UNIVERSIDADE DO ALGARVE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS E MEDICINA

INTERFERINDO COM O "CHECKPOINT" MITÓTICO PARA POTENCIAR A AÇÃO DE AGENTES ANTI-MITÓTICOS

Joana Filipa Tomás Teixeira

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em Oncobiologia – Mecanismos Moleculares do Cancro

Trabalho realizado sob a orientação externa de:
Prof. Dr. Hassan Bousbaa e Mestre Patrícia Silva
E sob a orientação interna de:
Prof. Dr. Álvaro Tavares

2015

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

_____

Joana Filipa Tomás Teixeira

©Copyright

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Este trabalho foi financiado pela CESPU – Cooperativa de Ensino Politécnico e Universitário (Referência do projeto: CheckTax-CESPU-2014), e pela FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, no âmbito do projeto CEQUIMED-PEst-OE/SAL/UI4040/2014

Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde

Trabalhos publicados no âmbito do presente projeto

Artigos

Diogo V*, Teixeira J*, Silva PMA, Bousbaa H. (2015). Targeting the Spindle Assembly Checkpoint in Colorectal Cancer: Current Status and Future Perspectives. Current Drug Targets (Submitted/Under review). *(*) Equal contribution*

Comunicações orais

Teixeira J, Diogo V, Silva PMA, and Bousbaa H.Targeting Cdc20 protein to increase sensitivity of colorectal cancer cells to paclitaxel. 8º Encontro de Jovens Investigadores da Universidade do Porto, 13 a 15 de Maio, Porto, Portugal

Diogo V, Silva PMA, Teixeira J and Bousbaa H. Therapeutic targeting of the mitotic checkpoint to increase sensitivity of glioblastoma cells to antimitotic agents. 8º Encontro Investigação Jovem da Universidade do Porto IJUP, 13 a 15 de Maio, Porto, Portugal

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer ao **Professor Doutor Hassan Bousbaa,**por aceitar orientar me e pela oportunidade de integrar este grupo fantástico para o desenvolvimento da minha tese de mestrado. Muito obrigada por todo o acompanhamento, motivação, ajuda e orientação no decorrer do ano epela confiança depositada em mim e no meu trabalho. Um agradecimento também por todo o conhecimento que permitiu enriquecer a minha formação científica.

Um agradecimento também ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), do Instituto Superior de Ciências da Saúde do Norte (ISCS-N) / CESPU pelo acolhimento.

À Patrícia Silva, em primeiro lugar por ter aceitado ser minha co-orientadora e pelo excelente trabalho de orientação durante este trabalho. Um obrigado sincero por toda a ajuda durante este ano, por todos os conselhos e motivação e principalmente pela amizade e muita paciência.

À Nilza, que apesar de menos tempo juntas se demonstrou sempre disponível para ajudar.

Às "minhas meninas" (Ana Henriques, Joana Fonseca, Joana Nunes, Sandra Marques e Vanessa Nascimento) que me acompanharam durante este percurso, por toda a ajuda, concelhos e principalmente pela grande amizade que vou guardar sempre comigo.

À minha colega de casa e amiga Vânia, por toda amizade, cantorias e por todo o apoio e ajuda.

A todos os meus amigos que mesmo longe nunca deixaram de me apoiar nesta jornada da minha vida, em especial à minha melhor amiga Ana Gonçalves e à minha Gisela Maria por todo o carinho e motivação

Ao meu amor Hugo Geraldes, peloconstante e enorme apoio ao longo deste ano, por todas as nossas conversas, por todas as longas viagens feitas, por toda a motivação, compreensão e paciência. Um obrigado do fundo do coração por estares sempre lá.

Ao meu irmão Tiago, por toda a força e carinho, por me mostrar que por mais dificuldades que possam aparecer, desistir não é opção e devemos lutar sempre pelos nosso sonhos, um enorme obrigada.

Aos meus avós e pais que sem eles nada disto seria possível, por toda a força e confiança depositada em mim. Obrigada por me ajudarem a realizar mais uma etapa da minha vida, a vós vos devo a pessoa que sou hoje.

Resumo

Atualmente, várias terapias anti-cancro apresentamuma toxicidade associada e são confrontadas com resistências por parte de muitos cancros. Por exemplo,em quimioterapia vários cancros exibem resistência a agentes anti-mitóticos como o Taxol. Estes agentesinterferem com a formação ou a dinâmica dos microtúbulos, o que leva a uma paragem das células em mitose, devido à ativação do "checkpoint" mitótico, o mecanismo que permite a correta segregação dos cromossomas.No entanto as célulastumorais resistentes ao taxolconseguem contornar esta paragem e continuar a sua proliferação. Posto isto, o"checkpoint" mitóticotem sido sugerido como um potencial alvo no tratamento anti-cancro.

Assim este trabalho teve comoobjetivo inicial a avaliação do potencial inibidor de pequenas moléculas contra uma proteína envolvida no checkpoint mitótico (BubR1). Os resultados obtidos mostraram que uma das pequenas moléculas analisadas, demonstrou ter uma atividade anti-proliferativa em células HeLa, demonstrando uma possível interferência com a função da proteína BubR1. O objetivo principal deste trabalho consistiu emsensibilizar células tumorais à ação do taxol, depletando proteínas envolvida no silenciamento do"checkpoint" mitótico (Spindly) e na saída da mitose (Cdc20). Os resultadosdemonstraram que a depleção das proteínas leva a uma paragem das células em mitose, mais eficiente após a depleção da proteína Spindly. Foi demonstrado também uma redução da viabilidade e da capacidade proliferativa das células,com uma reduçãomais acentuada apósa combinação da depleção com o Taxol. Assim este trabalho sugere que a depleção destas duas proteínas ajuda a sensibilizar as células à ação do taxol nas concentraçõesusadas em quimioterapia.

Palavras-chave:"Checkpoint"mitótico;Microtúbulos; Taxol; Cdc20;Spindly;Resistência à quimioterapia

Abstract

Currently, many anti-cancer therapies have an associated toxicity and are faced with resistance from many cancers. In chemotherapy various cancers exhibit resistance to anti-mitotic agents, Taxol, currently used. These agents are responsible for a change in the microtubules that will arrest cells in mitosis due to Spindle Assembly Checkpoint activation, the mechanism that allows for the correct segregation of chromosomes. However, taxol-resistant cancer cells overcome the arrest and continue their proliferation.In view of that, it has been suggested that the SAC can be used as a new target in anticancer treatment.

So this work hadas initial purpose the evaluation of the potential inhibitoreffect of small moleculesagainst a protein involved in spindle assembly checkpoint (BubR1). The results showed that one of the small molecules analyzed have an anti-proliferative activity in HeLa cells, demonstrating a possible interference with the function of BubR1 protein. The goal main of this work was to sensitize tumor cells to the action of taxol, depleting proteins involved in the silencing of the spindle assembly checkpoint (Spindly) and exit from mitosis (Cdc20). The results demonstrated that depletion of proteins leads to arrest of cells in mitosis,wich is more efficient after depletion of Spindly protein. It has also been demonstrated aredutionin the viability and proliferative capacity of cells with a more pronounced effectafter depletion and combination with Taxol. Thus, this work suggests that depletion of these two proteins help to sensitize cells to the action of taxol in the concentrations used in chemotherapy with anti-proliferative activity.

Key words: Mitotic checkpoint; Microtubules; Taxol; Cdc20; Spindly; Chemotherapy resistance

Lista de abreviaturas

RPMI- Roswell Park Memorial Institute

DMEM- Meio Dulbecco's MEM

FBS- Soro Fetal Bovino

PBS - tampão fosfato salino

DMSO- Dimetilsulfóxido

Cdc20-Cell DivisionCycle 20

SAC- Spindle Assembly Checkpoint

RNA – ÁcidoRibonucleico

siRNA- smallinterfering RNA

IM- Índice Mitótico

DAPI- Diamidino-2-phenylindole

BSA – BovineSerumAlbumin

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

RT- Reagente de trabalho

SDS-Page - Dodecil Sulfato de Sódio – Electroforese em gel de poliacrilamida

TSBST- Tris-Buffered Saline Tween-20

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

SRB- Sulfolrrodamina B

TCA- ácido tricloroacético

IC_{50}- Concentração de composto citotóxico, à qual é possível verificar uma redução de 50% de crescimento e viabilidade celulares

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

Tween 20 - poli-oxietilenosorbitanmonolaurato

TEMED – N,N,N,'N-Tetrametiletilenodiamina

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

Índice

Agradecimentos i

Resumo iii

Abstract v

Lista de abreviaturas vii

Índice de figuras x

Índice de gráficos xi

Índice de tabelas xi

Parte I -Introdução 1

1 Biologia molecular do cancro 1

2 "Checkpoint" Mitótico 4

2.1 "Checkpoint" mitótico e o cancro 8

3 Agentes Anti-mitóticos 9

4 Objetivo 12

Parte II - Materiais e Métodos 14

1 Cultura celular 15

1.1 Linhas celulares e condições de cultura 15

1.2 Subcultura de células aderentes 15

1.3 Congelamento de células 16

1.4 Descongelamento de células 17

2 Origem das pequenas moléculas 17

3 Tratamento de lamelas com Poli-L-lisina 17

4 RNA de interferência e transfeção 18

5 Índice Mitótico 19

6 Imunofluorescência indirecta 19

7 Preparação de lâminas de Cytospin 20

8 Extração e quantificação de Proteínas 21
8.1 Electroforese em sistema desnaturante - SDS-PAGE/Western Blotting 22
9 Extração e quantificação de RNA total 24
9.1 Desenho de Primers 25
9.2 Síntese de cDNA 26
9.3 PCR quantitativo em tempo real 27
10 Ensaio do MTT 27
11 Ensaio de formação de colónias 28
12 Ensaio de TUNEL (TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling) 28
13 Análise e tratamento de imagens 30
14 Análise estatística dos resultados 31
Parte III – Resultados 32
1 Avaliação do potencial inibidor de pequenas moléculas contra a proteína BubR1 32
1.2.1 Análise da viabilidade celular 32
1.2.2 Caracterização do mecanismo de ação do composto E5 e da sua relação com BubR1 35
2 Avaliação do efeito anti-proliferativo da depleção da proteína Spindly e da combinação com Taxol 38
2.1 Eficiência da depleção da proteína Spindly 39
2.2 Fénotipo resultante da depleção da proteína Spindly 41
2.3 Efeito anti-proliferativo da depleção da Spindly e da combinação com Taxol 42
2.3.1 Efeito anti-proliferativo a curto prazo 43
2.3.2 Efeito anti-proliferativo a longo prazo 44
2.3.3 Análise da morte celular após depleção da proteína Spindly 45
3 Avaliação do efeito anti-proliferativo da depleção da proteína Cdc20 e da combinação com Taxol 47

3.1 Nível de expressão da proteína Cdc20 47
3.2 Eficiência da depleção da proteína Cdc20 48
3.3 Fenótipo resultante da depleção da proteína Cdc20 49
3.4 Tratamento combinado siRNAs e Taxol 50
3.4.1 Efeito a curto prazo da combinação siRNA com Taxol 50
3.4.2 Efeito a longo prazo da combinação siRNA com Taxol 52
Parte IV – Discussão/Conclusão 54
Parte V – Perspetivas futuras 57
Parte V - Referências 58

Índice de figuras

Figura 1.1 – Representação esquemática das caraterísticas principais das células cancerígenas 2
Figura 1.2 – Fases do ciclo celular e respetivos "Checkpoints". 4
Figura 1.3 Representação das fases da mitose. 5
Figura 1.4 – Mecanismo do checkpoint mitótico 7
Figura 2. 1 - Representação esquemática do desenho experimental 14
Figura 3. 1 - Fotos de microscopia de contraste de fase de células HeLa tratadas com o composto E5 35
Figura 3. 2 - Células HeLa marcadas com DAPI, tratadas com o composto E5 (150µM e 300µM) 37
Figura 3. 3 - Fénotipo das células HeLa resultante da incubação com o composto E5 (300µM) 38
Figura 3. 4 - Eficiência da depleção da proteína Spindly 40
Figura 3. 5 - Fenótipo resultante da depleção da proteína Spindly, por RNAi, na linha celular MCF-7 41
Figura 3. 6 - Índice mitótico resultante da depleção da proteína Spindly, comprando com células controlo e células com adição de Nocodozole 42

Figura 3. 7 - Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Spindly e da combinação com o taxol na proliferação celular a longo prazo da linha MCF-7. 45
Figura 3. 8 - Morte celular por apoptose, analisada através do ensaio de Tunel, na linha MCF-7, na sequência do silenciamento da proteína Spindly e da combinação com o taxol. 46
Figura 3. 9 - Eficiência da depleção da proteína Cdc20 através de imunofluorescência, na linha SW480. 49
Figura 3. 10 - Índice mitótico resultante da depleção da proteína Cdc20, em linhas celulares de cancro colo-rectal. 50
Figura 3. 11 - Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Cdc20 na proliferação celular a longo prazo da linha SW480. 53

Índice de gráficos

Gráfico 3.1 – Viabilidade celular após adição do composto B9 33
Gráfico 3.2 - Viabilidade celular após adição do composto B5 33
Gráfico 3.3 - Viabilidade celular após adição do composto A11 ……...34
Gráfico 3.4 - Viabilidade celular após adição do composto A10….....34
Gráfico 3.5 - Viabilidade celular após adição do composto E5….....34
Gráfico 3.6 – Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Spindly da combinação com o taxol na viabilidade celular da linha MCF-7……...….43
Gráfico 3.7 – Expressão relativa dos mRNAs da Cdc20 nas linhas celulares do cancro colo-rectal……48
Gráfico 3.8 – Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Cdc20 na viabilidade celular da linha SW480…….…..51

Índice de tabelas

Tabela 2. 1 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de imunofluorescência, para comprovar o silenciamento da proteína Spindly. 20
Tabela 2. 2 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de imunofluorescência, para comprovar o silenciamento da proteína Cdc20. 20
Tabela 2. 3 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de Western Blotting, para comprovar o silenciamento da proteína Spindly. 24

Tabela 2. 4 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de Western Blotting, para comprovar o silenciamento da proteína Cdc20. 24
Tabela 2. 5 - Sequência oligonucleotídica dos *primers* utilizadospara a amplificação dos genes Actina, Spindly e CDC20. 26
Tabela 2. 6 - Componentes do tampão para amostras e controlo positivo. 29
Tabela 2. 7 - Componentes do tampão para o controlo negativo. 30

Parte I -Introdução

1 Biologia molecular do cancro

O cancro é uma das principais causas de morte mundialmente, com uma incidência mais elevada em países desenvolvidos(1). Apesar de nos últimos anos se ter verificado um decréscimo na sua incidência a nível europeu, a Organização Mundial de Saúde prevê que no ano 2030, o cancro será considerado uma das maiores causas de morte a nível mundial (2).

O cancro é uma doença muito complexa que se origina devido a alterações a nível genético ou epigenético, levando ao desenvolvimento de células neoplásicas, que através da acumulação de mutações adquirem um genótipo de vantagem resultando no desenvolvimento de células tumorais (3). As células tumorais apresentam uma taxa de mutações muito superior às células normais, isto deve se a mutações em genes importantes como: proto-oncogenes, genes que estão envolvidos no crescimento celular e na diferenciação e que através de mutações de ganho de função desencadeiam a tumorigénese; genes supressores de tumores, são genes que codificam proteínas que normalmenteinibem a proliferação celular e impedem o desenvolvimento do tumor, a sua perda impulsiona a proliferação celular; genes envolvidos na reparação do DNA, cujo a inativação promove assim a proliferação com erros no DNA (4, 5). As alterações que ocorrem no genoma podem estar associadas a causas hereditárias ou esporádicas (6).Apesar dos diferentes tumores apresentarem diferentes caraterísticas entre si, existe um grupo decaraterísticas que são comuns aos diferentes tipos de célula tumorais. Estasresultam em alterações genéticas que promovem a transformação progressiva das células normais em células cancerígenas, caraterizando o processo de carcinógenese (Figura 1.1) (3).

