* (Invitrogen. EUA). Os dados foram analisados pelo programa *GUAVA Cytosoft*. A técnica empregada se baseia na marcação de células apoptóticas com anexina-V-FITC, a qual tem forte afinidade por fosfatidilserina. Em células viáveis, a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática. Durante as fases iniciais da apoptose, esse fosfolípido é translocado para o folheto externo da membrana, ficando exposto à anexina-V-FITC. Juntamente com a anexina-V-FITC, foi utilizado iodeto de propídeo para diferenciação dos processos de apoptose e necrose.

Assim, as células foram coletadas e ressuspensas em tampão de ligação à anexina-V-FITC (HEPES/NaOH 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM) e, em seguida, foram incubadas com 5 µl de anexina-V-FITC e 10 µl de iodeto de propídeo em temperatura ambiente por 15 minutos. A detecção da fluorescência emitida pelo fluoróforo FITC foi realizada por citometria de fluxo (excitação a 488 nm). Cinco mil eventos de cada grupo foram analisados e os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.8 Análise ao microscópio confocal**

As imagens de imunofluorescência foram obtidas por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (Zeiss LSM 510). Os lasers utilizados foram os de argônio (458 nm, 488 nm e 514 nm) e hélio-neônio (543 nm) ligados a um microscópio invertido de fluorescência (Zeiss Axiovert 100M). A fluorescência emitida foi selecionada por filtros específicos e exibida com uma resolução de 512x512 ou 1024x1024 pixels em modo RGB.3.1.



### 3.9 Western Blotting

As células foram semeadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro a uma densidade inicial de  $5 \times 10^4$  células por placa. Nos dias de interesse, as células foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1,0%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50 mM-HCl, pH=7,5) contendo inibidores de protease (mix da Sigma- Aldrich) e de fosfatase ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM e NaF 5 mM, Sigma - Aldrich). Após centrifugação (12000 g) por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e alíquotas foram separadas para quantificação, a qual foi realizada pelo método de BCA. A leitura da absorbância foi realizada por leitor de ELISA utilizando filtro de 595 nm. O fracionamento das proteínas foi realizado em mini-gel de poliacrilamida 12% com SDS (2 horas e 120 V) em tampão de corrida (Tris 0,25 M, Glicina 1,92 M, 2% de SDS - em água miliQ em pH: 8,3). Para tal as amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH=6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e betamercaptoetanol 1% em água milliQ) e fervidas por 5 minutos a 100 °C. Em cada poço foram carregados 30 µg de proteína total. O padrão de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Protein Standards – Dual core Bio-Rad.

A transferência para membrana de PVDF (*Amersham Pharmacia*) foi realizada por 2 horas a 200 mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol 20% em água destilada). A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana em solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada em TBS 0,02 M por 3 vezes de 10 minutos cada. O bloqueio foi realizado com TBS 0,02 M contendo 1% de albumina e Tween 20 (*Pharmacia*) 0,05% por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após o bloqueio os anticorpos primários anti- Aurora A monoclonal (1:500), anti- Aurora A fosfoT288 policlonal (1:500), anti-Cdc20 (1:500), anti-Cdc20 fosforilada (1:500) foram diluídos em TBS 0,02 M e 1% de albumina contendo inibidores de fosfatase, incubados a noite toda a 4 °C sob agitação. Os anticorpos foram provenientes da Abcam. Após sucessivas lavagens com TBS e TTBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (1:1000) (Kit ECL<sup>®</sup>, *Amersham Pharmacia*) e revelada por quimioluminescência (ECL<sup>®</sup>, *Amersham Pharmacia*) conforme especificações do fabricante, os resultados foram registrados em filme em *Hyperfilm Amersham*. Para controle da concentração de

proteínas carregadas por poço foi utilizada  $\beta$ -Tubulina (1:1000, Sigma – Aldrich). A análise densitométrica das bandas foi realizada pelo software *Image J*.

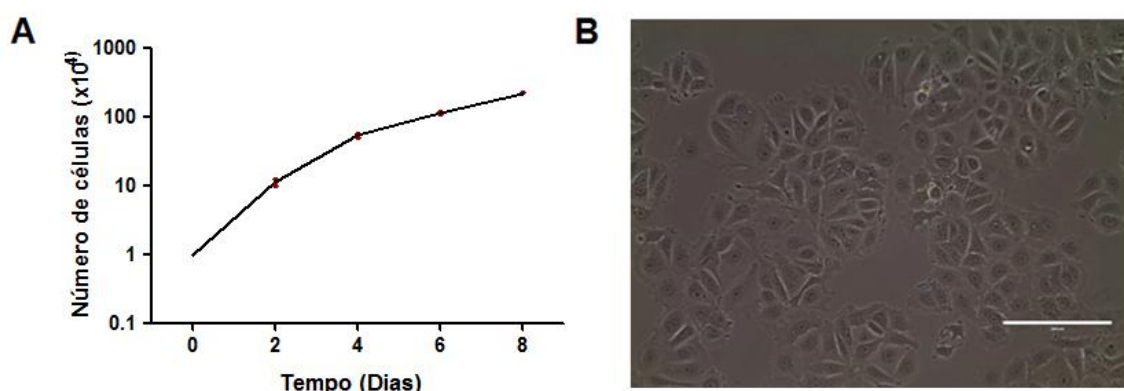
### **3.10 Análise estatística**

Para os ensaios de quantificação de DNA por citometria de fluxo e de apoptose, foi utilizado o teste *t de Student*, tomando como referência o grupo controle para análise das frequências de ploidia e de morte. Cada evento foi considerado como sendo a somatória de cada triplicata. O nível de significância considerado foi menor que 0,05%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Curva de crescimento da linhagem MCF-7

A curva de crescimento da linhagem MCF-7 (Figura 4A) foi importante na determinação da fase exponencial de crescimento que se inicia no 2º dia em cultura. No 6º dia é possível observar uma tendência ao platô. O tratamento ocorreu, portanto, entre o 2º e 4º dia, período de intensa atividade proliferativa. A Figura 4B mostra o aspecto morfológico da cultura no 4º dia em cultura.



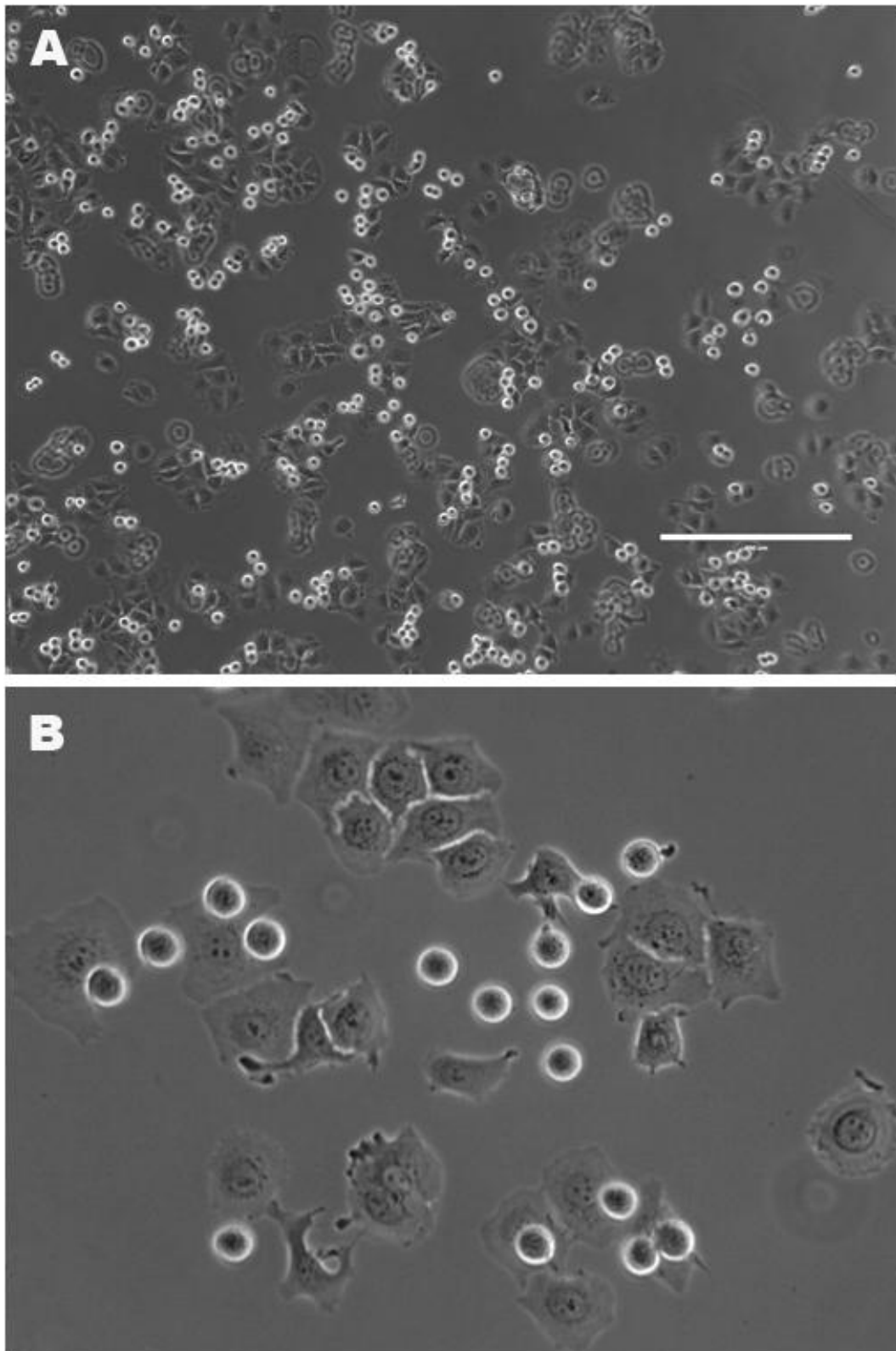
**Figura 4:** (A) Curva de crescimento da linhagem MCF-7. (B) Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase da cultura. Escala: 200  $\mu$ M.

### 4.2 Formação de fuso monopolar após tratamento com Monastrol

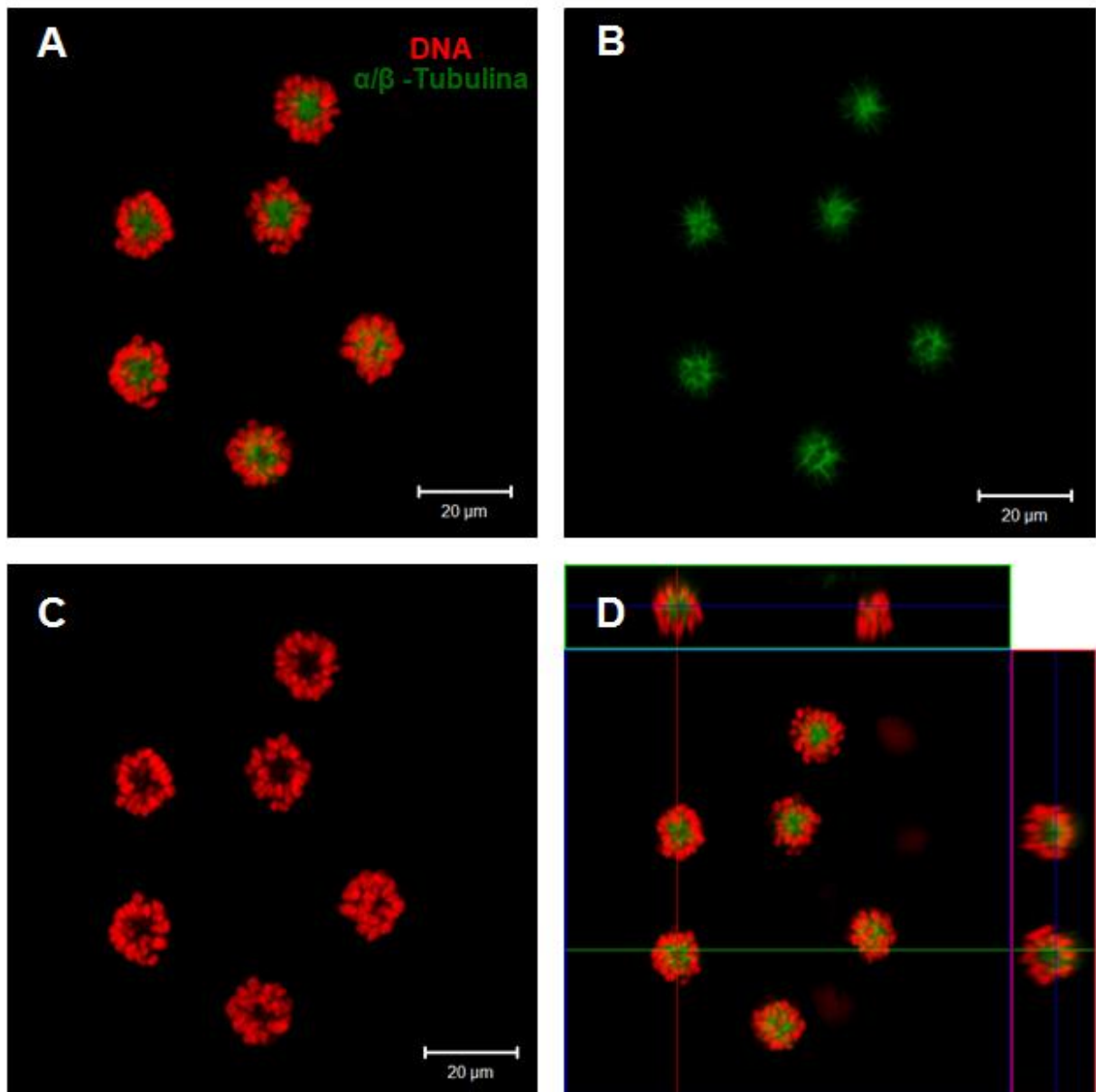
As análises realizadas por microscopia de contraste de fase e microscopia confocal de varredura a laser mostraram que o tratamento foi efetivo em induzir a formação do fuso monopolar bloqueando a divisão celular. Após o tratamento, foi possível identificar uma grande quantidade de células arredondadas e menos aderidas ao substrato (Figura 5A e B), as quais possivelmente correspondiam às células em processo de divisão celular. As análises de microscopia confocal de varredura a laser nos permitiram observar que os fusos mitóticos apresentavam-se fortemente marcados em um único ponto central, área que corresponderia a região dos centrossomos (Figura 6B), circundados por um anel de cromossomos (Figura 6C). Projeções ortogonais das imagens no eixo Z mostraram de fato que os

centrossomos estavam juntos formando um fuso monopolar circundados por cromossomos (Figura 6D). Os dados obtidos por imunofluorescência nos permitem afirmar que a inibição de Eg5 foi efetiva, uma vez que todas as células em processo de divisão celular apresentaram características de fuso monopolar.

