

**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

## RESUMO

COSTA–ROSA, M. **Interferindo na progressão do ciclo celular para analisar possíveis alterações de ploidia em célula tumoral de mama humana**. 2011. 75 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. Ponto de checagem mitótico. 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.

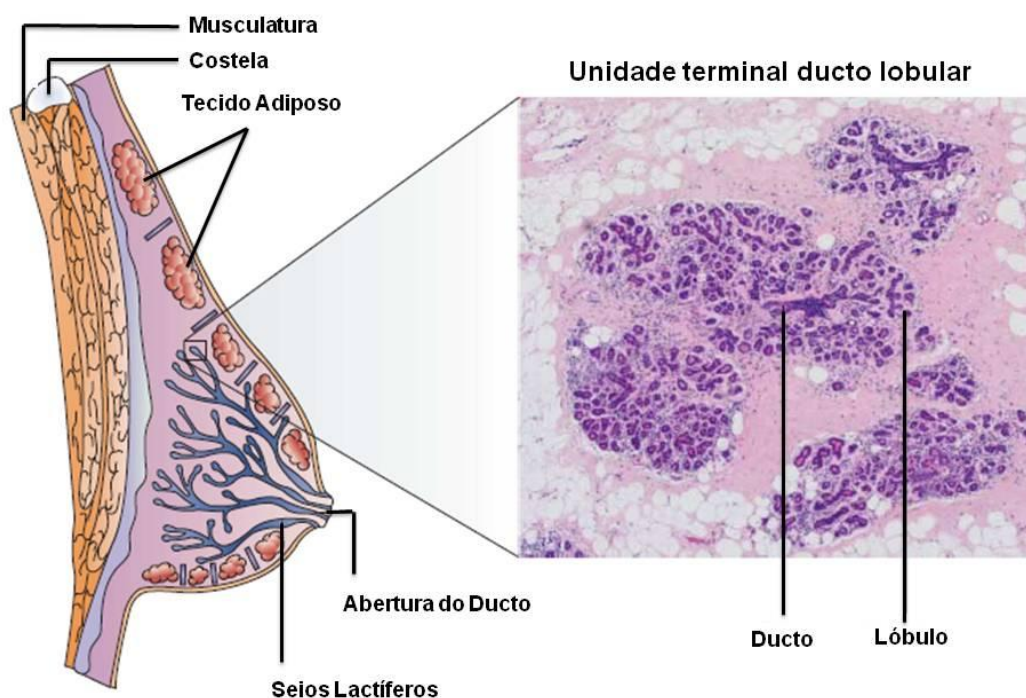
**Key Word:** Breast cancer. Checkpoint mitotic. Aneuploidy. Chromosome instability. Aurora A. Centrosome amplification. Tetraploidy.

## 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 ductos 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 estrógeno ao tecido mamário. Nas últimas décadas, diversos estudos mostram que o estrógeno 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 estrógeno, os quais são: (1) estímulo da proliferação celular, pela ativação dos receptores de estrógeno, (2) efeitos genotóxicos decorrentes de espécies reativas de oxigênio, que são formados a partir dos metabólitos de estrógeno, 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 BRAC2. 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 (Msp/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 centrôssomo 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 centrôssomos, 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 poliploidização está associada a eventos fisiológicos normais e também a processos patológicos incluindo a carcinogênese. Lu et al. (2007) demonstraram que populações de hepatócitos normais poliploides 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 CONCLUSÕES

Nossos dados mostram 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.

HANAHAN, 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.