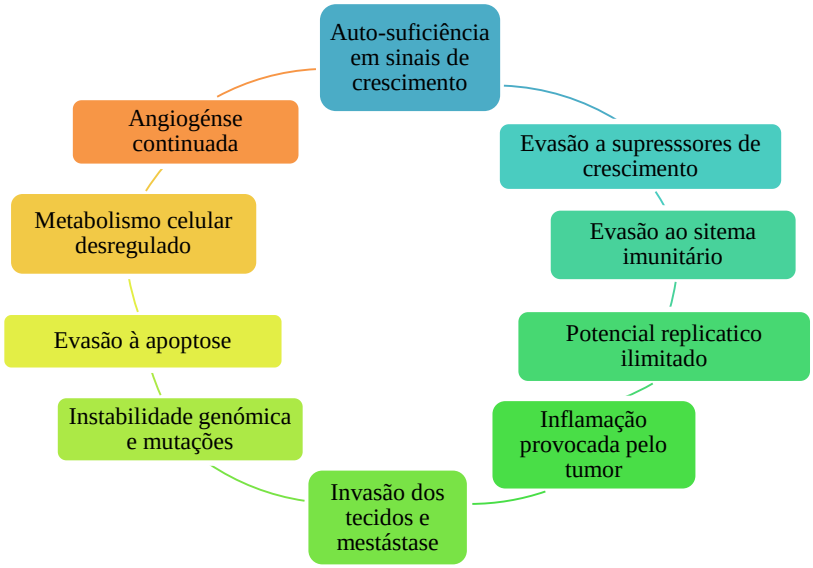


Figura 1.1 – Representação esquemática das caraterísticas principaisdas células cancerígenas**.**

Atualmente existem diversas caraterísticas comuns às células cancerígenas, incluindo a sinalização proliferativa sustentada, capacidade de evitar os supressores de crescimento. Incluem também evasão à apoptose, a indução de angiogénese, estimulando a produção de seus próprios vasos sanguíneose activação de invasão e metástase, promovendo a sua invasão para diversos órgãos. Recentemente foram adicionadas mais duas características essenciais: a inflamação e a instabilidade genómina.

Uma das caraterísticas descritas recentemente e que se encontra na maioria dos cancros é a instabilidade genómica, caraterizada por uma acumulação de alterações genéticas (6, 7). A instabilidade genómica apresenta várias formas sendo uma delas designadas de instabilidade cromossómica (CIN, de *chromosome instability*) (6).

CIN é uma das principais causas da instabilidade genómica sendo considerada uma caraterística de tumores sólidos. Consiste em alterações ao nível dos cromossomas tendo como consequências uma elevada taxa de má segregação dos cromossomas e a aneuploidia (número de cromossomas anormais na células) levando assim ao desenvolvimento e crescimento de tumores.

Durante a divisão de uma célula em duas células filhas, ocorre um processo organizado por uma série de eventos que vai permitir a duplicação dos componentes celulares, denominado de ciclo celular. O ciclo celular é um processo essencial para o desenvolvimento de todos os organismos vivos e está dividido em duas fases principais: a interfase, que se divide em três fases distintas (fase G1,fase S e fase G2); e a mitose (fase M), a fase da divisão celular (8). A fase G1 representa o intervalo entre a mitose e

a replicação do DNA.Nesta fase, verifica-se um aumento do volume da célula e as proteínas necessárias para a divisão são sintetizadas.Na fase seguinte, a fase S, que ocorre a síntese do DNA ondeo material genético é replicado e cada cromossoma passa a ser constituído por duas cromátides irmãs, unidas por um centrómero. Na fase G2, ocorre a duplicação dos centríolos e a contínua síntese de proteínas, assim como produção de estruturas para as futuras células-filhas, que vão resultar da fase M.

Durante a progressão do ciclo celular, esta apresenta quatro sistemas de controlo e monitorização que garantem a execução correta de todos os eventos, denominados de "Checkpoints"(8, 9).Estes sistemas tem como função geral, assegurar a sobrevivência celular, impedindo a progressão da célula de uma fase do ciclo para a fase seguinte sem que os eventos anteriores estejam corretamente executados (8, 10). O primeiro "checkpoint" é responsável por garantir a integridade do DNA na fase G1. Na fase S, o segundo "checkpoint" monitoriza a replicação do DNA e na fase G2, o terceiro "checkpoint" assegura o fim da replicação assim como a integridade do DNA.O último "checkpoint", designado de "checkpoint" mitótico, localiza-se na mitose e garante a correta divisão dos cromossomas pelas células-filhas (Figura 1.2). No entanto quando ocorrem mutações nos elementos dos "checkpoints", o risco de instabilidade genómica aumenta, conduzindo a uma predisposição das células a tornarem-se células cancerígenas. Uma das causas que está associada ao CIN é os defeitos em mecanismos envolvidos na segregação cromossómica, como o "Checkpoint" Mitótico(6, 11).

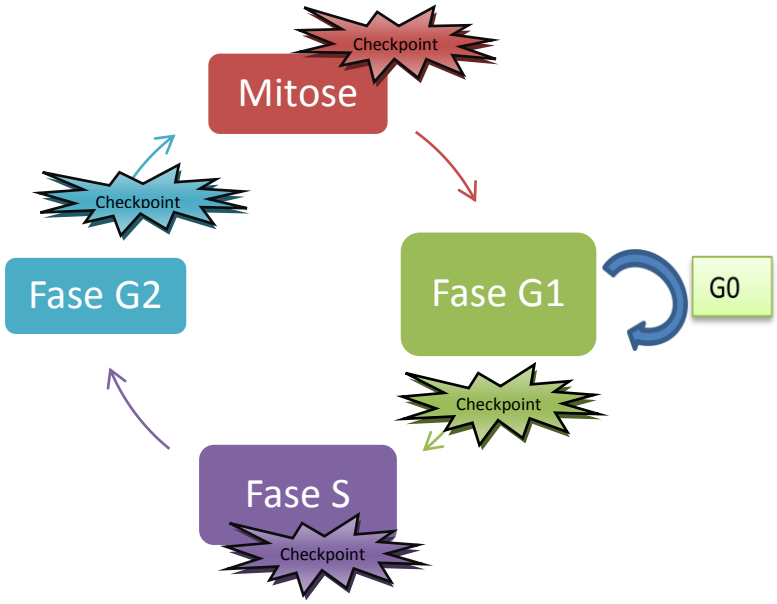


Figura 1.2 – Fases do ciclo celular e respetivos "Checkpoints".
O ciclo celular encontra-se dividido em quatro fases distintas com três "checkpoints" ao longo do ciclo. A transição da célula da fase G1 para a fase S é um processo controlado pelas quinasesdependentes de ciclinas (CDKs) que permitem a progressão no ciclo ou a entrada da célula em quinescência (fase G0). Após a entrada da célula na fase S, o DNA é replicado seguindo-se a fase G2, controlada pela ciclina B- CDK1, que permite e entrada na mitose, onde a célula se vai dividir.

2 "Checkpoint" Mitótico

A mitose é uma das fases principais do ciclo celular, que consiste numa série de acontecimentos que levam à segregação cromossómica e posteriormente à divisão celular (8, 12). Esta divide-se em cinco fases: a Profase, onde são individualizados os cromossomaspor condensação da cromatina. Na prometafase inicia-se a quebra do invólucro nuclear libertando assim os cromossomas no citoplasma. Nesta fase os dois centrossomas, estruturas responsáveis pela organização dos microtúbulos, migram para os pólos opostos da célula permitindo que se forme o fuso mitótico. Os microtúbulos, que previamente foram organizados no fuso, vão se ligar aos cromossomas possibilitando o alinhamento dos cromossomas no plano equatorial da célula. A terceira fase denomina-se de metafase, é durante esta fase que os cromossomas se alinham na placa equatorial. Quando estes se encontram corretamente alinhados e devidamente ligados aos microtúbulos a célula vai prosseguir para a próxima fase, a anafase. Na

anafase ocorre a separação das duas cromátides irmãs, que constituem cada cromossoma, que migrampara pólos opostos ao longo do fuso mitótico. Por último,ocorre a telofase onde os cromossomas após atingir os pólos desespiralizam-se, os centríolos deslocam-se para cada uma das células filhas e o fuso mitótico desaparece. Finalmente, na citocinese, ocorre a separação das células filhas (Figura 1.3) (13, 14).

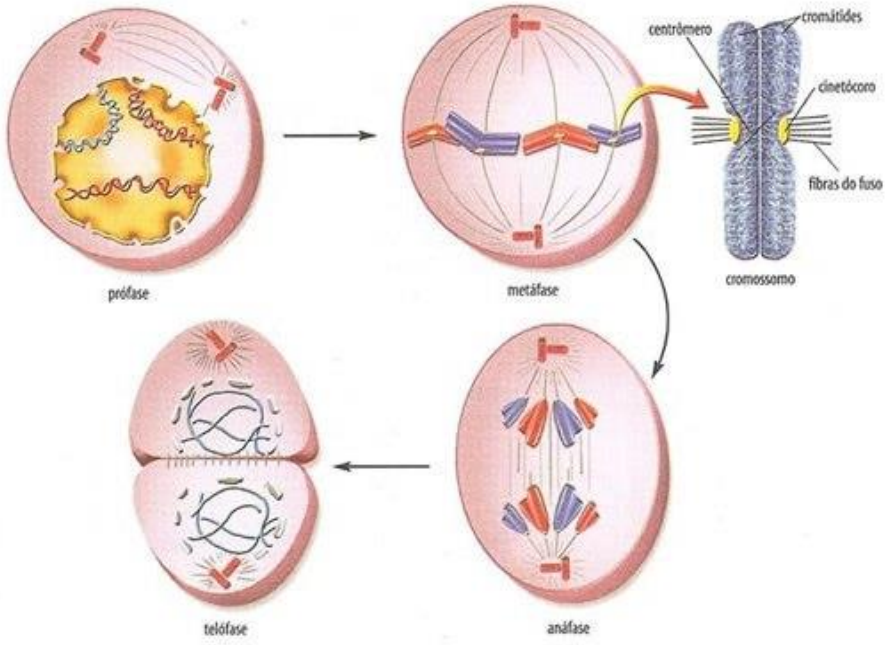


Figura 1.3 Representação das fases da mitose.
A divisão mitótica inicia-se com a profase, onde se assiste à condensação progressiva da cromatina em cromossomas definidos Durante a prometafase ocorre a desintegração do invólucro nuclear e os microtúbulos iniciam o processo dinâmico de captura de cada uma das duas cromátidas irmãs, através dos cinetocoros. De seguida a célula transita para a metafase, onde os microtúbulos são responsáveis pelo alinhamento dos cromossomas na placa equatorial. Após o correto alinhamento célula reúne as condições requeridas de modo a transitar para a anafase. Durante a anafase ocorre a separação das cromátidas irmãs, em direcção a pólos opostos do fuso. É na telofase que a cromatina descondensa e o invólucro nuclear é reorganizado Adaptado de: http://www.estudopratico.com.br/mitose-fases-da-divisao-celular/.

Uma correcta segregação cromossómica durante a mitose, é um pré-requisito para manter a estabilidade cromossómica das células (9). Para que a segregação se dê sem erros, os cromossomas devem se encontrar correctamente ligados ao fuso mitótico ealinhados na placa equatorial. É importante que durante a segregação cromossómica existam mecanismos que controlem este processo, garantindo assim uma correta divisão celular (9).

O “checkpoint” mitótico (também conhecido como Spindle assemby checkpoint-SAC) é um mecanismo de controlo da sobrevivência de células, responsável por prevenir uma má segregação cromossómica, monitorizando a ligação dos cromossomas aos microtúbulos do fuso (9, 15). Para que ocorra uma correta segregação cromossómica, cada cromossoma deve estabelecer uma ligação bipolar com os microtúbulos através dos cinetoros, possibilitando desta forma o alinhamento dos cromossomas na placa equatorial (16). Quando a ligação dos cinetocoros aos microtúbulos é comprometida, os cromossomas não se conseguem alinhar na placa equatorial activando deste modo o SAC, que inibe a transição da metafase para anafase (17).Foram identificadas diversas proteínas consideradas centrais no SAC, designadas de Mad (*Mitotic Arrest Deficient)*que inclui as proteínas Mad1 e Mad2; e Bub (*BuddingUninhibitedbyBenzimidazole*) englobando as proteínas Bub1, Bub3 e BuR1. Estas proteínas localizam-se nos cinetocoros, no entanto quando ocorrem falhas nas ligações dos cinetocoros aos pólos do fuso, o SAC é ativado e os níveis destas proteínas aumentam(18). Após a sua ativação, o SAC vai inibir o complexo promotor da anafase (APC), através do sequestro da proteína Cdc20, pelo complexo do “checkpoint” mitótico (MCC, *Mitotic Checkpoint Complex*). O MCC é constituído pelas Mad2, BubR1,Bub3e pelo fator ativador de APC - a Cdc20.Ao ser inibido, o APC é incapaz de degradar as proteínas Securina e Ciclina B, mantendo deste modo as cromátides irmãs juntas e resultando numa paragem da célula na mitose, respetivamente. Um passo importante na formação do MCC,é a mudança de conformação da proteína Mad2, que adopta duas conformações diferentes – aberta (O-Mad2) e fechada (C-Mad2). Quando a Mad2 se liga ao cinetocoro, adota a conformação fechada(C-Mad2)que permite o sequestro da proteína Cdc20. Após a ligação da C-Mad2 à Cdc20, estas vão se ligar por fim às proteínas BubR1 e Bub3, formando assim o MCC(15-17).

Quando todos os cromossomas se encontram correctamente ligados aos microtúbulos e alinhados na placa equatorial, o MCC é desmontado, permitindo assim a ligação da Cdc20 ao APC. A activação do APC tem como consequência a degradação da Securina e da Ciclina B. A degradação da Securina liberta a Separase que consequentemente vai clivar as coesinas (proteínas responsáveis pela ligação das cromatides irmãs) permitindo a separação das cromátides. Por outro lado a degradação da Ciclina B possibilita a inactivação da CDK1, o que leva à saída da célula da mitose (Figura 1.4)(15, 19). Uma das proteínas envolvida na ligação dos cinetocoros aos microtúbulos e essencial no silenciamento do SAC é a proteína Spindly. Inicialmente,

foi descrita como uma proteína necessária para o recrutamento da dineína no cinetocoro. A dineína uma proteína motora, responsável pelo silenciamento do "checkpoint" mitótico através da remoção das proteínas do SAC dos cinetocoros alinhados na placa equatorial. A depleção da Spindly leva a que a dineína não seja capaz de atingir os cinetocoros resultando numa retenção da célula em mitose com cromossomas desalinhados (20).