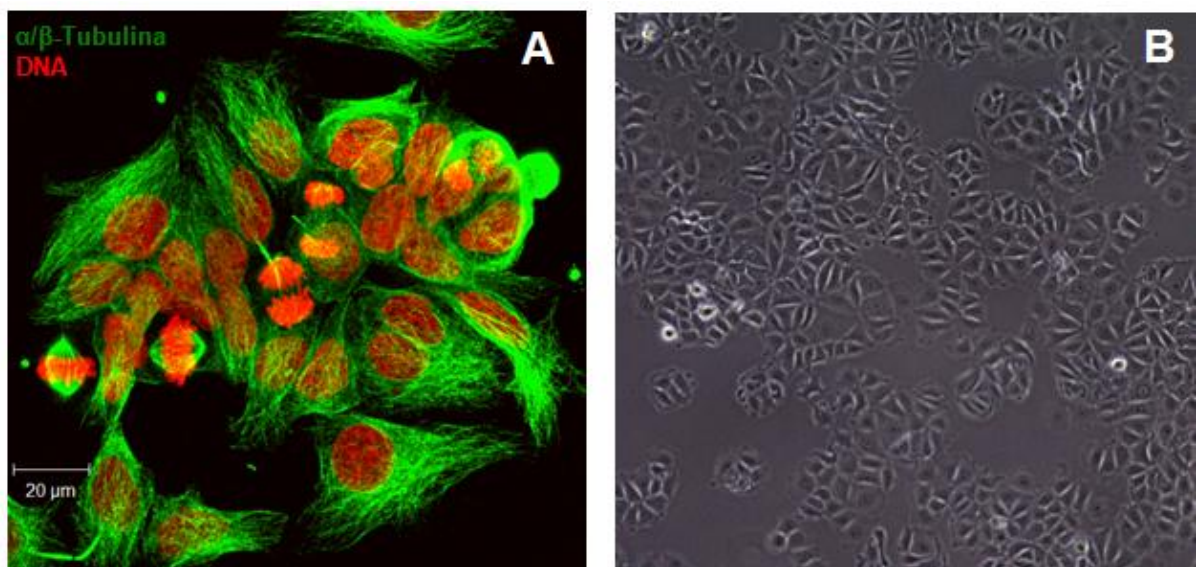
Considerando que o efeito do Monastrol é reversível, células MCF-7 foram acompanhadas por 4 horas após o término do tratamento. Após esse período de recuperação foi possível observar que as células voltaram a formar fuso bipolar (Figura 7A). Ao observar a cultura por microscopia de contraste de fase também foi possível observar drástica diminuição na frequência de células arredondadas (Figura 7B).



**Figura 5:** Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase da linhagem celular MCF-7 submetida ao tratamento com Monastrol. **(A)** Panorama geral da cultura (objetiva de 20X); escala: 200  $\mu$ M. **(B)** Maior detalhe do tratamento (objetiva de 40X).



**Figura 6:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser da linhagem celular MCF-7 submetida ao tratamento com Monastrol. Evidenciando microtúbulos em verde e núcleo e vermelho. (A) projeção de todos os canais. (B) fuso mitótico monopolar. (C) Cromossomos distribuídos em formatos de “rosetas”. (D) Projeção em ortogonal.



**Figura 7:** Células MCF-7 tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de Monastrol por 15 horas e recuperadas por 4 horas em meio fresco sem a presença de droga. **(A)** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser, onde é possível visualizar células em processo de divisão celular com organização de fusos bipolares. **(B)** Fotomicrografia em microscopia invertida de contraste de fase, mostrando a cultura após 4 horas de recuperação do tratamento com Monastrol



### 4.3 Alterações no conteúdo de DNA após tratamento com Monastrol

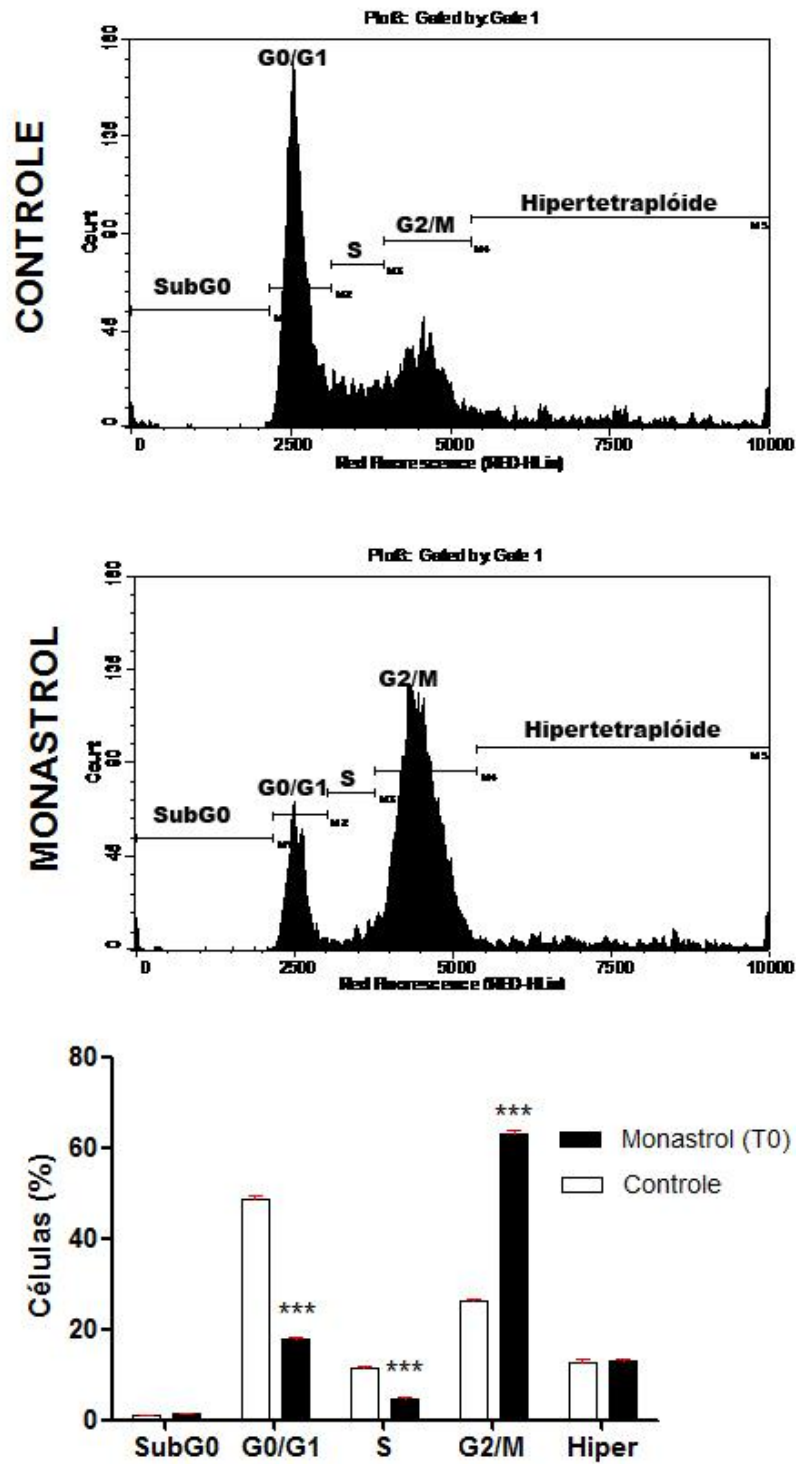
Como o tratamento com Monastrol induziu um bloqueio de células em mitose, analisamos também o conteúdo de DNA destas células. Os eventos foram analisados por citometria de fluxo e foram divididos em cinco classes, sendo elas: hipodiplóide (subG1), diplóide (G0/G1), hiperdiplóide (S), tetraplóide (G2/M) e hipertetraplóide (>5C) (Figura 8A, B e C).

A quantificação de DNA em células MCF-7 mostrou que o tratamento com Monastrol levou a um grande aumento na frequência da população de células tetraplóides, sendo a frequência destas células de 63,0%, enquanto, células controle apresentaram uma frequência de 26,3%. Indicando que houve bloqueio mitótico, provavelmente decorrente da ativação do ponto de checagem mitótico.

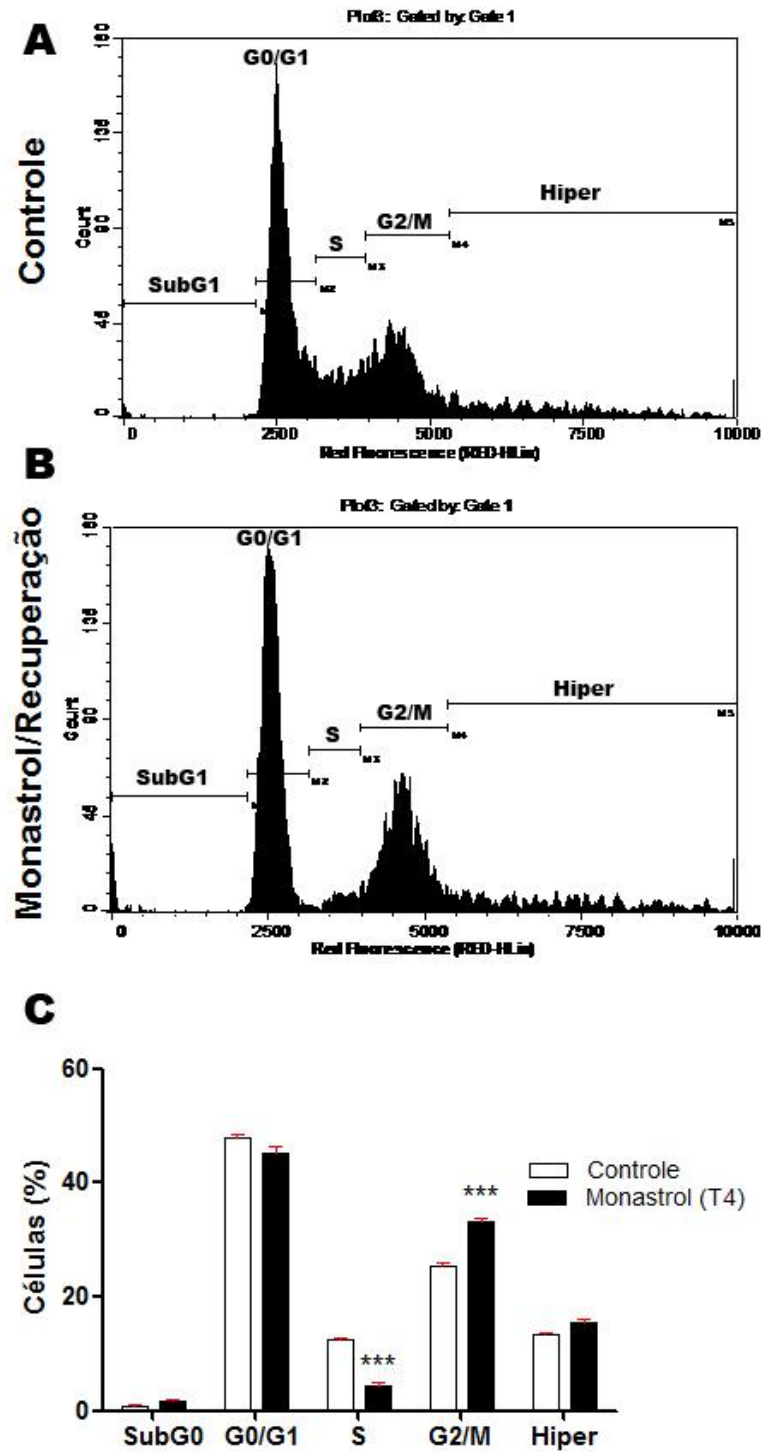
A população de células diplóides mostrou diminuição após o tratamento com Monastrol, a qual teve uma frequência de 17,9%, enquanto que nas células controle foi de 48,5%. Outra alteração evidente após o tratamento foi a frequência de células hiperdiplóides, que foram de 5,9%, diferentemente das células controle que apresentaram 11,6%. As frequências das populações hipodiplóides e hipertetraplóides não apresentaram diferenças quando comparadas ao grupo controle (Figura 8A, B e C). O grande aumento de células tetraplóides, após o tratamento com Monastrol deve ter sido devido à inibição de Eg5, que levou a um bloqueio mitótico, tal bloqueio foi devido às células não conseguirem formar a força de tração necessária ou cinetócoros desligados do fuso mitótico eventos que resultam da atividade do ponto de checagem mitótico.