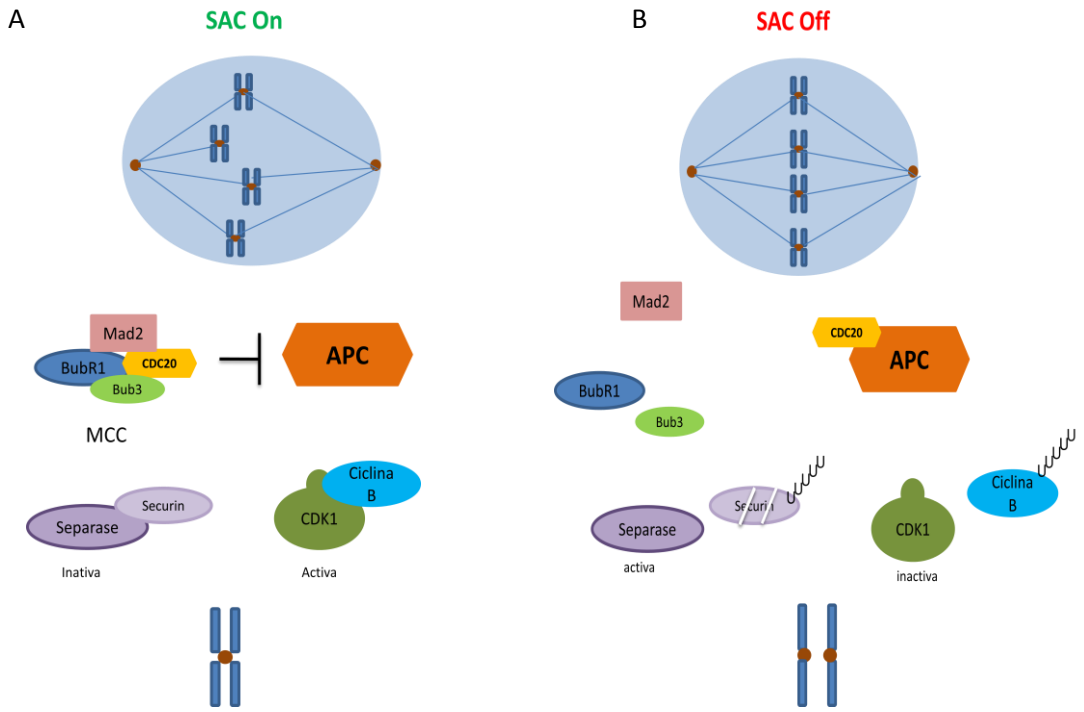


Figura 1.4 – Mecanismo do checkpoint mitótico

(A) Os cinetocoros não ligados aos microtúbulos servem como uma plataforma para formação do complexo de checkpoint mitótico (MCC) constituído pelas proteínas BubR1, Bub3, e Mad2, que vai sequestrar a proteínaCdc20, impedindo-a de activar o APC/C e de levar à degradação da securina e a ciclina B pelo proteassoma 26S, inibindo assim a passagem da célula da metafase para a anafase.

(B) Após a correcta ligação dos microtúbulos aos cinetocoros, alinhando todos os cromossomas na placa equatorial, o MCC é desintegrado e a proteína Cdc20 é libertada, activando assim o APC/C. Esta activação faz com que a securina seja degrada activando a proteína separase e a proteína CDK1 seja inactivada, promovendo a separação das cromátides irmãs e a saída da mitose.

2.1 “Checkpoint” mitótico e o cancro

Quando o SAC apresenta defeitos, fica impossibilitado de detetar as falhasnas ligações incorretas entre cinetocoros. Como resultado, as células ficam incapazes de parar a divisão celular prosseguindo com erros originando assim células filhas anormais, levando assimà instabilidade cromossómica (CIN). A maioria das neoplasias são caraterizadas por instabilidade genética quer na forma de instabilidade de microsatélites (MIN) ou na forma de instabilidade cromossómica(21).As taxas de segregação cromossómica desiguais que tem como resultado a aneuploidia, são bastante frequentes em células tumorais (22). Falhas na atividade do SAC tem sido apontada como uma possível causa da CIN.

A aneuploidia é uma caraterística presente em vários tipos de cancros, resultando na instabilidade cromossómica. Tendo em conta que o “checkpoint” mitótico é o mecanismo usado pelas células para evitar a aneuploidia, os cancros associados esta caraterística indicam que as falhas nos “checkpoint” são determinantes para a tumorigénese. Diversos estudos reportam que a instabilidade cromossómica está muitas vezes relacionada com alterações na função ou expressão das proteínas que constituem o “checkpoint” mitótico (22, 23).Em 1998, Cahill *et al.* demonstrou através de um estudo em linhas celulares de cancro colo-rectal, uma associação entre a instabilidade cromossómica e a perda de função da proteína do “checkpoint”, Bub1 (21). Ao longo de vários anos foram desenvolvidos variados estudos que procuravam uma relação entre as mutações em proteínas do “checkpoint” mitótico e o cancro, no entanto o mecanismo por de trás desta relação contínua por esclarecer.

No entanto hoje em dia, já foram vários os estudos publicados que envolvem a relação entre as proteínas do checkpoint e o cancro. Kim Y *et al.* demonstrou que a sobre-expressão das proteínas Mad2 e Cdc20 está associada ao desenvolvimento inicial do cancro do colo do útero (24). Outro estudo também mostrou a sobre expressão da Cdc20 associada não só à proliferação como ao mau prognóstico, em linhas do cancro colo-rectal(25). A expressão aumentada da proteína Mad2 e BubR1 foi também demonstrada estar relacionada com o aumento da proliferação no cancro oral e no cancro gástrico (26, 27). Segundo Andressa Gois Morales *et al.* a inibição da proteína Bub1 assim como da proteína BubR1 está associada a um decréscimo da proliferação

celular, como é demonstrado também em tumores da glândula salivar uma associação da sobre-expressão da proteína Bub1 com a proliferação de células anormais (28, 29).

3 Agentes Anti-mitóticos

Os microtúbulos representam um componente muito importante para a célula, sendo cruciais na manutenção da forma, polaridade e no transporte intracelular das células. Os microtúbulos são estruturas longas altamente dinâmicas, constituídas por dímeros de tubulina (α-tubulina e β-tubulina), representando juntamente com os filamentos de actina e filamentos intermédios, os maiores componentes do cito esqueleto em células eucariótas(30).Ao longo das diferentes fases do ciclo, a dinâmica dos microtúbulos sofre alterações que são indispensáveis para a sua organização. Durante a divisão celular os microtúbulos desempenham um papel fundamental, que permite a formação do fuso mitótico e posterior separação dos cromossomas. Devido à sua função crítica na divisão celular, os microtúbulos são assim usados como alvos na quimioterapia, através do uso de drogas anti-mitóticas(31).

As drogas anti-mitóticas usadas hoje em dia no combate ao cancro, dividem-se em dois grandes grupos: os Taxanos (Paclitaxel e Docetaxel) e os Vinca Alcalóides (Vinblastine, Vincristine, Vinorelbine e Vindesine), que têm demonstrado a sua eficácia em diversos tratamentos para vários tipos de cancros.

A acção central destas drogas é a sua capacidade para suprimir a dinâmica dos microtúbulos do fuso mitótico, resultando numa paragem durante a mitose impedindo a células de transitar de metafase para a anafase. Quando esta paragem ocorre durante um longo período a célula entra em apoptose e acaba por morrer, sendo este o destino final pretendido pelouso das drogas anti-mitóticas na quimioterapia. Apesar de terem a mesma finalidade, estes dois grandes grupos actuam de forma diferente sobre os microtúbulos.

As Vinca alcalóides são moléculas diméricas, originalmente isolados de uma planta denominada de *Vinca Rosea*(também conhecida como *Catharanthus roseus*) (32). Estas drogas são conhecidas como agentes destabilizadores, responsáveis pela despolimerização dos microtúbulos, quando usadas em concentrações elevadas, levando à paragem da célula em mitose. Por outro lado, quando usadas em concentrações mais baixas, levam à supressão da dinâmica dos microtúbulos sem despolimerizar o fuso dos

microtúbulos, no entanto mantém a sua capacidade de parar as células em mitose e induzir a apoptose (30, 33). Os Vinca alcalóides já fazem parte da quimioterapia de diversos tumores sólidos, sendo também combinados actualmente com outros agentes (32).

Os taxanos, são outro grande grupo de drogas anti-mitóticas conhecidos como agentes estabilizadores dos microtúbulos, que ao contrário dos vinca, estes são responsáveis por estabilizar os microtúbulos a elevadas concentrações, originado a sua polimerização. Após a polimerização, a dinâmica dos microtúbulos é afectada, originando uma paragem da célula em mitose acabando por levar à apoptose (34, 35). Também estas drogas já são incorporadas em diversos tratamentos de quimioterapia contra tumores sólidos e são já usadas também em combinação com outros agentes.

Um dos taxanes bastante usado hoje em dia é o Paclitaxel (nome comercial Taxol), que atua polimerizando os microtúbulos através da ligação à subunidade β-tubulina, conseguindo assim levar a uma paragem da célula em mitose (30, 32).

Durante vários anos estas drogas foram utilizadas em diversos regimes de quimioterapia e já provarem a sua eficiência, no entanto alguns entraves têm vindo a colocar em causa esta eficácia nomeadamente devido às limitações que estas apresentam, principalmente a níveis de efeitos secundários e de resistência de diversos cancros (35, 36).

Os efeitos secundários mais frequentes estão relacionados com a toxicidade neurológica e hematológica. O prolongamento de tratamentos com drogas anti-mitóticas demonstrou em diversos casos levar à inibição dos microtúbulos axonais, que desempenham um papel muito importante no transporte axonal nos neurónios, conduzindo assim à neurotoxicidade. Outro efeitos secundário bastante comum, quando o uso destas drogas, é a toxicidade hematológica conhecida também como mielosupressão, resultando da inibição da rápida divisão das células hematopoiéticas (30, 33).

Diversas causas de resistência às drogas anti-mitóticas são estudadas, sendo que um dos mecanismos normalmente relacionado com esta resistência é o mecanismo de efluxo juntamente com alterações na membrana celular. Através da sob expressão de bombas de efluxo, como a P-glicoproteína presente na membrana celular, a célula cancerígena tem a capacidade de bombear a droga para fora tornando-se desta forma resistente. Outros mecanismos também já foram propostos para esta resistência adquirida pelas células cancerígenas, envolvendo mutações na tubulina que vão afectar

a dinâmica e estabilidade dos microtúbulos, provocando alterações nas proteínas reguladoras dos microtúbulos (30, 33, 37).

Apesar de os microtúbulos representarem atualmente um alvo promissor para a quimioterapia no combate ao cancro e das drogas anti-mitóticas apresentarem eficácia em diversos tratamentos através da sua atividade anti-tumoral, ainda é preciso muito trabalho e vários estudos que consigam fazer face às limitações que apresentam como também e muito importante, à resistência. Assim, a combinação destas drogas com outros métodos é cada vez mais uma necessidade para permitir que a quimioterapia com anti-mitóticos traga uma nova esperança e qualidade de vida aos pacientes.

4 Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo:

1. Avaliação depequenas moléculas com potencial inibidor da proteína do "checkpoint" mitótico BubR1.

A descoberta de novos compostos com atividade anti-tumoral continua a ser alvo de investigação ativa. O principal objetivo é desenvolver pequenas moléculas que possam ser utilizas como alternativa ou em combinação com os fármacos atualmente utilizados na terapia contra o cancro, mas que subjuguem as suas limitações, nomeadamente a toxicidade e a resistência associadas ao tratamento. Nesse sentido, propõe-se avaliar a capacidade de cinco pequenas moléculas em inibir a proteína BubR1, uma proteína cinase com um papel importante quer no "checkpoint" mitótico quer no estabelecimento de ligações corretas entre cinetocoro-microtúbulo. As pequenas moléculas utilizadas foram disponibilizadas pelo Dr. Victor-Bolanos Garcia, da Oxford Brookes University, baseada na estratégia "Structure-Based Drug Design", no âmbito de um trabalho de colaboração com o nosso grupo de investigação.

2. Interferência com a atividade do "checkpoint" mitótico, através do silenciamento dos genes de Spindly e de Cdc20, como estratégia terapêutica contra o cancro e de modulação da eficácia de agentes anti-mitóticos,

Como foi descrito na secção anterior, vários cancros apresentam uma resistência aosagentes anti-mitóticos que visam os microtúbulos, conseguindo contornar esta paragem e continuar a sua proliferação. Posto isto é importante encontrar alternativas que consigam combater as limitações apresentadas por estes agentes.O uso do "checkpoint" mitótico como alvo terapêutico tem sido proposto como uma nova estratégia plausível para interferir com a proliferação de células cancerígenas, nomeadamente em combinação com os agentes anti-mitóticos.No entanto, são necessários mais estudos para validar esta possibilidade. Deste modo, propões-se como segundo objetivo avaliar o potencial anti-tumoral da interferência com o "checkpoint"

mitótico, através dosilenciamento da Spindly e Cdc20, individualmente e em combinação com o taxol. A proteína Spindly desempenha um papel no estabelecimento das ligações cinetocoro-microtúbulo e no silenciamento do SAC.Assim espera-se que a sua depleção vá originar um fenótipo de acumulação de células mitóticas devido a uma paragem pronunciada das células em mitose.Aproteína Cdc20é responsável pela ativação do APC/C e posterior transição da célula mitóticada metafase para a anafase, interferindo assim com a saída da mitose. A sua depleção leva à inibição do APC/C, originando uma paragem da célula em mitose.

Parte II - Materiais e Métodos

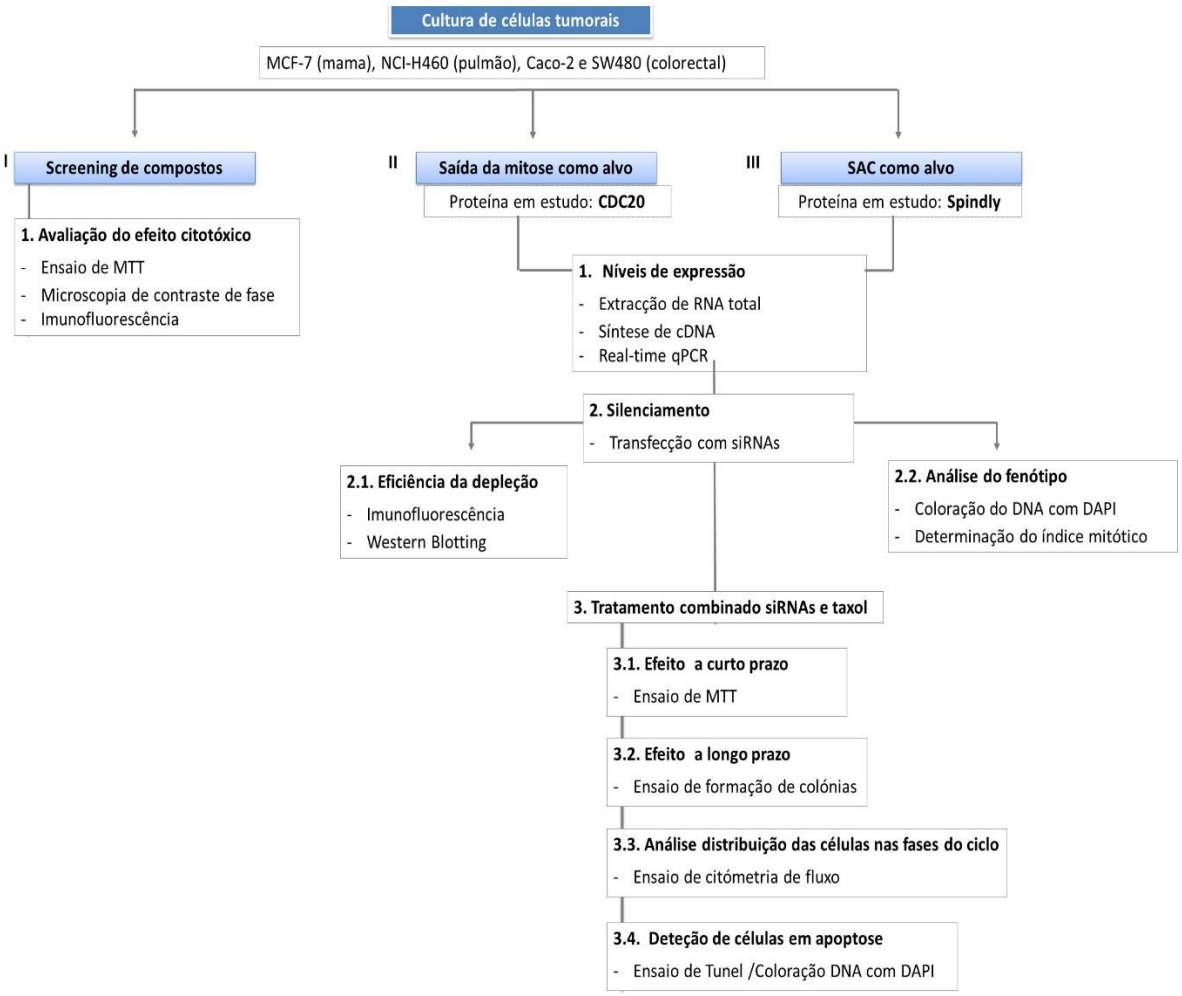


Figura 2. 1 - Representação esquemática do desenho experimental

1 Cultura celular

1.1 Linhas celulares e condições de cultura

Para a realização deste estudo foram utilizadas três linhas celulares tumorais humanas, uma proveniente de cancro da mama,MCF-7, e duas com origem em cancro colo-rectal, Caco-2 e SW480.As linhas celulares foram crescidas em monocamada, em frascos de cultura T25 (25cm^{2}de área, VWR), contendo meio de cultura RPMI-1640 (RoswellPark Memorial Institute, Gibco, Invitrogen)enriquecido este com 5%de soro bovino fetal (FBS superior, Biochrom) para a linha MCF-7 e meio de cultura Dulbecco'sModifiedEagle's Medium(DMEM, Biochrom), enriquecido este com 10%de FBS para as linhasCaco-2 e SW480. As células foram mantidas numa incubadora (Heraeus Hera Cell) a 37°C com 5% CO_2, e em atmosfera húmida.