O conteúdo de DNA de células MCF-7 tratadas com 100  $\mu$ M de Monastrol por 15 horas e recuperadas por 4 horas em meio fresco livre de droga também foi analisado (Figura 9A, B e C). A quantificação de DNA obtida mostrou que as células voltam a ter um perfil do ciclo celular semelhante às células controle (sem adição da droga), sendo que a frequência da população diplóide foi de 45,2% (Figura 9A, B e C). A frequência na população de células tetraplóides no grupo recuperado por 4 horas mostrou um pequeno aumento de 33,1% em relação ao controle que foi de 25,3%. Da mesma forma que as células tratadas com Monastrol sem recuperação a frequência na população de células hiperdiplóide no grupo recuperado mostrou uma frequência de 8% (Figura 9A, B e C). As populações de células hipodiplóide e hipertetraplóide não mostraram diferenças significativas (Figura 9A, B e C).





**Figura 8:** Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 tratadas com Monastrol por 15 horas. (A) Células controle sem adição de Monastrol; (B) Células tratadas com Monastrol numa concentração de 100  $\mu$ M por 15 horas; (C) Gráfico representando a distribuição dos eventos analisados do ciclo celular. \*\*\* p <0,001.



**Figura 9:** Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 recuperada por 4 horas, após tratamento com Monastrol. **(A)** Células controle sem adição de Monastrol; **(B)** Células tratadas com Monastrol numa concentração de 100  $\mu$ M por 15 horas e recuperadas em meio fresco por 4 horas; **(C)** Gráfico representando a distribuição dos eventos analisados do ciclo celular. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.4 Alterações morfológicas após tratamento com Blebistatina**

O próximo passo para estabelecer o modelo aneuplóide foi testar a inibição de miosina II, não muscular, a qual interage com a actina durante a formação do anel contrátil. Células MCF-7 foram tratadas com Blebistatina nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  por 4 horas. Os resultados obtidos por microscopia confocal a partir de preparações citológicas marcadas para  $\alpha/\beta$ -tubulina evidenciaram o padrão de distribuição dos microtúbulos em células interfásicas na cultura controle e tratada (Figuras 10A e B).

Na cultura controle, as células interfásicas apresentam-se justapostas, arranjo característico de células epiteliais. O padrão normal de distribuição dos microtúbulos pode ser evidenciado na Figura 10A. Na cultura tratada com Blebistatina, esse padrão normal de distribuição de microtúbulos foi alterado. As células interfásicas apresentam áreas intensamente marcadas para  $\alpha/\beta$ -tubulina sugerindo a coalescência de microtúbulos em regiões específicas do citoplasma. Prolongamentos citoplasmáticos semelhante aos encontrados em células dendríticas também podem ser observados nas células tratadas (Figura 10B). Os resultados obtidos são indicativos de que o esquema de tratamento com Blebistatina foi efetivo em inibir a miosina II.

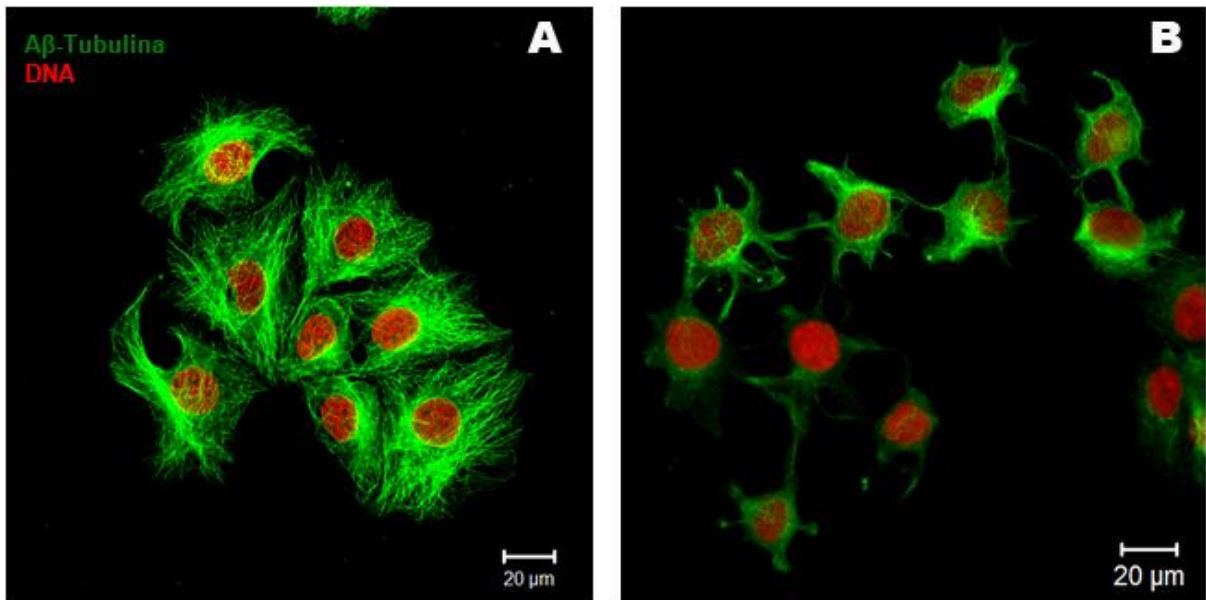
#### **4.5 Efeito do tratamento seqüencial de Monastrol e Blebistatina na morfologia celular**

Com as condições de tratamento de Monastrol e Blebistatina estabelecidas na linhagem MCF-7, o próximo passo foi tratar as células com 100  $\mu\text{M}$  de Monastrol por 15 horas e após este período o meio contendo Monastrol foi retirado e adicionado meio fresco contendo 25  $\mu\text{M}$  de Blebistatina por 4 horas. Os efeitos do tratamento seqüencial foram investigados em preparações citológicas de  $\alpha/\beta$ -tubulina.

As Figuras 11A e 11B mostram o padrão de distribuição dos microtúbulos em células interfásicas e em processo de divisão celular em culturas controle. Nas culturas tratadas sequencialmente com Monastrol e Blebistatina foi possível observar alterações morfológicas, tais como, longos prolongamentos citoplasmáticos (Figura 11D e F), intensa marcação de  $\alpha/\beta$ -tubulina em regiões específicas, as quais

correspondem a áreas de condensação de microtúbulos nas extremidades dos prolongamentos (Figura 11F – seta).

O tratamento seqüencial também determinou o aparecimento de células binucleadas (Figura 11C) e células mitóticas alteradas (Figura 11E e F – cabeça de seta). A contagem de células binucleadas na cultura controle apresentou uma frequência de 1,1%, enquanto, que nas células tratadas esse porcentual foi de 13%. A presença de células mitóticas anormais como o aumento de células binucleadas, indica que o tratamento levou a uma perturbação do fuso mitótico e falha na citocinese, o que acarretaria a formação de uma progênie aneuploide. Outro indicador de instabilidade cromossômica foi o aumento da frequência de micronúcleos nas células tratadas que foram de 8%, enquanto que no grupo controle a frequência destes micronúcleos eram de 3,7%.



**Figura 10:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser da linhagem celular MCF-7. (A) Distribuição da rede de microtúbulos em células interfásicas (sem adição da droga). (B) Distribuição dos microtúbulos, com morfologia semelhante à de células dendríticas, que é característico de células submetidas ao tratamento com Blebistatina.

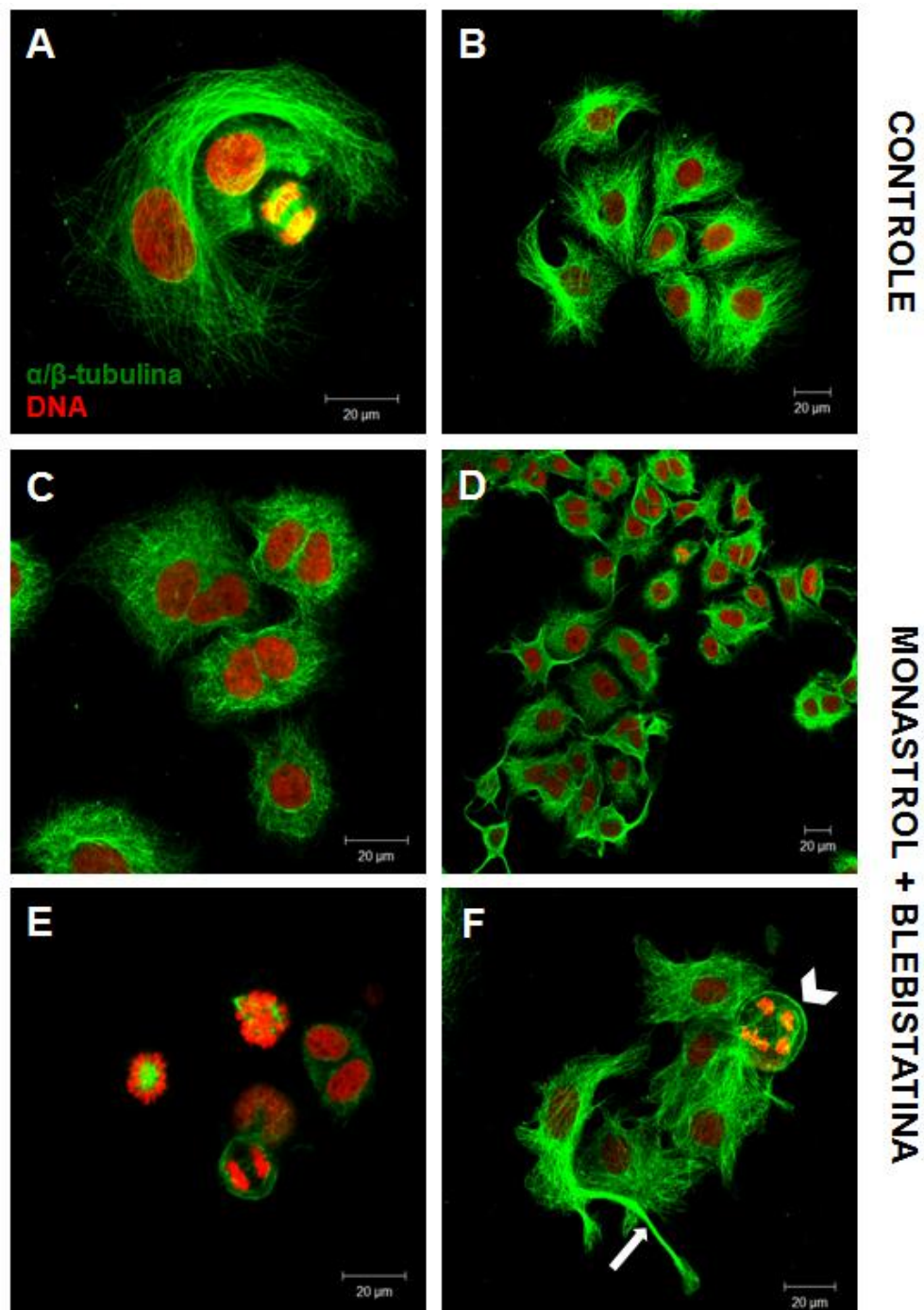
#### **4.6 Alterações morfológicas em células MCF-7 submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina, seguidas de 24 horas de recuperação em meio fresco**

Após termos observado que o tratamento sequencial (Monastrol e Blebistatina) levava ao surgimento de mitoses alteradas e aumento de células binucleadas (Figura 11), avaliamos como estas populações celulares se comportariam nos próximos ciclos sem a presença dos inibidores. Para tal, utilizamos células MCF-7, tratadas com 100  $\mu$ M de Monastrol por 15 horas, e então submetidas ao tratamento com 25  $\mu$ M de Blebistatina por 4 horas, após este período o meio de cultura foi substituído por meio fresco e mantido em cultura por 24 horas (T24). Para analisar as alterações morfológicas, foi realizado um ensaio de imunofluorescência para  $\alpha/\beta$ -tubulina e DNA. As imagens obtidas mostram que após 24 horas de recuperação a maioria das células mitóticas apresentou características anormais (Figura 12A, B e C), tais como, mitoses com fuso tripolar (Figura 12C), mitoses com fusos multipolares e cromossomos soltos (Figura 12B). Também foi observado aumento do número de células binucleadas em relação às células controle, de 15% para 30% no grupo T24 (Figuras 13A e B). Tais dados reforçaram a idéia de que o tratamento sequencial pode ter determinado uma condição de instabilidade cromossômica. Como no grupo T0, a frequência de micronúcleos aumentou após a recuperação no grupo T24 foi de 7,2%, em contraste, no grupo controle a frequência de micronúcleos foi de 3,8%.