1.2 Subcultura de células aderentes

O manuseamento das linhas celulares foi realizadosempre numa câmara de segurança biológica nível II, com fluxo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P), sendo esta previamente esterilizada com radiação UV, durante 20 minutos e pulverizada, de seguida, com álcool a 70%. Procedeu-se, semanalmente, à subcultura das células. Comesta finalidade, antes de se iniciar este procedimento, a morfologia das células foi observada num microscópio de contraste de fase invertido (Zeiss Primo Vert).

Inicialmente, o meio de cultura foi removido por aspiração e a monocamada de células, aderidas à base do frasco, lavada comumasolução salina tamponada de PBS1x (27 mM KCl; 1,37 M NaCl; 100 mM Na_2HPO_4; 18 mM KH_2PO_4; pH 7,4). Adicionou-se a proteaseTripsina 1x (Sigma-Aldrich) e colocou-se o frasco na incubadora a 37°C, durante, aproximadamente, 3min, até ser visível ocompleto destacamento das células, através do microscópio de contraste de fase invertido. De modo a parar a açãoenzimática da tripsina, as células foram ressuspensas em3 ml de meio de cultura. Depois de homogeneizada, a suspensão celular foi recolhida para um tubo cónico de 15 ml e a 30µL da suspensão adicionou-se 30µL do corante de exclusão 0,4% (v/v)

TrypanBlue (Sigma-Aldrich), de forma a proceder-se à contagem das células numacâmara de Neubauer. O TrypanBlue permite distinguir as células mortas das células vivas, uma vez que as células mortas apresentam a membrana celular permeável ao corante, adquirindo uma tonalidade azul enquanto as células viáveis permanecem brilhantes. A densidade celular foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Densidade celular } (cells/mL) = \frac{número de células\ vivas}{número\ de\ quadrantes\ (4)} \times factor\ de diluição (2) \times 10^4$$

A partir do valor obtido para a densidade celular, determinou-se o volume da suspensão de células a colocar no novo frasco de cultura, contendo 5 ml de meio, de forma a promover um crescimento exponencial das células.

1.3 Congelamento de células

Com o intuito de manter um stock de células viáveis, com o menor número de passagens possíveis, estas foram previamente congeladas e mantidas emazoto líquido ou a -80°C. Desta forma, o conteúdo de um frasco T25 foi tripsinizado e a suspensão celular centrifugada a 1000 rpm, durante 5 minutos, à temperatura ambiente (HeraeusBiofuge Primo R). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de célulasressuspendidoem meio de culturacontendo 10% (v/v) do agente criopreservante DMSO (Acros Organis). Depois de cuidadosamente homogeneizada, a suspensão foi transferida para umcriotubo(ThermoScientific)devidamente identificado. Este foi colocado, a -80 ˚C, num contentor contendo isopropanol (Nalgene® MrFrosty™ Cryo 1°C FreezingContainer), permitindo que a diminuição da temperatura seja gradual (1˚C por minuto), evitando um choque térmico, que poderia comprometer a viabilidade das células. Após 24 horas, o criotubofoi retirado do contentor de congelação e armazenado em azoto líquido.

1.4 Descongelamento de células

Para se proceder ao descongelamento das células o criotubo foi rapidamente aquecido em banho-maria, a 37°C, até descongelar.Diluiu-se o conteúdo do criotubo em meio de cultura pré-aquecido e a suspensão resultante foi centrifugada a 1000rpm, durante 5 minutos à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado, de forma a remover o DMSO. Adicionou-se 5ml de meio ao sedimento e homogeneizou-se. A suspensão celular foi transferida para um frasco T25 e incubada a 37ºC com 5% de CO_2. As células foram monitorizadas ao longo dos dias para avaliar o crescimento das mesmas.

2 Origem das pequenas moléculas

Neste trabalho foram utilizadas cinco pequenas moléculas (B9, B5, A10, A11 e E5), disponibilizadaspelo Dr. Victor-Bolanos Garcia, da Oxford Brookes University, estando inseridas num processo de "Structure-Based Drug Design".

A atividade citotótxica das moléculas foi avaliada através do ensaio do MTT(conforme descrito abaixo).

3 Tratamento de lamelas com Poli-L-lisina

Com objetivo de evitar a perda significativa de células, principalmente mitóticas, procedeu se ao tratamento de lamelas com Poli-L-lisina, promovendo a adesão das células ao vidro. Primeiramente colocaram-se as lamelas 22x22mm dentro de um gobelé contendo uma solução de HCL 1M e deixou se a incubar a 56 °C, durante 16h. A solução foi arrefecida à temperatura ambiente durante 1heas lamelas lavadas em água destilada 5x e seguidamente 5x com água bidestilada. Mergulharam se as lamelas em Etanol 100% e limparam se com papel uma a uma. Após todas as lamelas se encontrarem limpas estas foram divididas em caixas de petri e cobertas com uma solução 500 µg/ml de Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) incubadas posteriormente durante

1h em agitação. De seguida a solução de Polo-L-lisina foi recolhida e as lamelas foram lavadas 5x em água destilada e 5x em água bidestilada. As lamelas foram novamente colocadas em etanol 100% e limpas individualmente. Por fim todas as lamelas secas foram colocadas dentro de caixas de petri, devidamente identificadas e seladas com parafilm.

4 RNA de interferência e transfeção

$0{,}15x10^6$ e $0{,}2x10^6$células MCF-7 e SW480, respectivamente, foramcultivadas em placas de 6 poços contendo lamelas de 22x22 mm, previamente tratadas com poli-L-lisina, de forma a apresentarem uma confluência de 30%-50% no momento da transfeção. Por poço a transfetar, a mistura da transfeção, contemplou 200µl de meio de cultura, sem FBS, ao qual se adicionou 100nM siSpindly nas células MCF-7 e 40nM siCDC20 para as SW480. O preparado foi homogeneizado recorrendo ao vortex (Heidolph) e ao spin (Bio-Rad). Procedeu se à adição de 2,5 µl do reagente de transfecção INTERFERin siRNA TransfectionReagent (Polyplus) sendo rapidamente homegenizado. O meio de transfeção foi de seguida incubado durante 10 minutos à temperatura ambiente, de forma a promover a formação de micelas lipídicas contendo os siRNA, para posteriormente serem internalizadas pela célula. Durante este período, foi removido e substituído o meio das células, a serem transfetadas, por um meio fresco. Passados 10 minutos adicionou-se gota a gota em cada poço a transfetar, 200µl da mistura, agitando suavemente a placa. As células foram incubadas durante 48h a 37°C com 5% CO_2.

Os siRNAs usados tiveram como objetivo depletar duas proteínas distintas, a Spindly e a Cdc20, através de oligonucleótidos de RNA. Os oligonucleótidos de RNA continham cerca de 20-25 nucleótidos, sendo dirigidos contra a sequência de mRNA alvo. Os siRNAs usados contra as proteínas Spindly e Cdc20 foram obtidos comercialmente (Quiagen FlexiTube) e as concentrações usadas foram otimizadas de forma a potenciar a eficácia do silenciamento. Células controlo foram tratadas com uma sequência de siRNA non-targeting(Quiagen), permitindo garantir que a técnica não interferiu com os resultados obtidos.

5 Índice Mitótico

As células foram cultivadas em poços individuais, sem lamela, a uma densidade de 0,15 x10^6 células/poço (MCF-7)e 0,2x10^6 células/poço (SW480) e em meio completo. Após 24 horas realizou-se a transfeção com siRNA contra a proteína Spindly (siSpindly)a 100 nM (MCF-7) e siRNA contra a proteína Cdc20 (siCdc20) (SW480) e adicionou-se aos poços correspondentes 1µM de nocodazole (Sigma-Aldrich), como controlo positivo. Após 48 horas, foi efectuada a contagem das células no microscópio de contraste de fase(Nikon eclipse TE 2000-U), num total de 1000 células, em 6 campos aleatórios, repetindo para cada cultura testada O índice mitótico (IM) foi determinado pela razão entre o número de células mitóticas e o número total de células (interfásicas e mitóticas) presentes na cultura, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\textbf{IM (índice mitótico)}=\frac{\textbf{Célulasmitóticas}}{\textbf{Célulasinterfásicas+célulasmitóticas}}\textbf{x100}$$

6 Imunofluorescência indirecta

As células foram crescidas e tratadas de acordo com o descrito na transfeção com siRNA. Passadas as 48 horas de incubação, procedeu-se à fixação em 2% (w/v) de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) em PBS1x, durante 12 minutos. De seguida, efectuaram-se 3 lavagens com PBS1x durante 5 minutos cada. Seguiu-se a extração/permeabilização das células com 0,5% Triton X-100 em PBS1x durante 7 minutos. As células permeabilizadas foram lavadas, novamente, 3 vezes em PBS1x durante 5 minutos e bloqueadas com 10% FBS numa solução de PBST (PBS1x com 0,05% Tween 20), durante 30 minutos, à temperatura ambiente, de forma a minimizar reacções inespecíficas. Sem lavar, as células foram incubadas com os anticorpos primários respectivos (tabela 1 caso da Spindly e tabela 2 caso da CDC20), diluídos em 5% de FBS em PBST, durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após serealizarem3 lavagens com PBST durante 5 minutos procedeu-se à incubação com os anticorpos secundários (tabela 1 caso da Spindly e tabela 2 caso da CDC20)durante 60 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. Lavaram-se as células2vezes durante 5

minutos cada, em PBST (1x) e uma última vez em PBS (1x), durante 5 minutos. Por fim montou se as lamelas sobre lâminas de vidro com 2 µg/ml de DAPI (Sigma-Aldrich) diluído em meio de montagem Vectashield (Vector) sendo seladas com verniz após secagem a armazenadas a 4°C até se proceder à observação.As lâminas foram analisadas através de um microscópio de fluorescência AxioObserverZ.1 SD (Carl Zeiss, Germany) acoplado auma câmara AxioCam MR3 e com plano apocromático 63x/NA objectiva 1.4.

Tabela 2. 1 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de imunofluorescência, para comprovar o silenciamento da proteína Spindly.

Anticorpo		Diluição	Empresa
Primários	Rabbitanti-Spindly	1:3000	Sigma
	Humananti-CREST	1:4500	Oferta Elsa Bronze, IBMC, Porto, Portugal
Secundários	Alexa 568 nmanti-human	1:1500	Molecular Probes
	Alexa 488 nmanti- rabbit	1:1500	Molecular Probes

Tabela 2. 2 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de imunofluorescência, para comprovar o silenciamento da proteína Cdc20.

Anticorpo		Diluição	Empresa
Primários	Mouseanti-Cdc20 p55	1:1500	Santa Cruz Biotecnology
	Humananti-CREST	1:4500	Oferta Elsa Bronze, IBMC, Porto, Portugal
Secundários	Alexa 568 nM anti-human	1:1500	Molecular Probes
	Alexa 488 nM anti- mouse	1:1500	Molecular Probes

7 Preparação de lâminas deCytospin

Para evitar a perda significativa de células, especialmente mitóticas, durante o procedimento de imunofluorescência, recorreu-se ao uso prévio da centrifugação de

células por Cytospin. As células, tratadas de acordo com a descrição para a transfeção com siRNA, foram tripsinizadas e a suspensão celular recolhida. Procedeu-se à contagem das células na câmara de Neubauer e para cada condição, efetuaram-se os cálculos de modo a obter-se uma quantidade uniforme de $0,05x10^6$ células/lâmina. Procedeu-se à montagem das lâminas e dos filtros nos citoclips e colocou-se no tambor da citocentrífuga (ThermoScientific, Cytospin 4). Foram aplicadas em cada funil uma quantidade de $0,08x10^6$ células juntamente com uma gota de BSA 3%,para evitar o destacamento e esmagamento das células durante o cytospin. A citocentrifugação foi realizada com uma aceleração média, durante 5 minutos a 800 rpm. Terminada a citocentrifugação as lâminas foram retiradas dos suportes e imediatamente colocadas no fixador, 37 % Formaldeído em PBS1x, durante 20 minutos. De seguida foram lavadas 3x em PBS1x durante 5 minutos cada l. Após as lavagens procedeu se à permeabilização das células com 0,1% Triton x-100 em PBS1x, durante 2 minutos. Seguiram-se, novamente, 3 lavagens em PBS1x durante 5 minutos cada e procedeu-se à imunofluorescência ou coloração do DNA com DAPI.

8 Extração e quantificação de Proteínas

Aextração de proteínas foi realizadaem células controlo e células transfetadas com siRNA.Recolheu-se o meio de cultura, dos poços previamente plaqueados, para tubos de falcons de 15ml. De seguida as células foram tripsinizadas e a suspensão recolhida para um tubo de falcon correspondente, contendo o meio retirado inicialmente. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, durante 5 minutos, numa centrífuga (HeraeusBiofuge Primo R) previamente refrigeradaa 4ºC. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressupenso em 150µl de tampão de lise frio (Tris 50mM pH7,5, NaCl 150mM, EDTA 1mM e Triton x-100 1%) contendo1,5µl de inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, P8340). De seguida a suspensão foi passada várias vezes por uma seringa (19G) de modo a lisar as células, sendo no fim deixadas a repousar no gelo durante 20 minutos. De seguida oslisados celulares foram centrifugados a 13000 rpm, a 4ºC durante 5 minutos. Recolheu-seo sobrenadante e distribuiu-se por diferentes alíquotas para a quantificação de proteínas para a realização do Western Blotting.

A quantificação de proteínas foi realizada recorrendo ao kit "BCA^{tm} Protein Assay Kit" (Thermoscientific), seguindo as instruções do protocolo. Primeiro foi determinado o volume total requerido do reagente de trabalho (RT) através da fórmula:

(# padrão + # amostras) * (# replicados) * (volume do RT por amostra) = Volume de RT total

Após determinação do volume de reagente de trabalho, este foi preparado misturando se 50 partes do BCA reagente A com 1 parte do BCA reagente B (50:1), sendo o reagente B o primeiro a ser adicionado. De seguida adicionou-se 22,5µl da amostra, em replicado, a uma micro placa juntamente com 2,5µl de água e 200µ de reagente de trabalho. Nos poços correspondentes ao "branco" adicionou-se apenas 25µl água e 200µl do reagente de trabalho. Levou-se a placa a agitar durante 30 segundos sendo incubada depois durante 30 minutos a 37ºC. No fim da incubação, foi medida a absorvância a 562nM.

Para a realização do ensaio de Western- Blotting foram utilizadas 20µg dos extractos proteicos em tampão de amostra 6x (2% (m/v) SDS; 80 mM Tris pH 6,8; 10% (v/v) Glicerol; 0,002% (m/v) Azul Bromofenol), contendo inibidores de proteases (Sigma *Coktail*).