#### **4.7 Ação do tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina no conteúdo de DNA em células MCF-7**

Uma vez que encontramos alterações na morfologia celular após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina (T0), o próximo objetivo foi investigar se o conteúdo de DNA também estava alterado nestas células, uma vez que interferimos na progressão do ciclo celular. Os histogramas obtidos por citometria de fluxo e os percentuais de cada evento (Figura 14A, B e C) nos mostram que as células submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina (T0), levam a um aumento na população de células tetraplóides, o qual foi em torno de 51,8%, enquanto, que no grupo controle o percentual de células nessa fase foi de 24,1%, tal

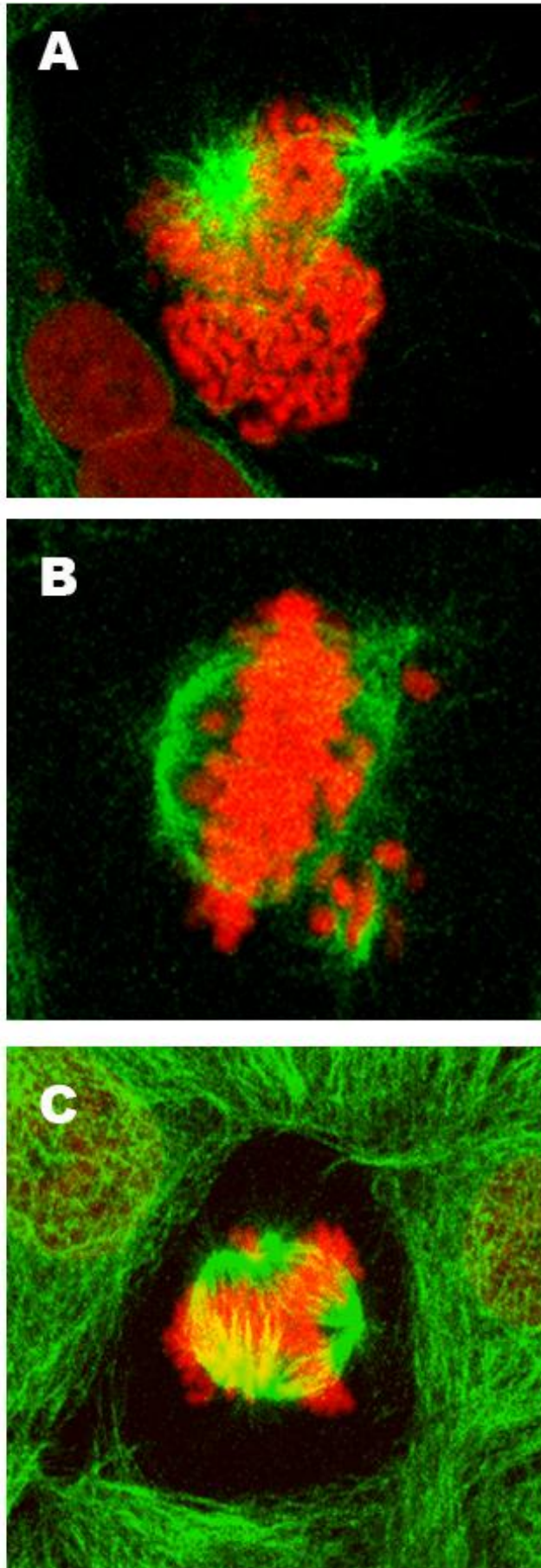
alteração pode ser decorrente do aumento de células binucleadas. As populações de células diplóides também mostraram alterações após o tratamento, onde o percentual destas células foi de 27,5% em relação ao controle que foi de 47,1%. A população de células na fase hiperdiplóide no grupo T0 foi de 12,3%, enquanto que no grupo controle foi de 2,7%, já as populações de células hipodiplóide e hipertetraplóides não apresentaram alterações significativas.



**Figura 11:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina (T0). **(A)** Células controle (sem adição das drogas) exibindo distribuição da rede de microtúbulos normais e células em processo de divisão celular exibindo fusos mitóticos normais. **(B)** Células controle (sem adição das drogas) exibindo distribuição da rede microtúbulos normais, característicos de células interfásicas. **(C e D)** Células binucleadas. **(E)** Mitoses alteradas. **(F)** seta branca: condensação de microtúbulos em regiões específicas do citoplasma; cabeça de seta branca: anáfase tardia anormal.

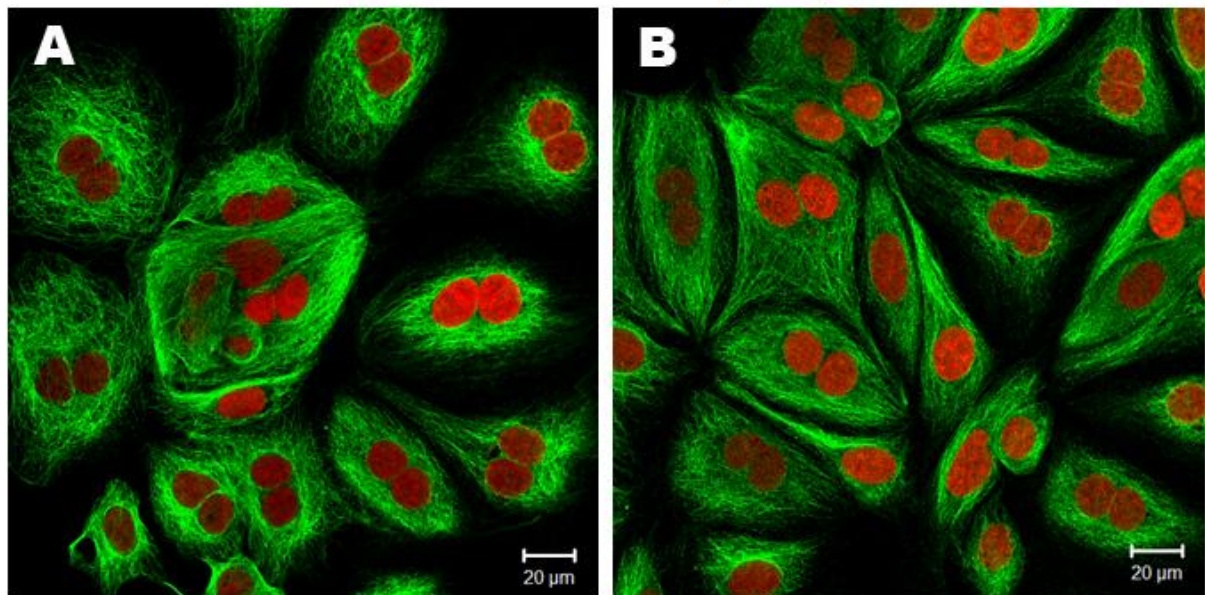


## Monastrol e Blebistatina / Recuperação 24 horas

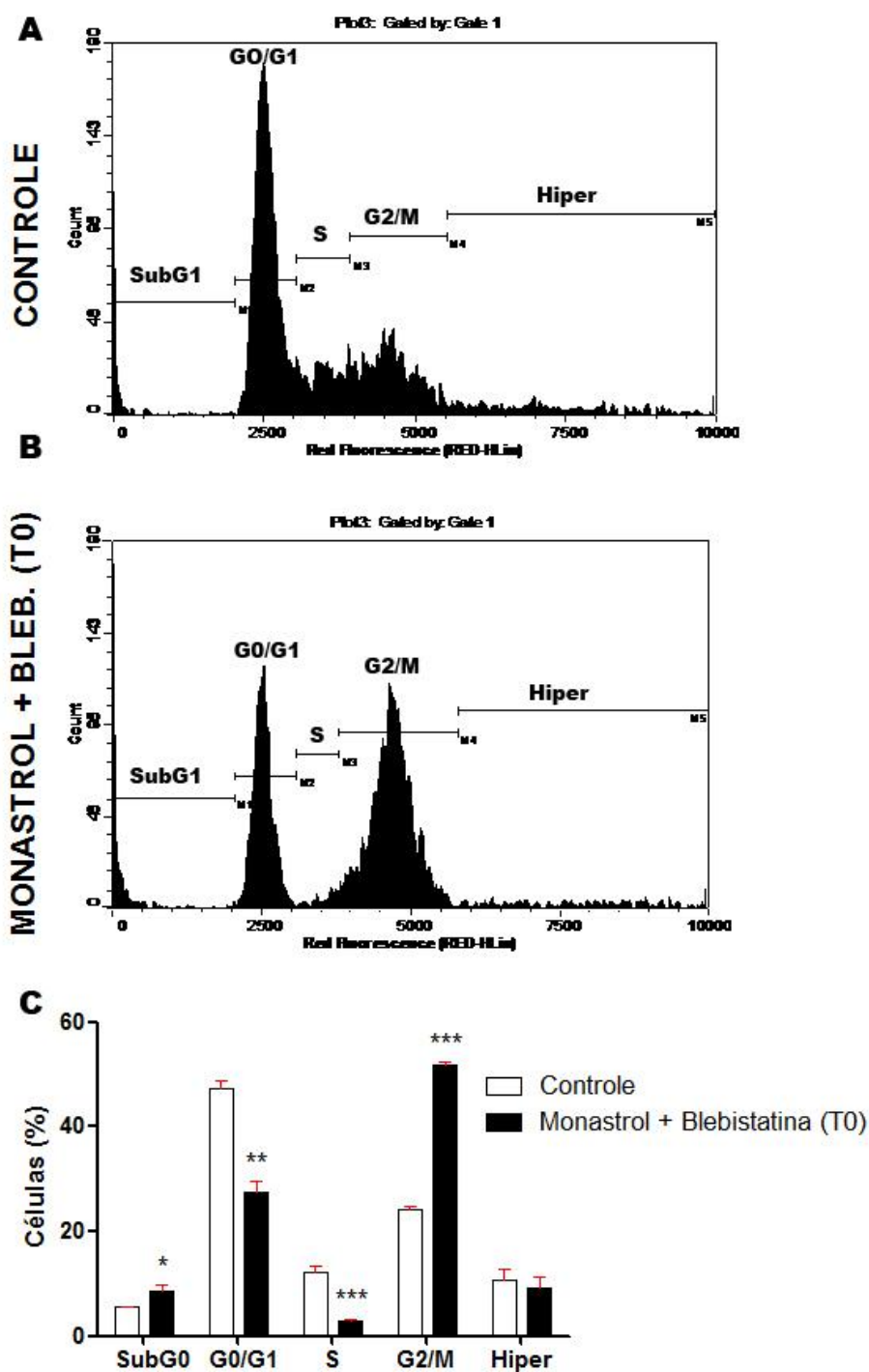


**Figura 12:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 recuperadas por 24 horas em meio fresco após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina. **verde:**  $\alpha/\beta$ -tubulina e **vermelho:** DNA (A) Célula mitótica anormal. (B) Célula mitótica com fuso multipolar e cromossomos soltos. (C) Célula mitótica com fuso tripolar. Escala: 20  $\mu\text{m}$

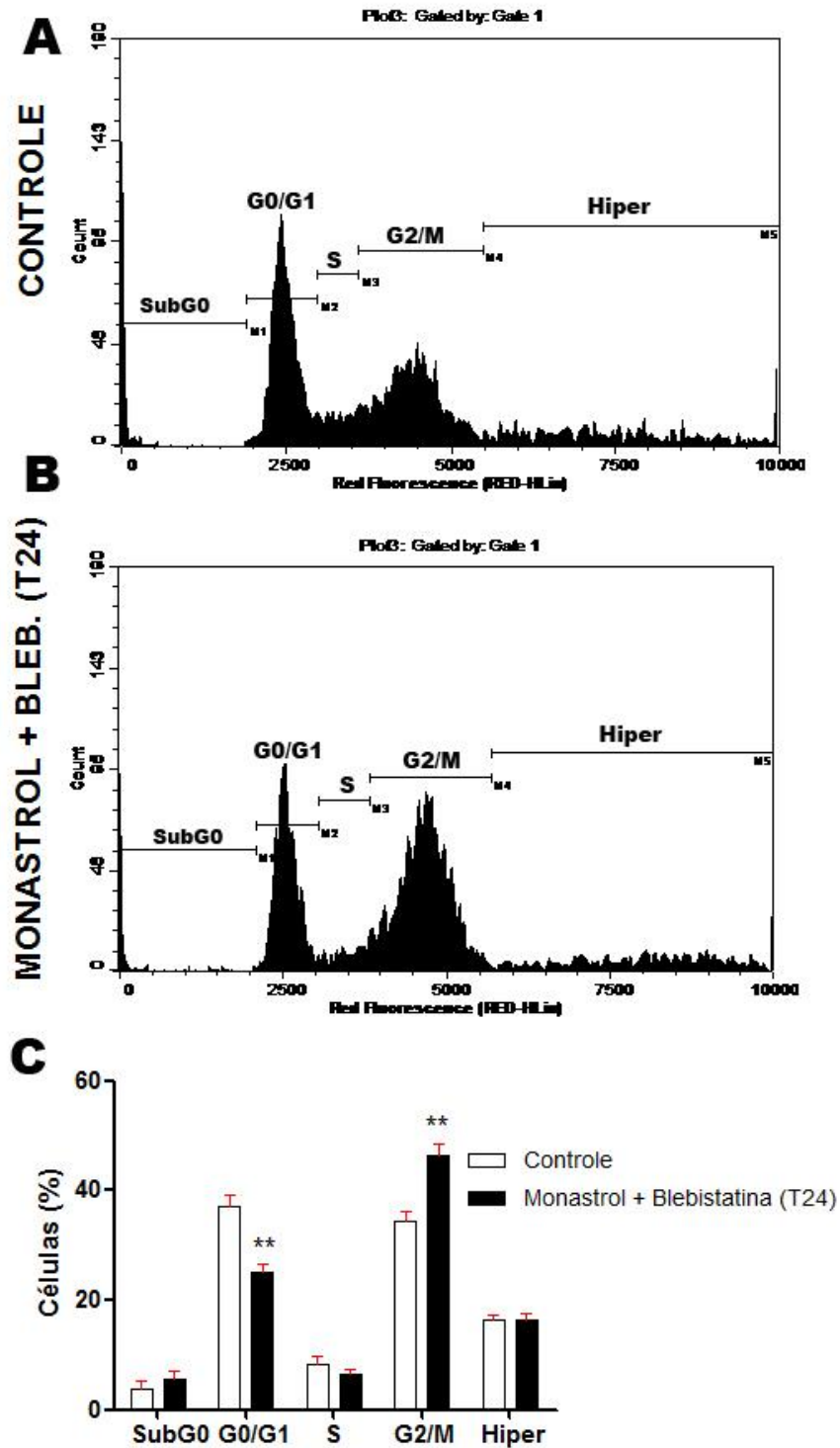
### Monastrol e Blebistatina / Recuperação 24 horas



**Figura 13:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 recuperadas por 24 horas após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina. (A e B) Células binucleadas, após o tratamento com Monastrol e Blebistatina e recuperadas por 24 horas em meio fresco livre de droga.



**Figura 14:** Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina. **(A)** Células controle sem adição de drogas; **(B)** Células tratadas com Monastrol numa concentração de 100  $\mu$ M por 15 horas e 25  $\mu$ M de Blebistatina por 4 horas; **(C)** Gráfico representando a distribuição dos eventos do ciclo celular analisados por citometria de fluxo. \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001.



**Figura 15:** Quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7 recuperadas por 24 horas, após tratamento com Monastrol e Blebistatina. **(A)** Células controle (sem adição de drogas). **(B)** Células tratadas com Monastrol numa concentração de 100  $\mu$ M por 15 horas e 25  $\mu$ M de Blebistatina por 4 horas e recuperadas por 24 horas em meio fresco livre de droga. **(C)** Gráfico representando a distribuição dos eventos do ciclo celular analisados por citometria de fluxo. \*\*  $p < 0,01$ .

#### **4.8 Quantificação de DNA em células MCF-7 submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina, seguidas de 24 horas de recuperação em meio fresco**

A quantificação de DNA obtida por citometria de fluxo de células MCF-7, submetidas ao tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina seguido de recuperação por 24 horas em meio fresco (T24), mostraram que a cultura exibe diminuição na frequência da população de células diplóides a qual foi de 37,0%, já o grupo T24 apresentou uma frequência de 25,1%, esta diminuição foi decorrente do tratamento sequencial ter induzido um aumento nas populações de células tetraplóides que mostraram uma frequência de 47,7%, enquanto que no grupo controle o percentual destas células foi de 34,4%. Diferentemente do grupo T0, a população de células hiperdiplóides do grupo T24 mostrou um comportamento semelhante ao grupo controle o qual foi de 8% e o T24 de 6%, sugerindo que as células do grupo T24 voltaram a entrar no ciclo celular. Como em T0, a recuperação por 24 horas não mostrou alterações nas populações de células hiperdiplóides e hipertetraplóides.

#### **4.9 O tratamento de Monastrol e Blebistatina não induz apoptose em células MCF-7**

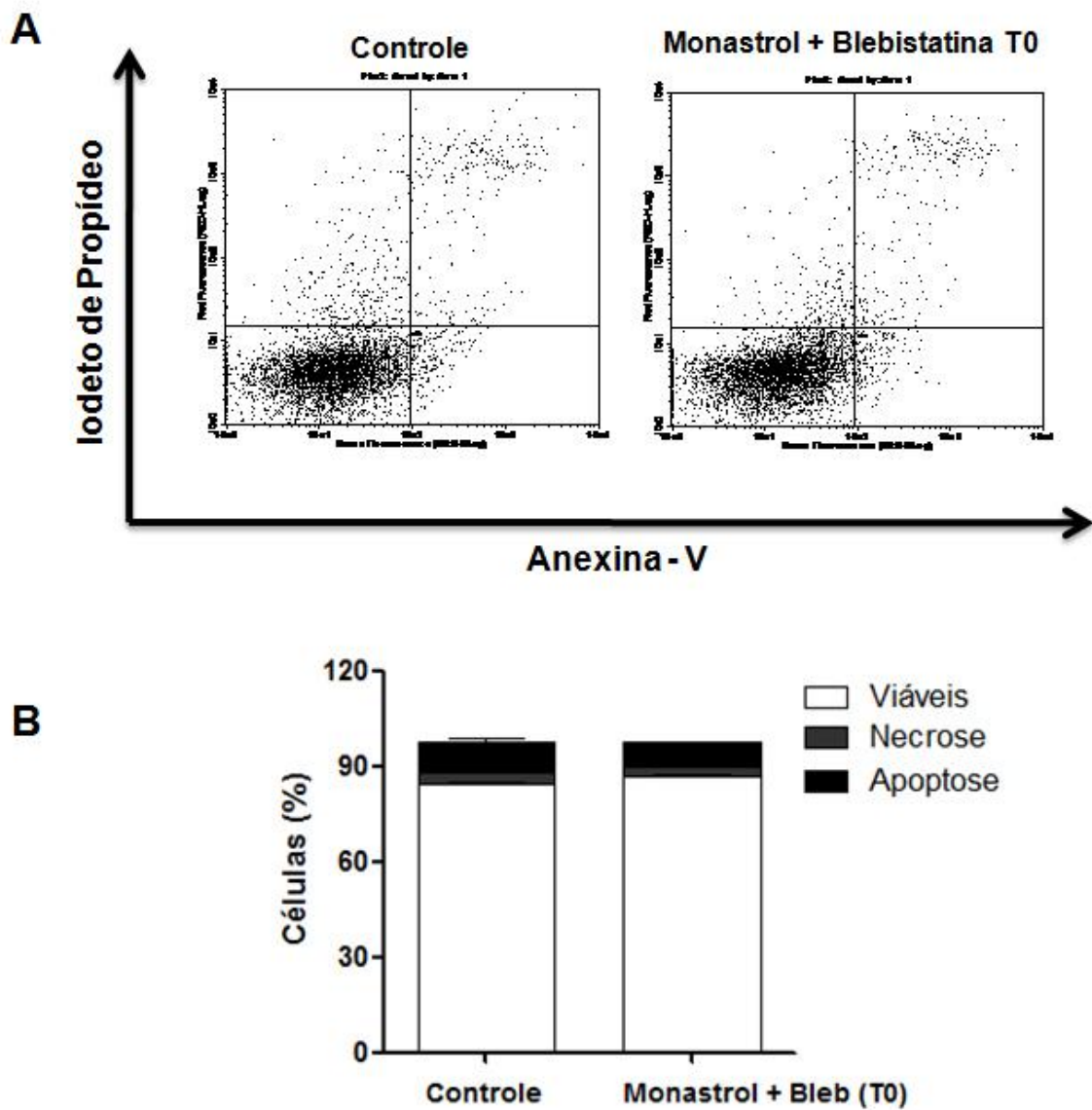
Com base nos resultados obtidos, de que o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina induz alterações no fuso mitótico, no conteúdo de DNA e no aumento de micronúcleo, investigamos se o tratamento induzia apoptose em células MCF-7. Para realizar o ensaio, utilizamos dupla marcação nas células com anexina-V (FITC) e iodeto de propídeo. Os dados obtidos por citometria de fluxo de células apoptóticas (marcação positiva para anexina-V) mostraram que o tratamento com Monastrol e Blebistatina T0 (Figura 16) não apresentaram diferenças significativas em relação às células controle, sendo os valores obtidos de 8,0% para o grupo que recebeu tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina 9,7% para o grupo controle (DMSO – solução veículo) (Figura 16). Os resultados mostram que o tratamento não induz apoptose em células MCF-7, indicando que o tratamento não tem efeito citotóxico para as células.



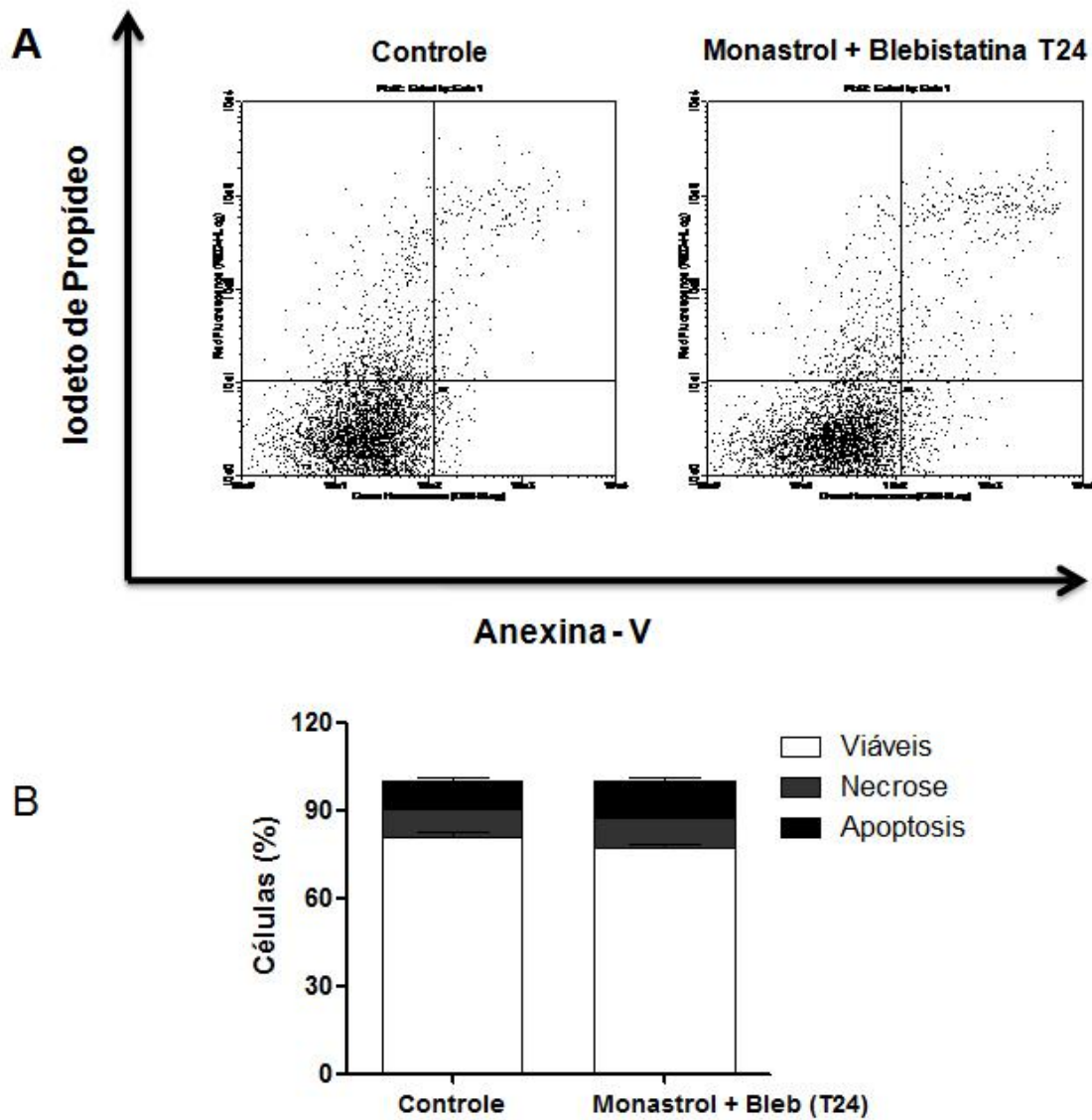
Como as alterações celulares mais drásticas ocorrem no período de 24 horas de recuperação, analisamos a porcentagem de células viáveis. Os dados obtidos mostram que mesmo após 24 horas as células permaneceram viáveis, pois não observamos diferenças significativas na porcentagem de células apoptóticas entre os grupos. O percentual de células apoptóticas foi de 9,4% para o grupo controle (DMSO – solução veículo) e 12,6% para o grupo tratado e recuperado por 24 horas.

#### **4.10 Padrão de localização de Aurora A após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina**

Com base nos resultados obtidos que o tratamento leva a um aumento da instabilidade cromossômica, o próximo passo foi analisar uma das proteínas envolvidas na manutenção do processo de divisão celular. As imagens obtidas por imunofluorescência mostram que a proteína Aurora A está localizada na região correspondente ao centrossomos, dispostas em região oposta da célula em mitose. Essa localização é característica da formação do fuso bipolar (Figura 18). Após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina (T0), é possível observar que a localização da proteína Aurora A está em dois pontos específicos da célula, os quais correspondem à região dos centrossomos, disposição característica de fuso bipolar. Outra observação é a localização de Aurora A em um único ponto central da célula mitótica, a qual pode ser devido ao tratamento com Monastrol levar a formação de um fuso monopolar (Figura 19). No tempo de recuperação de 24 horas o perfil de localização de Aurora A é desorganizado, imagens de imunofluorescência mostram pontos de localização ectópica da proteína (Figura 20), alterações no padrão de distribuição de Aurora A corresponde com as aberrações mitóticas que são analisadas no tempo de 24 horas após o tratamento.



**Figura 16:** O tratamento com Monastrol e Blebistatina (T0) não possuem efeito sobre a apoptose em células MCF-7. **(A)** Painéis de citometria de fluxo de células marcadas duplamente com anexina V-FITC (fluorescência verde) e iodeto de propídeo (fluorescência vermelha). **(B)** Gráfico representado a porcentagem de cada evento analisado.