8.1 Electroforese em sistema desnaturante - SDS-PAGE/Western Blotting

Primeiramente, os extractos proteicos foram separados por SDS-PAGEsendo posteriormente analisados por Western Blotting. Inicialmente os extractos proteicos foram corridos num gel de gradiente com 10% de poli-acrilamida utilizando um suporte Mini-protean 3 (Bio-RAD). O primeiro gel a ser preparado foi o gel resolvente de 10%. De seguida as amostras foram preparadas em água e de tampão de amostra 6xe fervidas durante 3 minutos com a finalidade de desnaturar as proteínas. De seguida o gel foi colocado dentro de uma tina de electroforese que foi preenchida com o tampão de corrida 1x (Tris 250nM; Glicina 1,92 nM; SDS 1%)adicionou se as amostras aos poços

respetivos assim como o marcador de peso molecular. A separação das amostras foi feita através do aparelho de electroforese (Bio-Rad) com uma corrida de 200volts, 400mA durante aproximadamente 60 minutos. Após terminar a electroforese, procedeu à transferência para uma membrana de nitrocelulose (Whatman-Protan) num um sistema semi-dry (Hoefersemiphor) coberto com tampão de transferência 1x (Tris 250 nM; Glicina 1,92 nM). O sistema foi ligado a um aparelho de transferência (Amershampharmaciabiotech) permitindo a transferência das proteínas para a membrana. A transferência ocorreu a 300 volts, 110 mA durante 1hora e 15 minutos. Terminada a transferência, a membrana foi lavada com Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST – Tris 1M ph 7,5, NaCl 5M, Tween -20 (0,05%) e água destilada). De seguida foi corada com Ponceau S durante 1 minuto, para a visualização das bandas, sendo descorada a seguir em TBST. Procedeu se ao bloqueio da membrana usando TBST com 5% de leite em pó magro (LPM) durante 60 minutos em agitação, à temperatura ambiente. Após o bloqueio a membrana foi lavada 3x com TBST com 1% LPM, durante 5 minutos cada com agitação. De seguida foi incubada com dois anticorpos primários distintos (ver tabela 3 para a spindly e tabela 4 para a CDC20). Após incubação foi novamente lavada 3x em TBST 1% LPM, 5 minutos em agitação e incubada com dois anticorpos secundários (tabela 3 para a spindly e tabela4 para CDC20) durante 60 minutos em agitação. No final da segunda incubação, a membrana foi lavada 2x em TBST 1% LPM e 1x em PBS1x durante 5 minutos, em agitação. Procedeu se à revelação da membrana, na ausência de luz. Inicialmente foi aplicada sob a membrana, uma solução de revelação ECL (Tris 100nM ph 8,5, Ácido Coumárico 90nM, Luminol 250nM e H_2O_2 30%) durante 3 minutos. De seguida, a membrana colocou-se a membrana no interior de uma cassete (Hypercassete-Amersham Biosciences) com uma película por cima e um filme autorradiográfico (Kodak, Sigma) durante diferentes períodos de tempo. Após o tempo de exposição, o filme foi retirado e emerso numa solução de revelação, esperando alguns minutos até ser possível a visualização de bandas. Depois o filme foi passado por água, colocando se por fim numa solução de fixação. Os resultados obtidos foram após revelação, foram scanizados através de um densitómero (Bio-Rad) e analisados pelo software QuantityOne 4.6.1 (Bio –Rad).

Tabela 2. 3 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de Western Blotting, para comprovar o silenciamento da proteína Spindly.

Anticorpo		Diluição	Empresa
Primários	Rabbit anti-α-Spindly	1:3000	Sigma
	Mouse anti-α-tubulin	1:5000	Sigma
Secundários	HRPanti-rabbit	1:1000	Sigma
	HRPanti-mouse	1:1500	Vector

Tabela 2. 4 - Anticorpos primários e secundários usados para a realização da técnica de Western Blotting, para comprovar o silenciamento da proteína Cdc20.

Anticorpo		Diluição	Empresa
Primários	Mouse anti-Cdc20 p55	1:1500	Santa Cruz Biotecnology
	Mouse anti-Actina	1:2500	Santa CruzBiotecnology
Secundários	HRP anti-mouse	1:1500	Vector

9 Extração e quantificação de RNA total

Para se proceder à extração de RNA sem que este fosse degradado, todo o material utilizado era RNase-free, evitando a degradação por RNAses. Primeiramente, o meio de cultura foi removido por aspiração do frasco T25,as células foram lavadascom PBS1x e tripsinizadas. A suspensão celular foi ressuspendidaem3 ml de meio ecentrifugou-se durante 5min, a 1000rpm, a 4ºC. Descartou-se o meio de cultura e adicionou-se rapidamente 1ml do reagente PureZOL(BioRad). O lisado foi deixado a incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos, permitindo a dissociação completa dos complexos proteicos nucleares. Adicionou-se de seguida 200µl de Clorofórmio (Sigma) e agitou-se durante 15 segundos e deixou-se a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente, com agitação intervalada. Recorrendo a uma centrifugação a 12000 rpm durante 15 minutos a 4ºC, foi possível distinguir três fases (a fase aquosa, a interfase e a fase orgânica). Recolheu-se a fase mais à superfície (fase aquosa) para um tubo livre de RNAses, sem perturbar a interfase. De seguida adicionou-se 500µl de Álcool

Isopropílico à fase recolhida (aquosa), agitou-se com cuidado e deixou-se durante 5 minutos a repousar, à temperatura ambiente. Centrifugou-se de novo a 12000 rmp durante 10 minutos, a 4ºC. Após a centrifugação, foi possível visualizar um sedimento correspondente ao RNA isolado. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 1 ml de Etanol a 75%. Realizou-se uma última centrifugação, a 7500 rpm durante 5 minutos, a 4ºC. No final da centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante e deixou-se o sedimento a secar aproximadamente 10 minutos. Por fim o sedimento foi solubilizado em 20µl de água livre de RNAses e incubado a 4ºC *overnight*. No dia seguinte o RNA isolado foi dividido em alíquotas, armazenadas a -20ºC.

Para determinar a concentração do RNA (ng/µl) extraído, efectuou-se uma medição da densidade óptica a 260nm, recorrendo ao espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific). Para verificar a integridade do RNA extraído, correram-se as diferentes amostras obtidas num gel a 1% (m/v) de Agarose (nzytech) em TAE (1x) e observou-se o gel no transiluminador (BioRad).

9.1 Desenho de Primers

O desenho dos *primers* foi feitoatravés de programas bioinformáticos específicos – *Beacon Designer* versão 7.2 e *PerlPrimer*versão 1.1.14 (Tabela 2) e sintetizados pela empresa STABvida (Oeiras, Portugal). A escolha dos *primers* (*Forward e Reverse*)a utilizar para a amplificação dos genes pretendidos é um parâmetro essencial para que se obtenhauma máxima eficiência de reacção, para tal foi tido em conta a satisfação de certos parâmetros(Marshall, 2004):

- Os *primers* possuíssem um tamanho compreendido entre 18-25 bases, a quantidade de guaninas e citosinas (G/C) entre os 45-55%;
- As temperaturas de fusão dos pares de *primers* fossem a mais próxima possível e compreendida entre 50ºC e 70ºC;
- O tamanho dos fragmentos a amplificar de 80-200bp;
- Preferência em*primers* que se localizassem na junção de exões de modo a evitar a amplificação do ADN genómico.

Também realizou-se um "blast" contra o genoma humano para verificar a especificidade da sequência dos primers usados.

Após a escolha dos *primers*, estes foram diluídos para uma concentração final de 10 µM e para cada par realizou-se um PCR utilizando como *template* o RNA total extraído de células HeLa, com a intuito de confirmar a especificidade e temperatura de emparelhamento dos *primers*, bem como a inexistência de amplificação de ADN genómico.

Tabela 2. 5 - Sequência oligonucleotídica dos *primers* utilizadospara a amplificação dos genes Actina, Spindly e CDC20.

Gene	*Primer*	Sequência de Oligonucleótidos
Actina	Forward	5'-AATCTGGCACCACACCTTCTA-3'
	Reverse	5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'
Spindly	Forward	5'- CTC AA GAG GCT GAA GAG-3'
	Reverse	5'- TGT TCA TAA CTC TCA GTC ATG-3'
CD20	Forward	5'-CCAGAGGGTTATCAGAACAG-3'
	Reverse	5'-CCACAAGGTTCAGGTAATAGT-3'

9.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA, foi realizada a partir do RNA total extraído anteriormente, recorrendo ao kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (nzy tech).

A mistura de reação foi composta por 10µl de NZYRT 2xMaster Mix, 2µl de NZYRT Enzyme Mix, 1µg de RNA e água DEPC-treated até perfazer um volume total de 20µl. O programa de PCR compreendeu 10 minutos a 25ºC, 30 minutos a 50ºC e 5 minutos a 85ºC. De seguida colocaram se as amostras no gelo durante 5 minutos e adicioniu-se 1µl de NZY RNase H (*E.Coli*) e incubou-se durante 20 minutos a 37ºC. Após concluída a síntese de cDNA, as amostras foram armazenadas a -20ºC.

9.3 PCR quantitativo em tempo real

Para a realização do PCR quantitativo em tempo real, as reações foram preparadas seguindo o protocolo do kit*iQ*^{TM}SYBR *Green Supermix* (BioRad), utilizando-se um volume final de 25µl. Efectuou-se uma diluição de 1:10 do cDNA sintetizado e amplificou-se através do aparelho *iQThermalCycler* (BioRad). De seguida realizou-se uma análise em triplicado de cada um dos genes (CDC20eActina) e efectuou-se também uma reação como controlo negativo de amplificação para cada *primer*(*Non Template Control*- NTC) onde se substituiu o cDNA por água. Tendo em conta que o gene Actina é expresso constitutivamente de igual forma em todas as células, este foi utilizado como gene de referência (*housekepping*gene) para normalizar os níveis de expressão dos restantes genes.

10 Ensaio do MTT

Com finalidade de determinar a viabilidade celular após a depleção das proteínas Spindly e Cdc20 em combinação com o paclitaxel, plaquearam-se antecipadamente 0,15 x10^6 células/poço (MCF-7) e 0,2x10^6 células/poço (SW480) em dois poços individuais, para cada linha e incubadas durante 24h, a 37°C com 5% de CO_2. Após o período de incubação,um dos poços foi primeiramente transfectado com siRNA correspondente à linha. Passadas 24 horas, os poços foram tripsinizados e plaqueados de seguida 0,005x10^6 células numa placa de 96 poços. Após 24h foi adicionado à placa um agente denominado Paclitaxel (sigma) em diferentes concentrações,sendo incubada de seguida por 48h. Concluída a incubação, foi aspirado o meio de toda a placa e substituído por 200µl/poço de RPMI/DMEM sem FBS e de seguida 20µl/poço de MTT (Solução MTT 5mg/ml PBS1x, Sigma). A placa foi incubada por 4h a uma temperatura de 37° C com 5% CO2. Passadas as 4h, procedeu-se à sua solubilização com 100µl/poço de uma solução detergente (Isopropanol,Triton x-100 e HCL 37%). De seguida a placa foi colocada num agitador durante 10 minutos e deixada a incubar por 2h, na ausência de luz à temperatura ambiente. Para finalizar foi medida a absorvânciada placa, a 570nm num leitor de placas (BiotekSynergy 2) através do programa Gen5 1.07.

11 Ensaio de formação de colónias

Com objectivo de determinar a capacidade das células de formar colónias,foi realizado um ensaio que permite determinar o número de colónias formado a longo prazo. Primeiramente plaquearam-se antecipadamente 0,15 $x10^6$ células/poço (MCF-7) e $0,2x10^6$ células/poço (SW480) em dois poços individuais, para cada linha e incubadas durante 24h, a 37°C com 5% de CO_2. Após o período de incubação,um dos poços foi primeiramente transfectado com siRNA correspondente à linha. Passadas 24 horas, os poços foram tripsinizados e plaqueadas de seguida$0,0045x10^6$ células (MCF-7) e $0,0045x10^6$ células (SW480), numa placa de 6 poços.Após 24h foi adicionado à placa um agente denominado Paclitaxel (sigma) em diferentes concentrações, sendo incubada de seguida por 48h no caso do MTT e durante 8 dias (MCF-7) e 10 dias (SW480) para o ensaio de colónias, a 37°C com 5% CO_2. Finalizados os dias de incubação, as células foram fixadas com PFA 3,7% durante 5 minutos e de seguida coradas com cristal violeta (Merck) em água destilada durante 20 minutos. Procedeu-se à lavagemdos poços com água destilada. Por fim foram tiradas fotos às colónias formadas através densitómero (Bio-Rad) e analisadas pelo software QuantityOne 4.6.1 (Bio –Rad).

12 Ensaio de TUNEL (TdT-mediated dUTP-TMR Nick End Labeling)

Com o intuito de detectar se depleção das proteínas Spindly e sua combinação com o taxol, resultava em morte celular por apoptose, foi realizado um ensaio de TUNEL, que permitiu detetar células em apoptose através da fragmentação do DNA. Inicialmente for plaqueadas células MCF-7 em seis poços diferentes, correspondendo ao controlo positivo e negativo, siSpindly, taxol a 4nM e a combinação da depleção com o taxol 4nM. Após 72h da transfeção com siRNA e 48h da adição do taxol, as células foram tripsinizadas e procedeu-se à realização do citospin. Após o citospin as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 10 minutos. De seguida, lavou-se as células duas vezes em PBS1x, durante 5 minutos. Após as lavagens, procedeu-se a permeabilização das células com 0,2% Triton X-100 em PBS1x durante 5 minutos. As células permeabilizadas foram lavadas, novamente, 2 vezes em PBS1x durante 5 minutos. Procedeu-se ao tratamento de cada amostra, com recurso ao Kit TUNEL

(Promega) DeadEnd™ FluorometricTunel System. Inicialmente foi tratada a amostra correspondente ao controlo positivo, onde se adicionou 100µl de Tampão DNAse I durante 5 minutos. De seguida foi adicionada tampão DNAse I contendo 5,5/10 unidades/ml de DNAse I, durante 10 minutos. Por fim foi removido o excesso da lâmina e lavou-se as células 3 a 4 vezes com água ultra pura. Após tratadas as células controlo positivo com DNAses, com o intuito de quebras as ligações do DNA, foram tratadas de seguida todas as amostras, separando as amostras do controlo positivo e do controlo negativo. Primeiramente foi removido o excesso de líquido das lâminas e cobriram-se as células com 10µl de tampão de equilíbrio, durante 10 minutos. Enquanto as células se encontravam no tampão de equilíbrio, preparou-se um tampão de incubação rTdT de acordo com a tabela 6 para as amostras e para o controlo positivo e segundo a tabela 7 para o controlo negativo.

Tabela 2. 6 - Componentes do tampão para amostras e controlo positivo.

Componentes do tampão	**Volume para um total de 50µl**	**Número de reacções**	**Volume dos componentes**
Equilibrqation buffer	45µl	2	90µl
Nucleotide Mix	5µl	2	10µl
rTdT	1µl	2	2µl

Tabela 2. 7 - Componentes do tampão para o controlo negativo.

Componentes do tampão	Volume para um total de 50µl	Número de reacções	Volume dos componentes
Equilibrqation buffer	45µl	2	45µl
Nucleotide Mix	5µl	2	5µl
Água ultra pura	1µl	1	1µl

Tendo emconta que as células se encontravam concentradas no centro da lâmina após o citospin as quantidades usadas para a realização do tampão de incubação foram diminuídas. Adicionou-se 10µl de tampão de equilíbrio, 4µl de Nucleotide Mix e 1µl de rTdT no caso das amostras e controlo positivo, para o controlo negativo, o rTdT foi substituído por 1µl de água ultra pura autoclavada. De seguida removeu se cuidadosamente o excesso de tampão de equilibrou e as lâminas foram colocadas numa câmara húmida, coberta por alumínio e adicionou-se o tampão de incubação durante 60 minutos, a 37ºC. Antes de terminar o período de incubação das células, foi diluído SSC20x em água ultrapura, obtendo assim SSC2x. Após os 60 minutos, a reação foi terminada mergulhando as células na solução SSC 2x por 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida lavou-se as células 3 vezes em PBS1x, 5 minutos cada lavagem. Após as lavagens as lâminas foram montadas em Vectashield+ DAPI. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência.