**Figura 17:** O período de 24 horas de recuperação, após o tratamento com Monastrol e Blebistatina, não mostrou efeito sobre a apoptose em células MCF-7. Painéis de citometria de fluxo de células marcadas duplamente com anexina V-FITC (fluorescência verde) e iodeto de propídeo (fluorescência vermelha). **(B)** Gráfico representado a porcentagem de cada evento analisado.

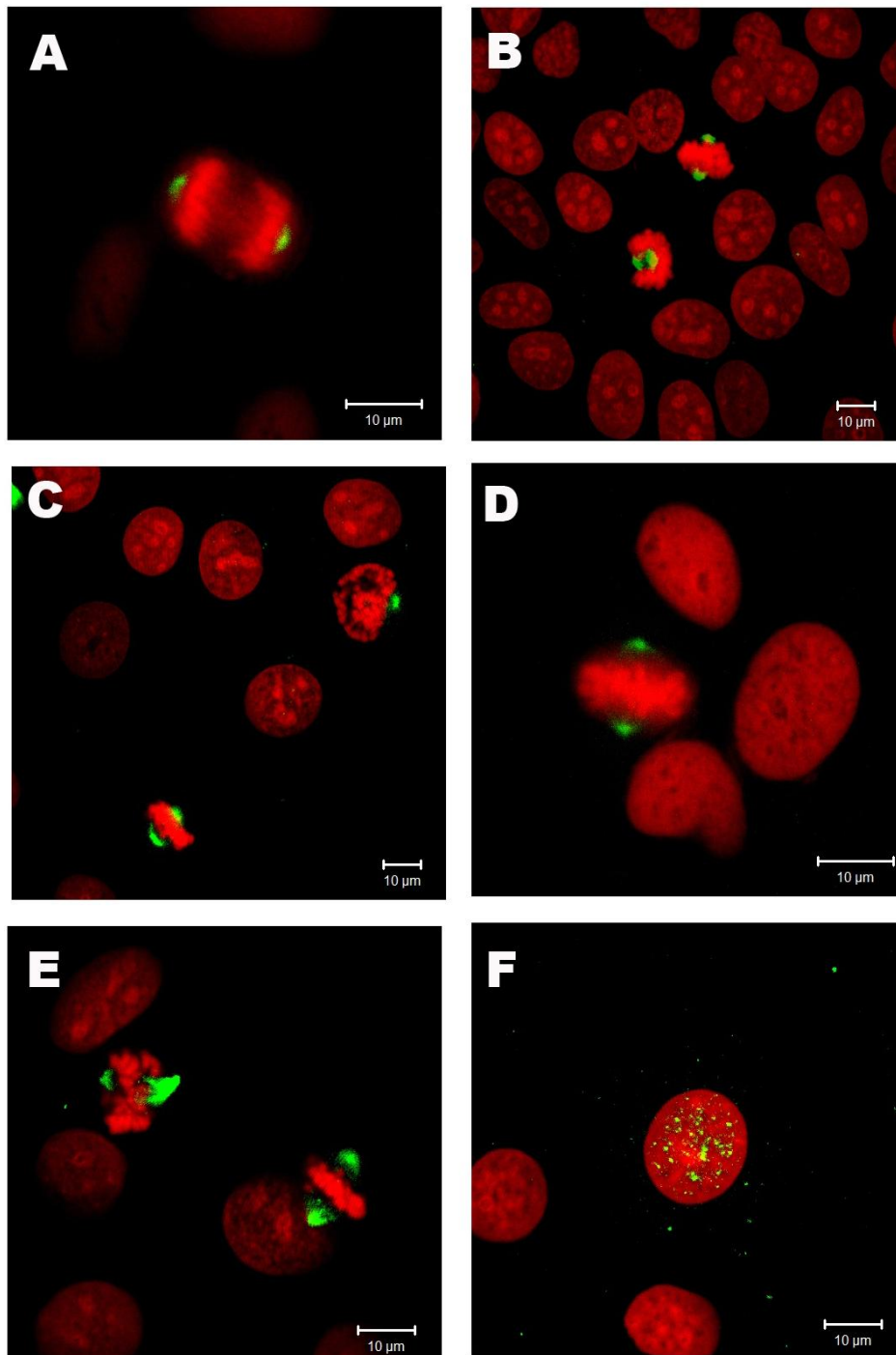


#### **4.11 Expressão de proteínas envolvidas no processo de divisão celular em células MCF-7**

Como inferimos que o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina leva ao desenvolvimento de progênies aneuploides e conseqüentemente a instabilidade cromossômica, analisamos a expressão de proteínas envolvidas na manutenção do processo de divisão celular, tais como, Aurora A total e fosforilada e Cdc20 total e fosforilada (Figura 21A). Em T0 não observamos nenhuma diferença na expressão das proteínas avaliadas, porém após 24 horas de recuperação observamos um aumento da atividade de Cdc20 fosforilada. Este aumento na expressão de Cdc20 fosforilada indica que o tratamento além de induzir alterações na morfologia e no conteúdo de DNA, induz alterações a nível molecular, já que o aumento da atividade dessa proteína contribui diretamente para a instabilidade cromossômica.

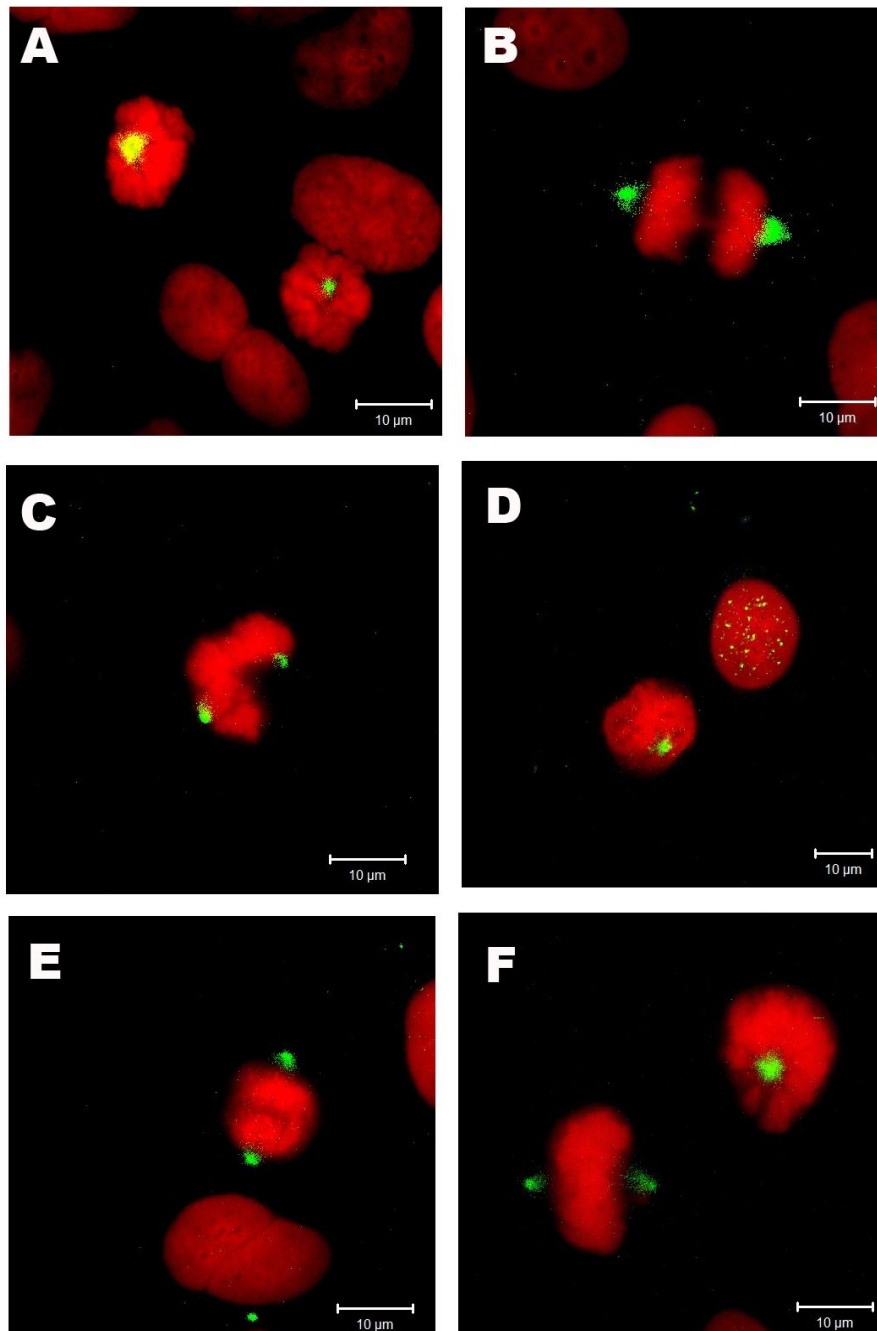
Embora o grupo T24 tenha apresentado uma expressão proteica de Aurora A fosforilada semelhante ao grupo controle quando analisada de forma isolada. Quando normalizamos pela expressão de Aurora A total, foi possível observar aumento da Aurora A fosforilada (Figura 21A). Este aumento na fosforilação de Aurora A corrobora com nossos dados de imunofluorescência, que mostraram a presença de fusos mitóticos anormais, as quais podem ser decorrentes desta ativação de Aurora A.

## Aurora A (Controle)



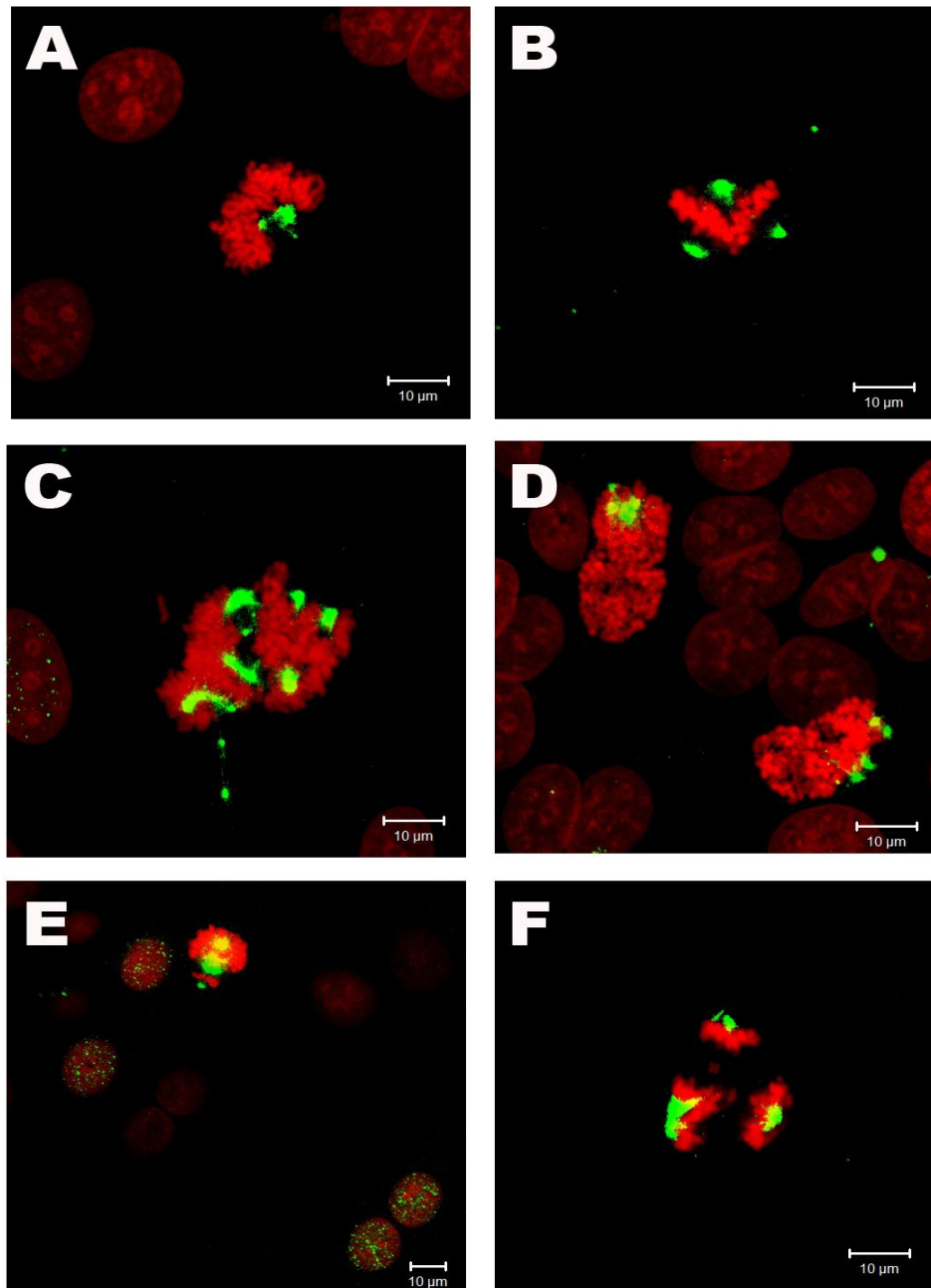
**Figura 18:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 controle evidenciando o padrão de distribuição de Aurora A. **verde:** Aurora – A e **vermelho:** DNA. **(A)** Anáfase. **(B)** Metáfase. **(C)** Uma célula em metáfase e a direita em prófase. **(D)** Metáfase. **(E)** Duas metáfases. **(F)** Célula interfásica (G2).

## Aurora A (T0)

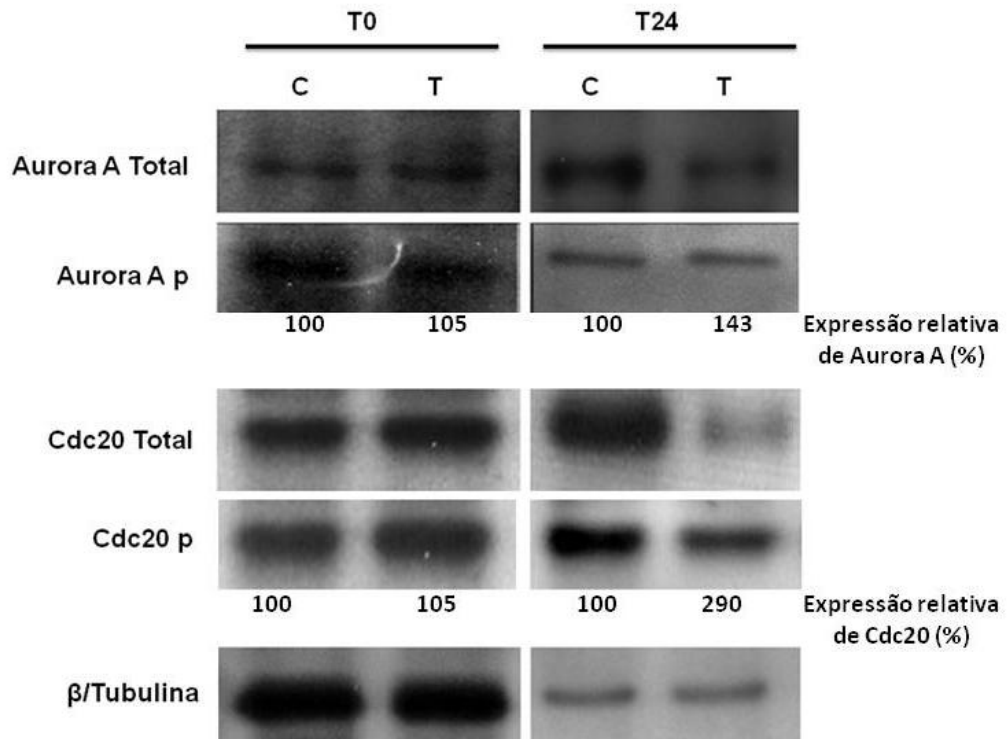


**Figura 19:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebbistatina (T0) evidenciando o padrão de distribuição de Aurora A. **verde:** Aurora – A e **vermelho:** DNA. **(A)** Metáfase. **(B)** Anáfase com cromossomos no plano de clivagem. **(C)** Metáfase. **(D)** Metáfase com característica de fuso monopolar e uma células interfásica (G2) à direita. **(E)** Anáfase. **(F)** Metáfase normal e a direita uma metáfase com característica de fuso monopolar.

## Aurora A (T24)



**Figura 20:** Fotomicrografia em microscopia confocal de varredura a laser de células MCF-7 tratadas com Monastrol e Blebistatina e recuperadas por 24 horas (T24) evidenciando o padrão de distribuição de Aurora A. **verde:** Aurora – A e **vermelho:** DNA. **(A)** Metáfase anormal. **(B)** Metáfase anormal. **(C)** Metáfase anormal. **(D)** Duas células em prófase. **(E)** Metáfase anormal **(F)** Anáfases anormais com cromossomos soltos.



**Figura 21:** Bandas obtidas por *Western Blotting* para análise da expressão proteica de Aurora A total e fosforilada, Cdc20 total e fosforilada e  $\beta$ -Tubulina em células MCF-7. As proteínas fosforiladas foram normalizadas pela proteína total. Dados apresentados com a expressão relativa.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como finalidade desenvolver um modelo para investigar os processos que contribuem para a instabilidade cromossômica em células tumorais, uma vez que a maioria dos tumores sólidos apresenta tal característica. O estado de aneuploidia é uma condição irreversível que é consequência da má segregação cromossômica durante o processo de divisão celular. Embora algumas células tumorais aneuplóides apresentem características geneticamente estáveis por segregar seu conteúdo anormal de cromossomos de maneira equilibrada (STORCHOVA e PELLMAN, 2004), a maioria dos tumores aneuplóides são geneticamente instáveis, fato que colabora para que estas células aneuplóides, segreguem os cromossomos de maneira inadequada nas sucessivas gerações celulares (LENGAUER et al., 1997). A alta taxa de segregação incorreta pode favorecer uma condição de instabilidade cromossômica, e tal condição pode gerar mudanças no padrão de expressão de alguns genes, os quais podem oferecer vantagem de crescimento e sobrevivência a estas células, causando complicações para estratégias quimioterápicas (GAO et al., 2007).

As bases moleculares da instabilidade cromossômica ainda não estão totalmente elucidadas, porém o que se sabe é que a instabilidade cromossômica pode ser proveniente do mau funcionamento do ponto de checagem mitótico (BABU et al., 2003; RAJAGOPALAN e LENGAUER, 2004a). De fato, defeitos no ponto de checagem mitótico são encontrados em diversos tipos de cânceres humanos, incluindo, pulmão, colón retal e hepatocarcinoma e estes efeitos estão associados à instabilidade cromossômica e aneuploidia (LIU et al., 2009; MASUDA e TAKAHASHI, 2002; SHICHIRI; YOSHINAGA e HISATOMI, 2002;).

O tratamento seqüencial com Monastrol e Blebistatina teve por objetivo interferir na progressão do ciclo celular (segregação cromossômica e citocinese) para analisar possíveis alterações de ploidia em células tumorais de mama humana. Mayer et al. (1999) caracterizaram os efeitos do Monastrol em células epiteliais de rim e observaram que essa pequena molécula inibe a proteína motora Eg5 prevenindo a separação dos centrossomos, fato que determina a formação do fuso monopolar (BLANGY et al., 1995). Nosso trabalho mostrou que o tratamento com 100µM de Monastrol por 15 horas levou a um grande aumento de células em G2/M com concomitante diminuição de G0/G1 e S. Este aumento de células em G2/M

pode estar relacionado com a ativação do ponto de checagem mitótico, o qual pode ocorrer em resposta à formação de um fuso monopolar (KAPOOR et al., 2000; RIEDER et al., 1994). Esta morfologia de fuso monopolar favorece que alguns cromossomos fiquem desligados dos microtúbulos, dessa forma sinalizando para o ponto de checagem a existência de cromossomos desligados do fuso mitótico. Este ponto de checagem responde bloqueando a progressão para anáfase até que o problema seja resolvido, caso este bloqueio persista, as células podem sair de mitose com o conteúdo de DNA anormal gerando progênies aneuplóides.

Considerando que a regressão de citocinese está associada à propagação do cariótipo anormal e, portanto a aneuploidia, primeiramente nós realizamos tratamento com Monastrol para induzir erros de segregação e bloqueio mitótico, e em seguida o meio contendo Monastrol foi retirado, para que as células pudessem voltar a dividir em meio agora contendo Blebistatina para impedir a finalização do processo de divisão, gerando por fim células com o conteúdo anormal de DNA. Análises obtidas por citometria de fluxo mostram-se que o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina (T0) induziu alterações no perfil do ciclo celular, levando a um grande aumento na frequência de células em G2/M, com concomitantemente diminuição das fases G0/G1. Este bloqueio na fase G2/M foi relacionado com o aumento de células binucleadas, uma vez que a fase G2/M do ciclo corresponde a células com conteúdo tetraplóide. Fato que também foi observado por imunofluorescência, evidenciando um grande aumento de células binucleadas e não de células mitóticas.

O mesmo resultado foi encontrado no ciclo celular de células MCF-7 submetidas ao tratamento com Monastrol e Blebistatina, seguido de 24 horas de recuperação (T24). Os histogramas obtidos mostram que células recuperadas por 24 horas após o tratamento sequencial continuam exibindo uma grande população de células em estado tetraplóide e uma diminuição de células diplóides. Outras populações celulares como hipodiplóide e hipertetraplóide, não apresentaram diferenças significativas.

A exposição celular a drogas que interferem na dinâmica dos microtúbulos durante a mitose, como, *taxanos* ou alcalóides da *vinca*, podem causar atividade do ponto de checagem mitótico e conseqüentemente parada da mitose, fato que ocasiona atividade antiproliferativa (JORDAN; THROWER; WILSON, 1991; KELLING et al., 2003). Este bloqueio da divisão celular obrigatoriamente previne a proliferação

celular, mas não necessariamente induz morte, e a relação entre a parada mitótica e morte celular ainda não está totalmente elucidada (BLAGOSKLONNY, 2007). No entanto esta contínua exposição a drogas que interferem na atividade do fuso mitótico pode tanto levar as células para apoptose durante a mitose, como podem levar a uma prematura separação das cromátides, permitindo assim a finalização da mitose com anormalidades cromossômicas. Este processo é referido pela literatura como uma “adaptação” ou “escape” do ponto de checagem. Este “escape” da mitose pode favorecer que células saiam da mitose e possam entrar em G0/G1 com características tetraplóides, e estas células por sua vez podem morrer em algum ponto de checagem em G0/G1 ou podem iniciar um novo ciclo celular. Este processo é pouco estudado, e o que se sabe atualmente, é que esta prematura “adaptação” da sinalização do ponto de checagem pode contribuir fortemente para o desenvolvimento da instabilidade genética e aneuploidia, tendo um forte impacto sobre o tratamento do câncer, já que esta adaptação pode favorecer resistência a quimioterápicos (RIEDER e MAIATO, 2004; GASCOIGNE e TAYLOR, 2008; WEAVER e CLEVELAND, 2005;).

Normalmente os fosfolipídios são distribuídos de maneira assimétrica na membrana plasmática, sendo a fosfatidilserina localizada na face interna da membrana plasmática em células saudáveis e essa assimetria de lipídios é perturbada poucas horas após o estímulo apoptótico em diversos tipos celulares (BALASUBRAMANIAN e SHROIT, 2003; MARTIN et al., 1995). A proteína anexina V é um ligante de fosfatidilserina e tem sido largamente utilizada para detecção de morte celular (TAIT, 2008). Pela análise do ensaio de anexina V por citometria de fluxo pudemos observar que poucas células mostraram exposição de fosfatidilserina em todos os grupos analisados, com isso podemos inferir que o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina não possui efeito na indução de morte celular em células MCF-7 em nenhum dos tempos analisados. Estes dados sugerem que o esquema de tratamento do presente estudo pode levar a um “escape” da mitose levando a um estado tetraplóide e conseqüentemente de instabilidade cromossômica, fato que corrobora com a literatura.

A frequência de micronúcleo foi determinada após o tratamento sequencial e esta análise representou um parâmetro importante para avaliar se o tratamento contribuiu para gerar instabilidade genômica em células MCF-7. A determinação da frequência na formação de micronúcleo é extensivamente utilizada como



biomarcador de danos cromossômico e instabilidade genômica (FENECH et al., 2003). Os micronúcleos são constituídos por fragmentos cromossômicos ou até mesmo cromossomos inteiros que não se conectaram ao fuso mitótico durante o processo de divisão celular (FENECH et al., 2002). Em geral fragmentos cromossômicos gerados por quebras cromossômicas podem ser observados como micronúcleos após o término da divisão. O tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina em células MCF-7 induziu um aumento na frequência de micronúcleo. Esse fato pode ter sido decorrente de falhas na organização do fuso mitótico bem como de erros de segregação cromossômica (GISSELSSON, 2008). As condições descritas anteriormente, em geral, estão relacionadas ao desenvolvimento e progressão do câncer (CERQUEIRA et al., 1998; FENECH et al., 2002). Assim sendo, o esquema de tratamento utilizado no presente trabalho foi efetivo em determinar uma condição de instabilidade genômica.

A presença de anormalidades centrossômicas tem sido proposta como um dos mecanismos no desenvolvimento e/ou manutenção do processo de aneuploidia em cânceres humanos (NIGG, 2006). Estas anormalidades centrossômicas, podem ser aberrações estruturais, que ocorrem por desregulação de genes envolvidos levando a alterações na composição dos centrossomos ou até mesmo amplificação centrossômica. Este último evento também está relacionado com instabilidade genômica e perda do fenótipo diferenciado (LINGLE et al., 2001). Após o tratamento sequencial, foi possível identificar a presença de diversas figuras mitóticas com fusos anormais e com características de fuso tripolar. Tais eventos foram relacionados com o aumento do número de centrossomos, decorrentes de falhas no processo de citocinese, provocados pela ação da Blebistatina. Dados semelhantes aos nossos foram observados por Meraldi et al. (2002). Estes autores mostraram que falha no processo de divisão celular, com concomitante tetraploidização, constitui um importante mecanismo no surgimento de amplificação centrossômica, o qual pode contribuir para desenvolvimento de mitoses aberrantes, sendo a amplificação centrossômica uma causa secundária da regressão de citocinese.

Considerando que o aparecimento de mitoses aberrantes ocorreu após o tratamento com Blebistatina seria razoável pensar que essas mitoses anormais pudessem ser conseqüentes de amplificações centrossômicas. Assim, a distribuição de Aurora A foi investigada. A proteína Aurora A atua na separação e migração dos centrossomos durante o processo de divisão celular (CASTILLO et al., 2007).