13 Análise e tratamento de imagens

As imagens de fluorescência foram adquiridas num microscópio confocal Spinning Disc AxioObserver Z.1 SD (Carl Zeiss, Germany) acoplado a uma câmara AxioCam MR3, deconvulsionadas com recurso ao *software* AxioVision 4.8.2, projetadas utilizando o *software* ImageJ versão 1.44 e processadas no programa

PhotoShop CS5 (Adobe Microsystems, CA). A maior parte das imagens foi adquirida utilizando a objetiva apocromática 63x. Para cada imagem, foram apresentados planos representativos, adquiridos com *Z-stacks*, com espaçamento de 0,4 μm, que demonstram o máximo da intensidade de projeção. As imagens de contraste de fase foram adquiridas com a objetiva de 10x, num microscópio de fluorescência Nikon TE 2000U, equipado com uma câmara digital DXM1200F e controlado pelo *software* Nikon ACT-1 (Melville, NY).

14 Análise estatística dos resultados

A análise dos resultados foi realizada recorrendo à probabilidade associada ao teste t-Student. Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significativos para umgrau de confiança de 95% e os de $p<0.01$, para um grau de confiança de 99%.

Parte III – Resultados

1 Avaliação do potencial inibidor de pequenas moléculas contra a proteína BubR1

A BubR1é uma proteína cinase com dupla função, desempenhando um importante papel quer no "checkpoint" mitótico fazendo parte do complexo MCC impedindo a transição de metafase para anafase, quer no estabelecimento de ligações corretasentre os cinetocoros e os microtúbulos do fuso mitótico(38). Estudos de expressão de componentes do SAC revelaram uma sobre-expressão da BubR1 em vários tipos de tumores sólidos, nomeadamente no cancro hepático, gástrico, oral e colo-rectal, tornando esta proteína com potencial terapêutico promissor(39-42). Assim no presente trabalho fomos avaliar a capacidade de pequenas moléculas em inibir a proteína BubR1, com base na sua estrutura. As pequenas moléculas utilizadas (B9, B5, A10, A11 e E5) foram disponibilizadaspelo Dr. Victor-Bolanos Garcia, da Oxford Brookes University, baseada no processo "Structure-Based Drug Design".

1.2.1 Análise da viabilidade celular

Com o intuito de testar o efeito citotóxico de cinco compostos, em células Hela, recorreu-se à técnica de MTT que permitiu avaliar a % de viabilidade celular após 48h da adição dos compostos. Para cada composto foram testadas cinco concentrações diferentes, sendo a mais baixa de 37,5 µM e a mais alta de 600µM. De seguida apresenta-se o gráfico de viabilidade obtido para cada composto.

Analisadas as viabilidades celulares dos compostos, verificou-se que das cinco pequenas moléculas testadas, a molécula E5 foi a que demonstrou ter um maior efeito sobre a viabilidade celular (Gráfico 3.5). Verificou-se que após a adição da menor concentração do composto E5 (37,5µM) ocorreu um decréscimo de aproximadamente 40% da viabilidade celular, obtendo uma relação dose-efeito com o aumento da concentração até 600µM em que observou-se um decréscimo de aproximadamente 80% da viabilidade celular. Seguida a análise destes resultados, optou-se por analisar o

fenótipo das células, após a incubação com o composto E5 a diferentes concentrações, visto ter apresentado os melhores resultados de todos os compostos analisados.

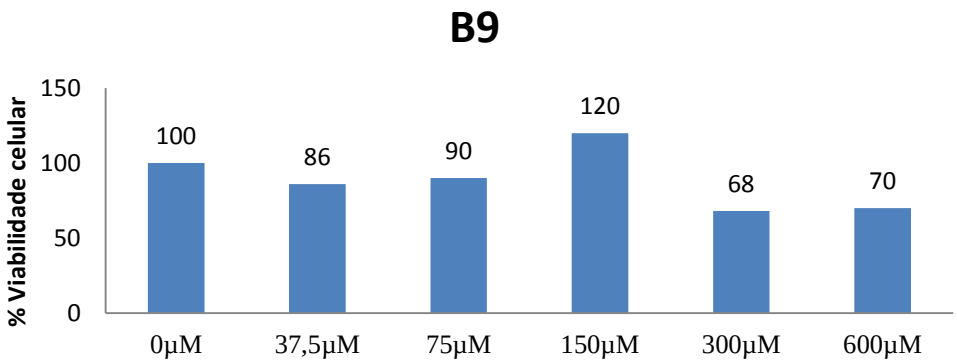


Gráfico 3. 1 - Viabilidade celular após adição do composto B9

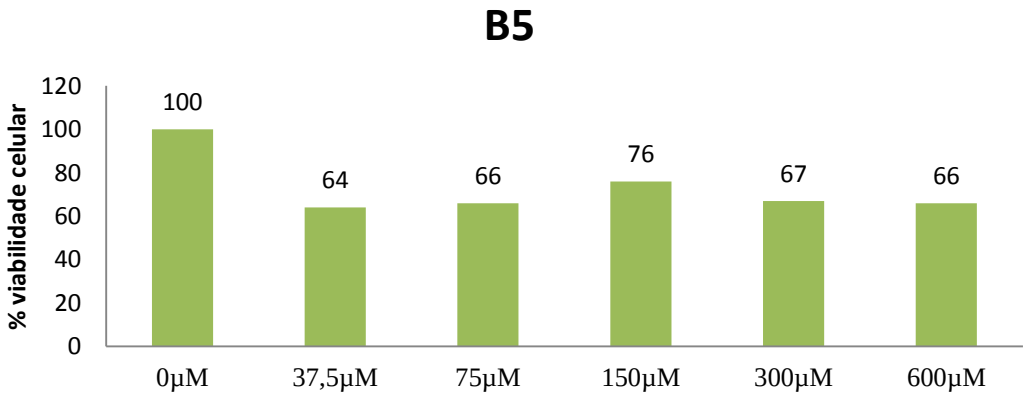


Gráfico 3. 2 - Viabilidade celular após adição do composto B5

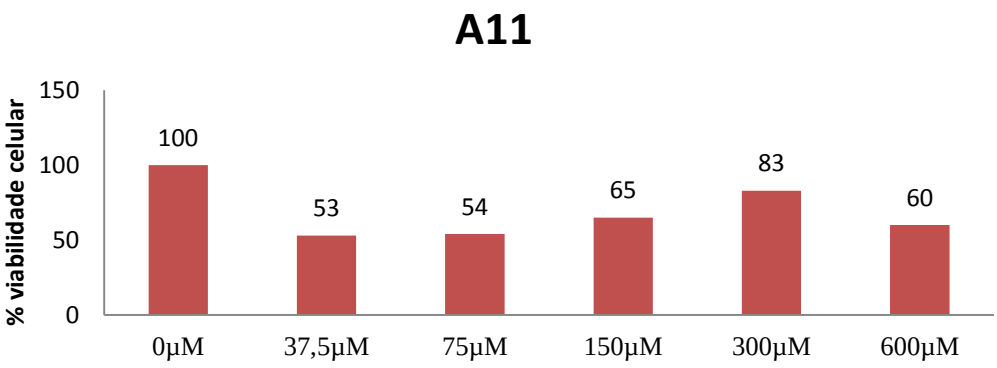


Gráfico 3. 3 - Viabilidade celular após adição do composto A11

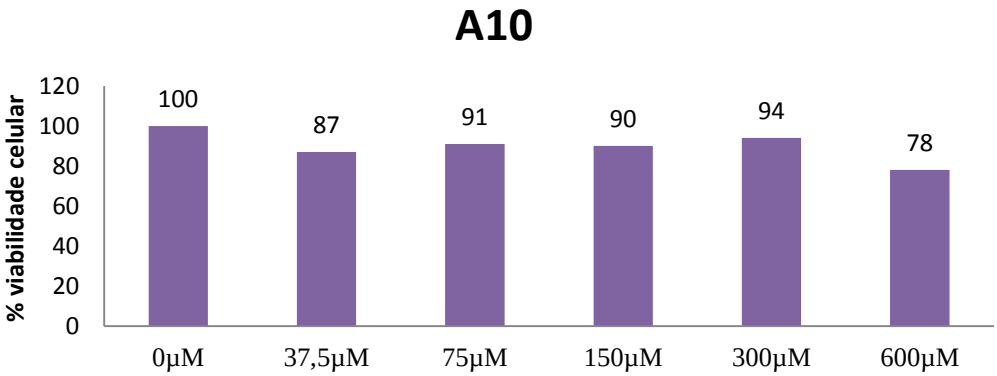


Gráfico 3. 4 - Viabilidade celular após adição do composto A10

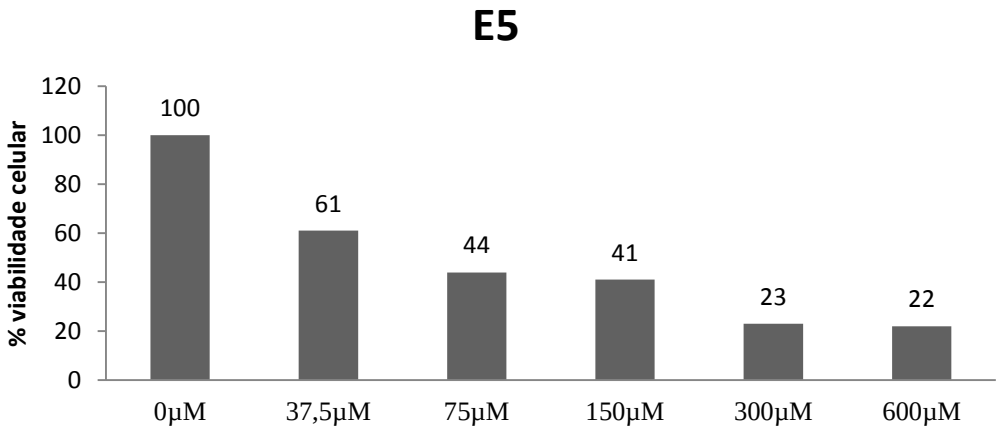


Gráfico 3. 5 - Viabilidade celular após adição do composto E5

1.2.2 Caracterização do mecanismo de ação do composto E5 e da sua relação com BubR1

Inicialmente, para analisar o fenótipo das células, incubou-se uma cultura de células HeLa com o composto E5 nas concentrações de 150µM e 300µM. Estas concentrações foram escolhidas visto ser aquele que apresentava um maior efeito.Através de microscopia de contraste de fase foi avaliado o fenótipo após incubação do composto, por comparação com culturas controlo ou tratadas com DMSO.

Observou-se que após a incubação com o composto, é possível detetar uma acumulação das células em mitose, sendo esta paragem mais evidente quando usada a concentração de 300µM (Figura 3.1).

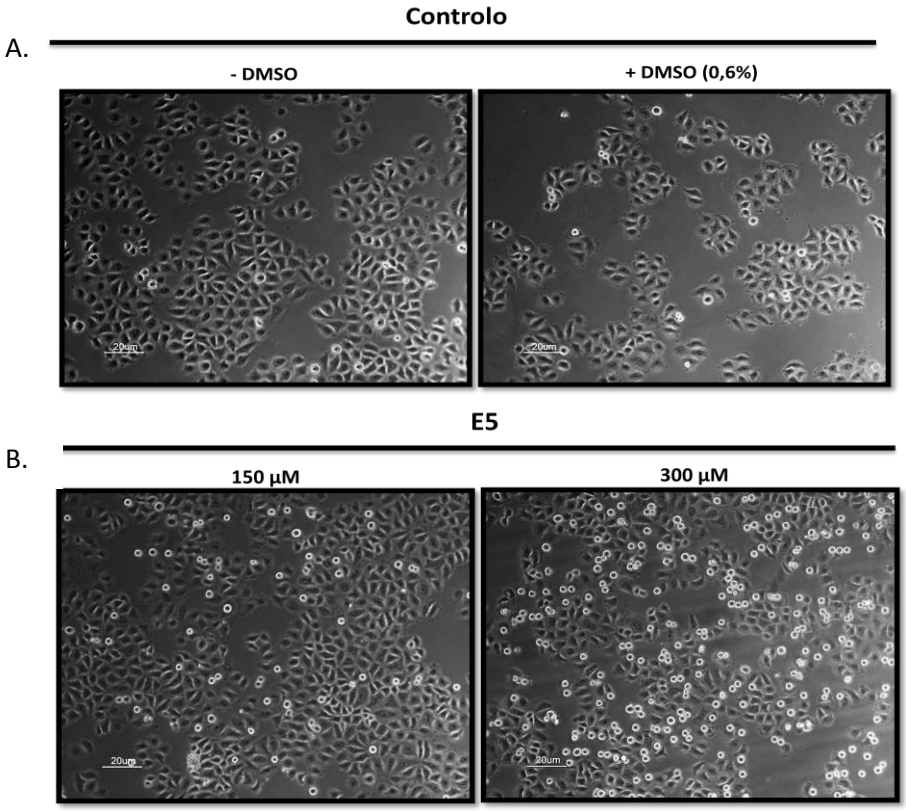
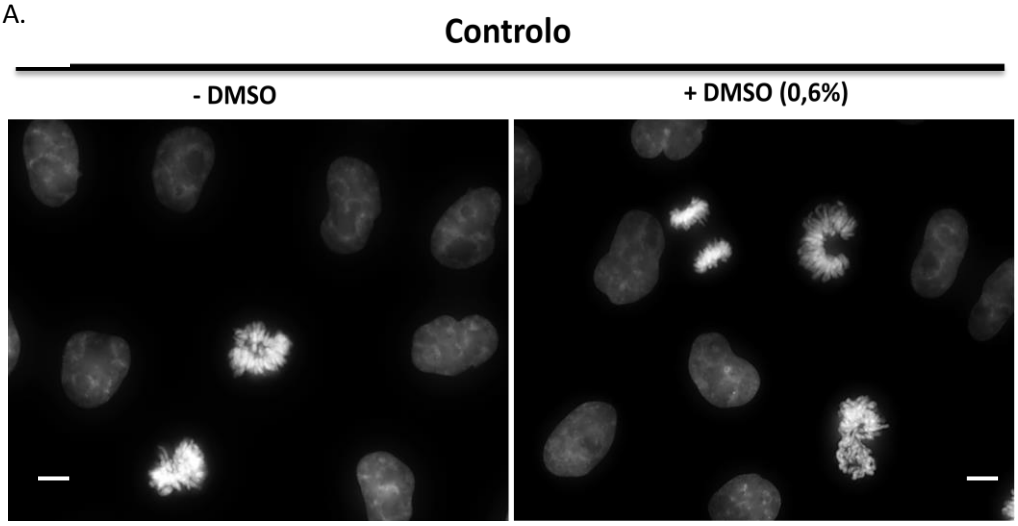


Figura 3. 1 - Fotos de microscopia de contraste de fase de células HeLa tratadas com o composto E5
Imagens de microscopia de contraste de fase de células controlo sem DMSO (- DMSO) e controlo com DMSO (+ DMSO (0,6%)) usadas como controlo de citotoxicidade (A). Células tratadas com composto E5 a150µM e 300µM, mostrando uma acumulação das células em mitose (células redondas) após 24h de incubação (B).

De seguida realizou-se um ensaio em que o DNA das células foi marcado com DAPI, permitindo assim observaros cromossomas condensados para confirmar a acumulação em mitose bem como para detetar anomalias no processo da mitose. Foi comparado o efeito do composto nas concentrações de 150µM e 300µM com as células controlo não tratadas, na presença e ausência de DMSO.