Nossos dados de imunofluorescência mostram que após o tratamento sequencial (T0) não houve alteração no perfil de localização de Aurora A, porém após 24 horas de recuperação em meio fresco, período necessário para a retomada da divisão, foi possível observar padrão atípico de localização de Aurora A. Zhou et al. (1998) mostraram que a expressão exógena de Aurora A em células NIH 3T3 (fibroblastos embrionários de camundongo) foi um evento crítico para a determinação de perfil ectópico de Aurora A. Esta localização anormal contribuiu para o desenvolvimento de centrossomos extras (amplificação) e conseqüentemente para o aparecimento de mitoses aberrantes. Além disso, os autores sugerem que a super expressão de Aurora pode estar relacionada ao processo de transformação maligna. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que a distribuição anormal de Aurora A tenha sido conseqüente da incapacidade da célula em concluir a citocinese. Em T24 a localização anormal de Aurora A pode ter contribuído para o aparecimento das mitoses anormais. A Aurora A colocalizou-se com o centrossomo e pode estar envolvida com os eventos relacionados à amplificação centrossômica. Alguns estudos mostram que a super expressão de Aurora A está relacionado com a amplificação centrossômica e conseqüentemente com a o processo de transformação maligna (BABA et al., 2009; KATAYAMA; BRINKLEY; SEN, 2003). Assim sendo, a quantificação de Aurora A foi determinada após o tratamento seqüencial. Os dados obtidos por *immunoblotting* para Aurora A (total e fosforilada) mostraram que após o tratamento sequencial (T0) não houve diferença de expressão entre os grupos controle e tratado. Vale ressaltar que neste período nós também não observamos diferenças em relação à distribuição da proteína nas preparações citológicas de imunofluorescência. Porém, com 24 horas de recuperação pudemos observar um aumento na expressão de Aurora A fosforilada no grupo tratado quando comparado ao controle do mesmo período. Esse fato indica que a proteína estava ativada, evidenciando que as células com mitoses aberrante continuam o processo de divisão, mesmo com anormalidades no fuso mitótico, contribuindo dessa maneira para a formação de progênies com conteúdo anormal de DNA. Embora as células apresentem uma maior expressão da proteína Aurora A fosforilada, há uma diminuição da proteína total, indicando que possa haver um mecanismo compensatório do próprio ponto de checagem para diminuir a atividade de Aurora A, impedindo assim a propagação de um cariótipo anormal.

No início da mitose, é necessário que ocorra a ligação da proteína Cdc20 ao complexo APC, resultando na formação do complexo APC/Cdc20, o qual atua inibindo a progressão da anáfase até que todos os cinetócoros estejam corretamente ligados ao fuso mitótico, quando esta ligação acontece o complexo APC/Cdc20 é ativado, permitindo assim que ocorra a separação das cromátides irmãs através de uma cascata de sinalização do ponto de checagem mitótico (PETERS et al., 2006). Entretanto, existem fortes evidências de que falhas nos componentes do ponto de checagem mitótico podem promover aneuploidia e, conseqüentemente, a tumorigênese (WASSMANN e BENEZRA, 2001).

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina resultou num perfil de instabilidade genética, isto é, aumento de micronúcleos, alteração no padrão de distribuição do fuso mitótico e localização ectópica de Aurora A. Por conseguinte, investigamos o funcionamento do ponto de checagem mitótico, por meio da expressão proteica de Cdc20 por *immunoblotting*. Nossos dados mostram que após o tratamento sequencial (T0) não houve diferença na atividade da proteína Cdc20 entre o grupo tratado e controle. Entretanto, 24 horas de recuperação após o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina, levou a um aumento na atividade da proteína Cdc20 fosforilada, indicando a atividade do complexo APC, esta ativação do complexo permitiu a propagação de mitoses aberrantes (identificadas por preparações citológicas em T24), contribuindo dessa forma para o surgimento de diversas alterações celulares, tais como, alterações no fuso mitótico, aumento na frequência de micronúcleos e alteração na localização de proteínas importantes para a finalização da mitose.

Embora o conceito de aneuploidia tenha sido estabelecido a uma longa data, somente nas últimas décadas sua importância biológica foi descrita. No carcinoma ductal invasivo de mama o aumento da aneuploidia está associada com maior agressividade tumoral e resistência a quimioterápicos. Entretanto, ferramentas para o estudo dos mecanismos moleculares da aneuploidia e seus alvos terapêuticos na biologia do câncer ainda são escassas. Diante deste contexto nosso tratamento seqüencial de Monastrol e Blebistatina abre novas possibilidades para o estudo do processo de aneuploidização em cânceres humanos.

## 6 CONCLUSÕES

Nossos dados mostraram que o tratamento sequencial de Monastrol e Blebistatina determinou o surgimento de fusos mitóticos anormais, amplificação centrossômica, localização ectópica de Aurora A e aumento de micronúcleos, esta interferência em pontos críticos da mitose pode levar a um quadro de instabilidade genética e, conseqüentemente, pode estar envolvido na progressão tumoral. Nossos dados abrem novas possibilidades para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do ponto de checagem mitótico e resistência a quimioterápicos encontrados em células geneticamente instáveis.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ADAMS, R. R.; CARMENA, M.; EARNSHAW, W. C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. **Trends. Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 49-54, 2001.
- BABA, Y. et al. Aurora-A Expression Is Independently Associated with Chromosomal Instability in Colorectal Cancer. **Neoplasia**, v. 11, n. 5, p. 418-425, 2009.
- BABU, J. R. et al. Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. **J. Cell Biol.**, v. 160, n. 3, p. 341-353, 2003.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. Are all cancer genes equal? **Nature**, v. 411, n. 6841, p. 1001-1002, 2001.
- BHARADWAJ, R.; YU, H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 11, p. 2016-2027, 2004.
- BISSELL, M. J. et al. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. **Differentiation**, v. 70, n. 9-10, p. 537-546, 2002.
- BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, D. M. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Res.**, v. 6, n. 6, p. 229-239, 2004.
- BUTT, S. et al. Parity and age at first childbirth in relation to the risk of different breast cancer subgroups. **Int. J. Cancer.**, v. 125, n. 8, p. 1926-1934, 2009.
- CARMENA, M. A. R.; EARNSHAW, W. C. The cellular geography of aurora kinases. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, n. 11, p. 842-854, 2003.
- CASTILLO, A. et al. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. **Cancer Res.**, v. 67, n. 21, p. 10138-10147, 2007.
- CERQUEIRA, E. M. M. et al. Genetic Damage in exfoliated cells of uterine cervix: association and progression to malignant transformation. **Acta Cytologica**, v. 42, p. 619-649, 1998.
- CHANG, C.-J. et al. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- $\beta$ -catenin signaling. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 86-100, 2011.
- CHI, Y.-H.; JEANG, K.-T. Aneuploidy and cancer. **J. Cell Biochem.**, v. 102, n. 3, p. 531-538, 2007.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CICHON, M. A. et al. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 15, n. 4, p. 389-397, 2010.

CLEVELAND, D. W.; MAO, Y.; SULLIVAN, K. F. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. **Cell**, v. 112, n. 4, p. 407-421, 2003.

DEBONIS, S. et al. Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 338-349, 2003.

DELUCA, 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. **Cell Cycle**, v. 5, n. 3, p. 296-303, 2006.

DUXBURY, M. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness by blebbistatin: a novel myosin II inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 313, n. 4, p. 992-997, 2004.

FENECH, M. et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. **Mutat. Res.**, v. 534, n. 1-2, p. 45-64, 2003.

FUJIWARA, T. et al. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1043-1047, 2005.

GAO, C. et al. Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 21, p. 8995-9000, 2007.

GASCOIGNE, K. E.; TAYLOR, S. S. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. **Cancer cell**, v. 14, n. 2, p. 111-122, 2008.

GLOTZER, M. The molecular requirements for cytokinesis. **Science**, v. 307, n. 5716, p. 1735-1739, 2005.

HAILE, R. W. et al. BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, oral contraceptive use, and breast cancer before age 50. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 15, n. 10, p. 1863-1870, 2006.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HOLLAND, A. J.; CLEVELAND, D. W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 7, p. 478-487, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de mama**. 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em 10 ago. 2011.

IONTA, M. **O efeito do ácido retinóico sobre células normais e tumorais de fígado: uma perspectiva promissora em terapia de diferenciação para hepatocarcinoma**. 2005. 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

JORDAN, M. A.; THROWER, D.; WILSON, L. Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids1. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2212-2222, 1991.

KAPOOR, T. M. et al. Probing Spindle Assembly Mechanisms with Monastrol , a Small Molecule Inhibitor of the Mitotic Kinesin , Eg5. **J. Cell Biol.**, v. 150, n. 5, p. 975-988, 2000.

KATAYAMA, H.; BRINKLEY, W. R.; SEN, S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 4, p. 451-464, 2003.

KING, R. W. et al. How proteolysis drives the cell cycle. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1652-1659, 1996.

KOPS, G. J. P. L.; WEAVER, B. A. A; CLEVELAND, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 10, p. 773-785, 2005.

KUFER, T. A; NIGG, E. A; SILLJÉ, H. H. W. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. **Chromosoma**, v. 112, n. 4, p. 159-163, 2003.

LENGAUER, C; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-649, 1998.

LI, X.; NICKLAS, R. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. **Nature**, v. 373, n. 16, p. 630-632, 1995.

LINGLE, W. L. et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 4, p. 1978-1983, 2002.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumor cells: a confocal microscope study. **Histochem. Cell Biol.**, v. 115, p. 403-411, 2001.

MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; SAYA, H. Aurora-A - a guardian of poles. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, n. 1, p. 42-50, 2005.



MCCOLLUM, D. Cytokinesis: the central spindle takes center stage. **Curr. Biol.**, v. 14, n. 22, p. 953-955, 2004.

MERALDI, P.; HONDA, R.; NIGG, E. A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. **EMBO J.**, v. 21, n. 4, p. 483-492, 2002.

MICHEL, L. S. et al. premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. **Nature**, p. 355-359, 2001.

MINOSHIMA, Y. et al. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. **Dev. Cell**, v. 4, n. 4, p. 549-560, 2003.

MIYAUCHI, K. et al. Aurora B kinase activity is required to prevent polar cortical ingression during cytokinesis. **Cell Cycle**, v. 6, n. 20, p. 2549-2553, 2007.

NADLER, Y. et al. Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer. **Cli. Cancer Res.**, v. 14, n. 14, p. 4455-4462, 2008.

NEBERT, D. W. Transcription factors and cancer: an overview. **Toxicology**, v. 181-182, p. 131-141, 2002.

OEGEMA, K.; MITCTJ, M. Rappaport rules: Cleavage furrow induction in animal cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 10, p. 4817-4820, 1997.

OTEGUI, M. S.; VERBRUGGHE, K. J.; SKOP, A. R. Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n. 8, p. 404-413, 2005.

PETERS, J. M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. **Mol. Cell**, v. 9, n. 5, p. 931-943, 2002.

PIKE, M. et al. "Hormonal" risk factors, "breast tissue age", and the age-incidence of breast cancer. **Nature**, v. 303, n. 30, p. 767-770, 1983.

RAJAGOPALAN, H.; LENGAUER, C. CIN-ful cancers. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 54, n. Suppl 1, p. 65-68, 2004a.

RAJAGOPALAN, H.; LENGAUER, C. Aneuploidy and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 338-341, 2004b.

RIEDER, C. L. et al. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. **J. Cell Biol.**, v. 127, n. 5, p. 1301-1310, 1994.

RIEDER, C. L.; MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Dev. Cell**, v. 7, n. 5, p. 637-651, 2004.



RUSSO, J.; RUSSO, I. H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 102, n. 1-5, p. 89-96, 2006.

SASAI, K. et al. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 59, n. 4, p. 249-263, 2004.

SAUNDERS, W. S. et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 1, p. 303-308, 2000.

SCHMITT, F.; GOBBI, H. Mama. In: BRASILEIRO-FILHO, G. et al. (Ed.). **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 613-643.

SHICHIRI, M.; YOSHINAGA, K.; HISATOMI, H. Genetic and Epigenetic Inactivation of Mitotic Checkpoint Genes hBUB1 and hBUBR1 and Their Relationship to Survival Advances in Brief. **Cancer**, p. 13-17, 2002.

SKOP, A. R. et al. Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. **Science**. v. 305, n. 5680, p. 61-66, 2004.

SMALLEY, M.; ASHWORTH, A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 832-844, 2003.

SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, 51: 1409-1416, 1973.

STENOIEN, D. L. et al. Dynamic association of a tumor amplified kinase, Aurora-A, with the centrosome and mitotic spindle. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 55, n. 2, p. 134-146, 2003.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2004.

STRAIGHT, A F.; FIELD, C. M. Microtubules, membranes and cytokinesis. **Curr. Biol.**, v. 10, n. 20, p. R760-770, 2000.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and others nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, v. 271, p. 69-77, 1992.

TRICHOPOULOS, D. A. et al. Early life events and conditions and breast cancer risk: from epidemiology to etiology. **Int. J. Cancer**, v. 122, n. 3, p. 481-485, 2008.

TURNER, N.; TUTT, A.; ASHWORTH, A. Hallmarks of "BRCAness" in sporadic cancers. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 1-6, 2004.

VADER, G.; MEDEMA, R. H.; LENS, S. M. A. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. **J. Cell Biol.**, v. 173, n. 6, p. 833-837, 2006.

WHEATLEY, S. P.; WANG, Y. Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells. **J. Cell Biol.**, v. 135, n. 4, p. 981-989, 1996.

YAGER, J. D.; DAVIDSON, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 354, p. 270-282, 2006.

YAN, X. et al. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. **Genes Cells**, v. 10, n. 6, p. 617-626, 2005.