A marcação das células com DAPI revelou que após 24h de incubação com o composto, muitas células apresentavam cromossomas condensados, confirmando assim a acumulação das células mitóticas observadas por microscopia de contraste de fase. Em mesmo tempo verificou-se que a maioria destas células mitóticas apresentava cromossomas desalinhos relativamente a placa metafásica. Este efeito era mais visível a concentração de 300µM (Figura 3.2). A presença de cromossomas desalinhados coincide com o papel da BubR1 na estabilidade das ligações cinetocoro-microtúbulos. Assim é provável que o composto esteja a inibir esta proteína cinase. No entanto, a acumulação das células em mitose é inesperada para uma proteína envolvida no SAC. Pelo contrário, a inibição de BubR1 deveria promover a saída prematura da mitose e não a acumulação em mitose.

A.



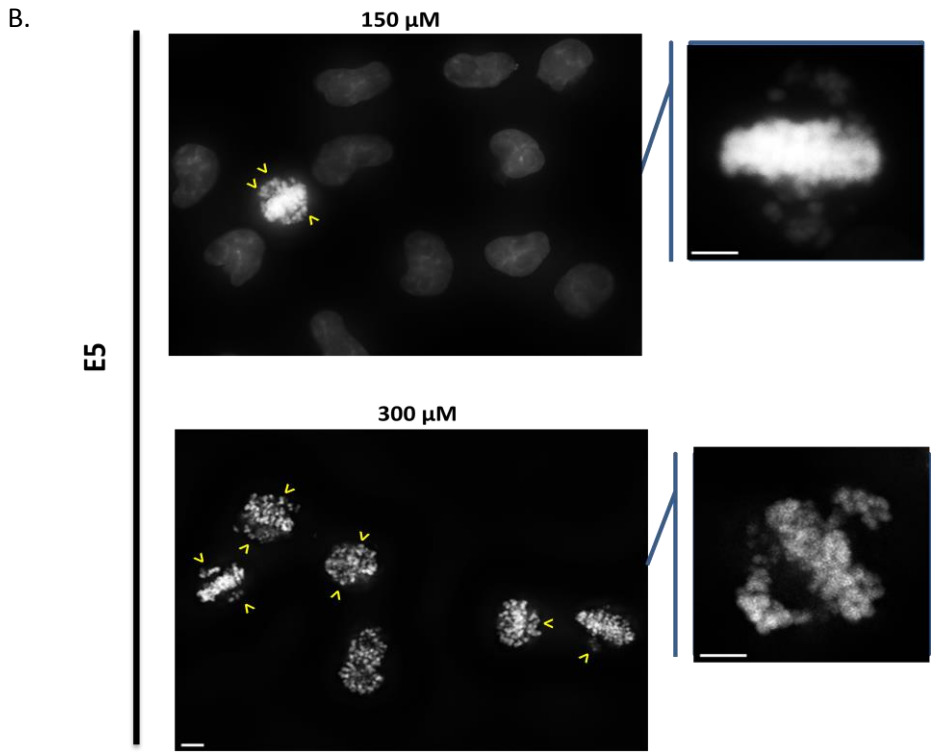


Figura 3. 2 - Células HeLa marcadas com DAPI, tratadas com o composto E5 (150µM e 300µM)
Controlo sem DMSO (- DMSO) e controlo com DMSO (+ DMSO (0,6%)) usadas como controlo de citotoxicidade (A). As células marcadas com DAPI, tratadas com o composto E5 mostram células mitóticas com cromossomas desalinhas (cabeça de seta amarelas), 24h após de incubação com o composto (B).Bar, 5 µm

Tendo em conta os resultados do fénotipo após a marcação com DAPI, foi realizado um ensaio de imunofluorescência na cultura de células HeLa, após a incubação com o composto a 300µM, recorrendo à utilização de anticorpos primários contra a proteína BuBR1 (verde) e contra proteína CREST (vermelho), usada com marcador dos cinetocoros. Os resultados obtidos mostram que após a marcação da proteína BubR1 nas células controlo, verifica-se que em prometafase é evidente a presença da proteína nos cinetocoros. Quando a célula se encontra em metafase a marcação da proteína não é detetada, visto que os cromossomas se encontram alinhados no plano equatorial. Após a adição do composto E5, a célula apresenta os cromossomas desalinhados no entanto a marcação da proteínaBubR1 é detetável, demonstrando que possivelmente a incubação do composto não interfere com a localização da proteína

BubR1 nos cinetocoros, estando presente a proteína nas células mesmo após incubação com E5 (Figura 3.3). Este resultado sugere que o composto E5 estaria a inibir a atividade ou interferir com a estrutura da BubR1 sem no entanto afetar a sua localização no cinetocoro. Assim, é possível que o composto esteja a inibir a função da BubR1 na ligação cinetocoro-microtúbulos sem afetar a sua função no SAC. Tal explicaria a presença de cromossomas desalinhados e a acumulação das células em mitose.

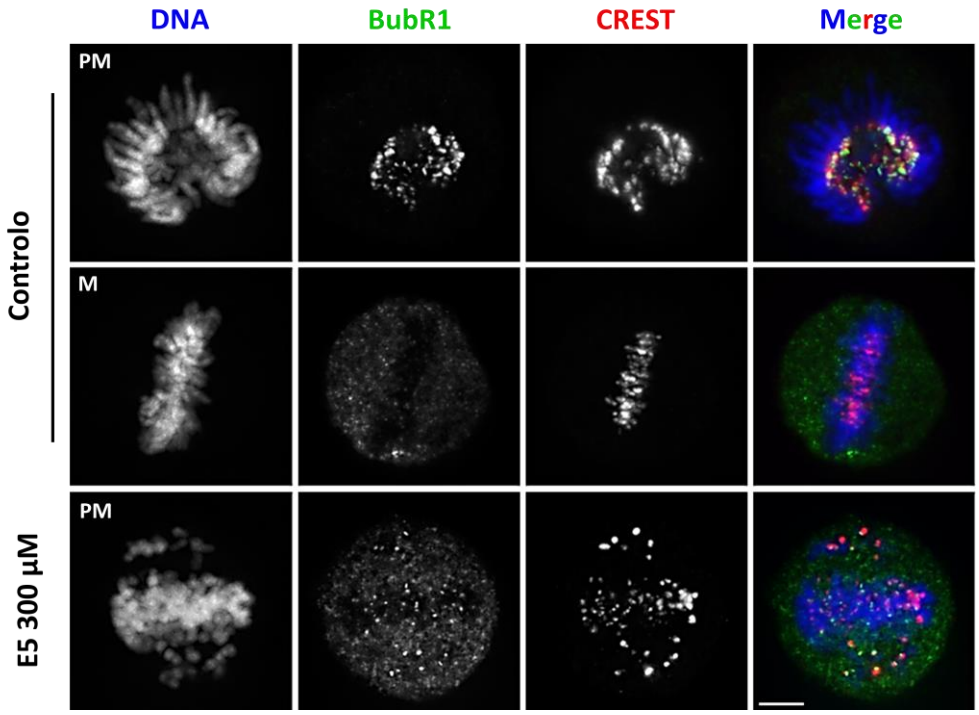


Figura 3. 3 - Fénotipo das células HeLa resultante da incubação com o composto E5 (300µM)
As células foram tratadas incubadas com o composto E5 a 300µM durante 24h, de seguida foram marcadas com um anticorpo anti- BubR1 e anti-CREST (marcador de cinetocoros). O DNA foi marcado com DAPI. Foram usadas células sem qualquer tratamento como controlo. PM= prometafase; M= metafase. Bar, 5µM. A incubação do composto em células HeLa, não demonstra interferir com a localização da proteína BubR1 nos cinetocoros. Bar, 5 µm

2 Avaliação do efeito anti-proliferativo dadepleção da proteína Spindly e da combinação com Taxol

Aproteína Spindly desempenha um papel muito importante na ligação dos cinetocoros aos microtúbulos, como foi descrito anteriormente. Assim esta

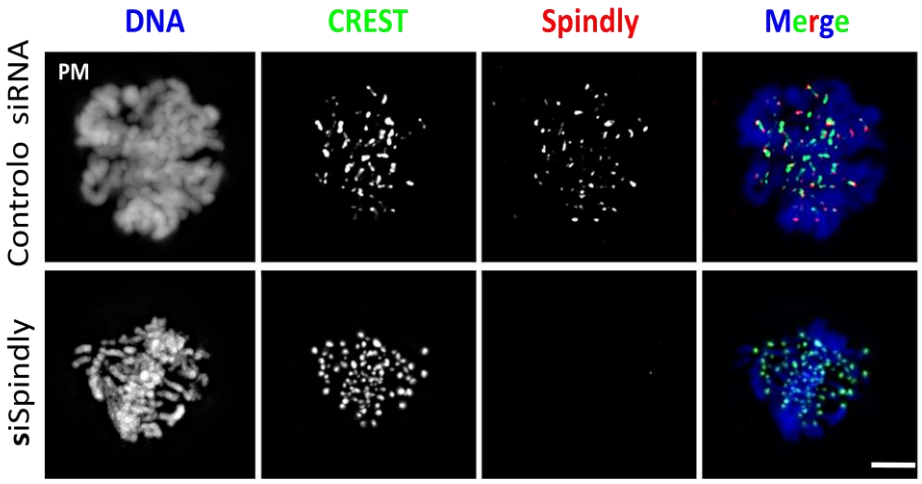
proteínapoderá ser um novo alvo para interferir com o silenciamento do “checkpoint” e provocar a paragem das células em mitose.Propõe-se então verificar esta possibilidade bem como a capacidade da depleção da Spindly em potenciar o efeito do taxol num tratamento combinado.

2.1 Eficiência da depleção da proteína Spindly

Com o intuito de verificar a eficiência da depleção da proteína spindly foi realizada a técnica de imunofluorescência, 48h após a transfeção contra a spindly.Através da observação das células MCF-7 controlo ao microscópio de fluorescência, verificou-se a presença da proteína Spindly nos cinetocoros durante a prometafase, usando como controlo da posição dos cinetocoros a proteína CREST.A observação das células transfetadas com siSpindly não mostrou qualquer marcação para a proteína Spindly, comprovando a eficiência do silenciamento da Spindly (Figura 3.4 A).

A depleção da proteína Spindly foi analisada também por Western Blotting. Foram usados a extractos proteicos extraídos 48h após a transfeção com siRNA. Utilizaram-se anticorpos anti-Spindly e anti-α-tubulina. O anticorpo contra a tubulina foi para comprar as bandas obtidas no controlo e em siSpindly, representando um usado controlo da quantidade de amostra. Verificou-se a presença de uma banda nas células controlo, correspondente à proteína Spindly (70kDA) e estando ausente nas células transfetadas. Concluída a análise dos resultados da imunofluorescência e do Western Blotting demonstrou-se que o silenciamento da proteína Spindly foi eficiente (Figura 3.4 B).

A.



B.

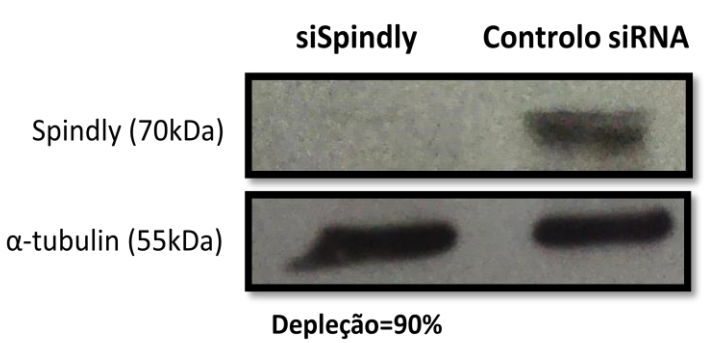


Figura 3. 4 - Eficiência da depleção da proteína Spindly

Imagens de imunofluorescência, de células MCF-7 em prometafase, marcadas com os anticorpos anti-Spindly (vermelho) e anti-CREST (verde), demonstrando a ausência da proteína Spindly nos cinetocoros após a transfeção com RNAi. Bar, 5 µm (A). A eficiência da depleção da proteína Spindly foi também demonstrada através da técnica de Western Blotting. Imunoblots de extractos proteicos isolados previamente e após a transfecção da linha celular MCF-7, demonstrando a depleção em 90% da proteína Spindly (siSpindly) em comparação ao controlo (Controlo siRNA), com a α-tubulina actuando como loading control (B).

2.2 Fénotipo resultante da depleção da proteína Spindly

Após comprovada a depleção, fomos analisar o fenótipo das células resultante da depleção da proteína Spindly. As células foram marcadas com DAPI, permitindo ver o DNA das células 48h após a transfeção com siSpindly, comparando com o controlo.

Através da marcação do DNA é possível verificar que após a depleção da proteína Spindly as células exibem um fenótipo de desalinhamento, observando-se um aumento de células mitóticas e maioria com cromossomas desalinhados (Figura 3.5).

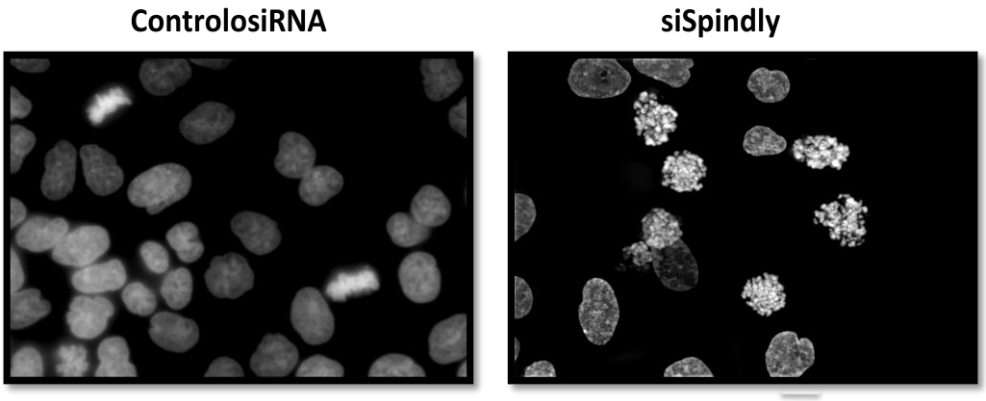


Figura 3. 5 - Fenótipo resultante da depleção da proteína Spindly, por RNAi, na linha celular MCF-7
Imagens de células controlo e células 48h após a transfeção com siSpindly, marcadas com DAPI, mostrando que após a depleção da Spindly se verificam células mitóticas com cromossomas desalinhados.

Por microscopia de contraste de fase foi também possível observar uma acumulação de células mitóticas, 48h após a transfeção com siSpindly comparando com as células controlo. (Figura 3.6, A) De seguida procedeu-se à contagem Após a determinação do índice mitótico, verificou-se que a depleção de Spindly apresenta um índice mitótico elevado de 43%, com a mesma tendência que o efeito do Nocodozole (63%), comparativamente com as células controlo, confirmando assim o fenótipo de paragem em mitose causado pela depleção da Spindly (Figura 3.6 B).Este fenótipo está de acordo com o esperado para a depleção da Spindly, comprovando a eficiência e a especificidade dos siRNAs usados.

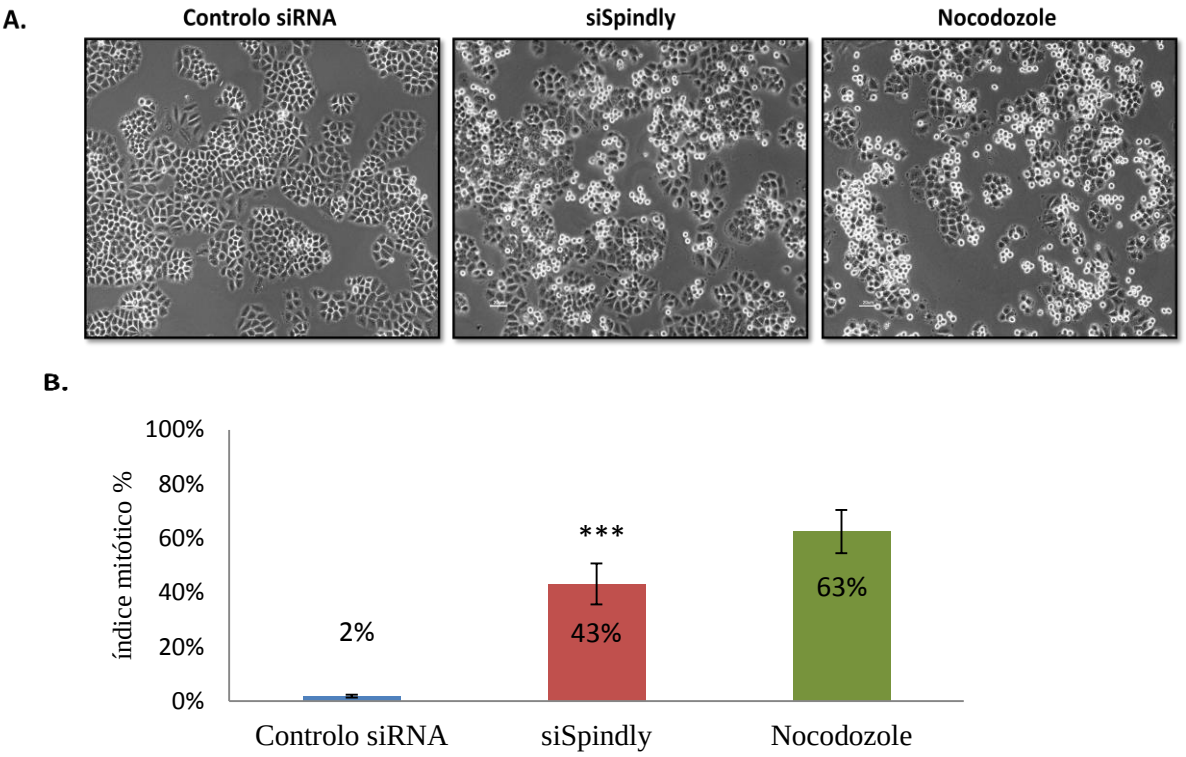


Figura 3. 6 - Índice mitótico resultante da depleção da proteína Spindly, comprando com células controlo e células com adição de Nocodozole

Índice mitótico, nas culturas controlo e transfectada com siSpindly. (A) Imagens de contaste de fase mostrando uma acumulação de células mitóticas após a depleção da proteína Spindly, em comparação às células controlo. Acumulação em mitose nas células transfetadas assemelha-se mais à cultura de células com a adição do nocodozole. (B) Os valores obtidos demonstram uma maior acumulação de células em mitose nas células tratadas com siSpindly, comparativamente ao controlo. As percentagens obtidas representam a média aritmética ± desvio padrão de três experiências independentes. ***p<0,001

2.3 Efeito anti-proliferativo da depleção da Spindly e da combinação com Taxol

Nesta secção, pretendeu-se analisara viabilidade celular a curto prazo e a proliferação a longo prazo, resultante da depleção da proteína Spindly, individualmente e em combinação com o taxol a diferentes concentrações.

2.3.1 Efeito anti-proliferativo a curto prazo

Através da técnica de MTT foi possível avaliar a viabilidade celular 96h após transfeção com siSpindly e 48h após a adição do taxol. Foram usadas três concentrações diferentes de taxol (2nM;4nM e 10nM), próximas das doses terapêuticas em uso no tratamento do cancro da mama(43).

Verificou-se que a viabilidade das células transfetadas com siSpindly decresce significativamente quando comparando com as células controlo (0 nM taxol). No entanto, a viabilidade apresentada pelas células transfetadas em combinação com as diferentes concentrações de taxol, não sofreu efeito cumulativo em nenhuma das combinações testadas quando comparadas com o efeito singular do siSpindly (Gráfico3.7).Isto sugere que a curto prazo, a simples depleção da Spindly tem um efeito anti-proliferativo superior ao das doses de taxol testadas e que a combinação não resulta num efeito cumulativo detetável.

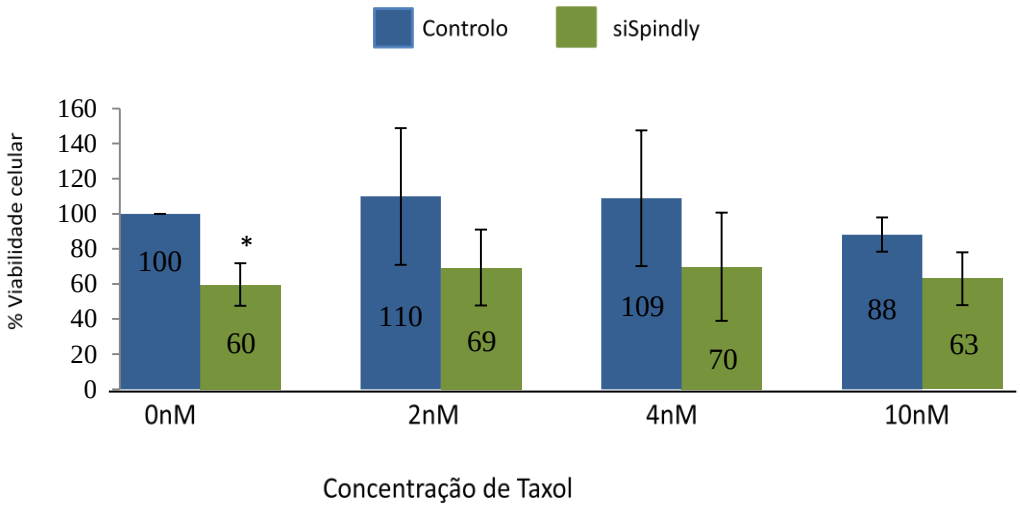


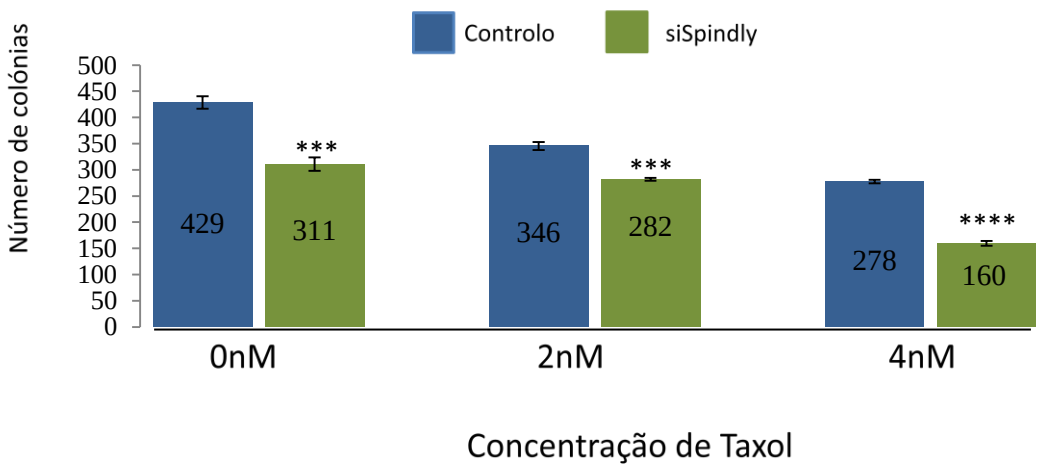
Gráfico 3. 6 - Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Spindlye da combinação com o taxol na viabilidade celular da linha MCF-7.
A depleção da Spindly leva à diminuição da viabilidade celular comparando o controlo à depleção da proteína. Nas quatro concentrações de taxol, comparando com a combinação, ocorre um ligeiro decréscimo na viabilidade celular. As percentagens obtidas representam a média aritmética ± desvio padrão de três experiências independentes. *p<0,05

2.3.2 Efeito anti-proliferativo alongo prazo

Analisada a viabilidade das células a curto prazo, procedeu-sea uma análise da proliferação celular a longo prazo através do ensaio de formação de colónias.Após 96h da transfecção e 48h após a adição do Taxol, foi trocado o meio às células e deixadas a proliferar durante 8 dias. No fim dos 8 dias foi realizado um ensaio de formação de colónias onde o número de colónias formadas foi determinado para cada condição.

Podemos verificar que após a depleção da Spindly, o número de colónias decresceu significativamente em comparação ao controlo (0 nM taxol), baixando de 429 colónias para 311 colónias na depleção. Após a adição do taxol a 2nM observou-se uma redução significativa no número de colónias comparativamente ao controlo, baixando de 429 para 346. Este efeito foi mais acentuado após a adição do taxol a 4nM, visto que o número de colónias decresceu de 429 para 278. Quando comparada adição do taxol a 2nM com a combinação a 2nM, é visível um decréscimo significativo no número de colónias após a combinação. Na combinação a 4nM o efeito é mais evidente, observando-se um maior efeito na redução do número de colónias comparando com o taxol 4 nM. (Gráfico 3.8). Após a realização deste ensaio a uma combinação de 10nM, não se verificaram quaisquer colónias formadas, tanto no taxol a 10nM como na combinação a 10nM, sendo que nos replicados da experiência não foi usada estar concentração. Assim concluiu-se que a combinação a 4nM apresenta um efeito mais evidente na redução da proliferação celular, comprando não só com o taxol a 4nM como também comparando com as células controlo e após a depleção da spindly.

A.



B.

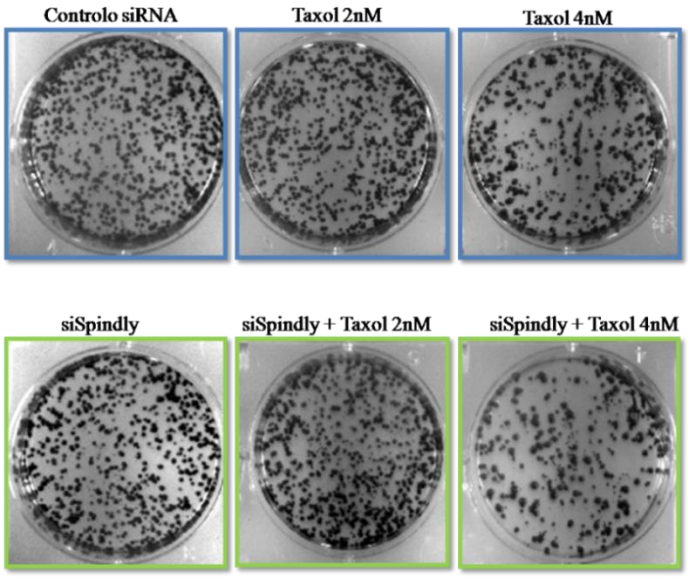


Figura 3. 7 - Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Spindly e da combinação com o taxol na proliferação celular a longo prazo da linha MCF-7.
Através do ensaio de formação de colónias podemos verificar que a depleção da Spindly leva à diminuição do número de colónias comparando o controlo à depleção da proteína, assim como nas diferentes concentrações de taxol, em combinação com a depleção (A). Os mesmos resultados são suportados pela imagem relativa aos poços das culturas testadas 8dias após a incubação. A imagem presente apenas representa uma experiência (B).Os valores obtidos representam a média aritmética ± desvio padrão de três experiências independentes. ***p<0,001 ****p<0,0001

2.3.3 Análise da morte celular após depleção da proteína Spindly

Tendo em conta o efeito anti-proliferativo, após a depleção da spindly e da sua combinação, demonstrado no ensaio anterior, fomos verificar qual seria o mecanismo adotado pelas células MCF-7 para atingir este efeito.Foi realizado um ensaio de TUNEL,96h após a transfeção com siSpindly e 48h após a adição do taxol, com o objectivo de detetar células em apoptose. Foram testadas 5 culturas distintas, referentes ao controlo positivo, onde se induziu a fragmentação do DNA por DNAses; um controlo negativo, siSpindly, Taxol a 4nM e a combinação da depleção com taxol a 4nM.

Verificamos que após a depleção da proteína Spindly foi possível detetar a presença de células apoptóticas em relação ao controlo negativo. O mesmo se verificou para a cultura de taxol a 4nM e para combinação, em que foi possível detetar células apoptóticas em comparação com o controlo negativo. No entanto foi apenas realizada

uma experiência não sendo possível tirar conclusões. É necessária a realização de mais experiências para conclusões definitivas, assim como uma quantificação da apoptose permitindo uma melhor percepção do índice apoptótico entre os diferentes tratamentos (Figura 3.9). No entanto, este resultado aponta para a morte celular por apoptose como mecanismo que explica o efeito anti-proliferativo da depleção Spindly, sendo este efeito ainda maior quando a depleção da Spindly é combinada com o taxol.

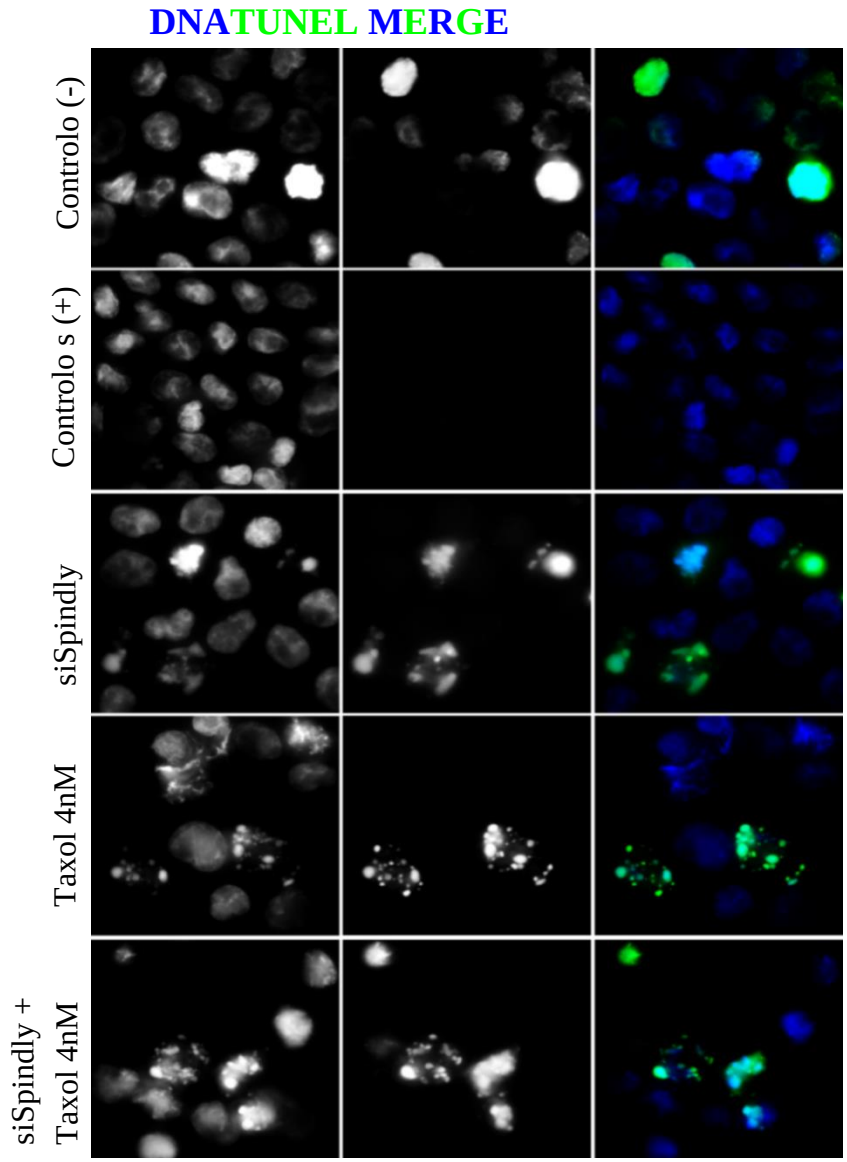


Figura 3. 8 - Morte celular por apoptose, analisada através do ensaio de Tunel, na linha MCF-7, na sequência do silenciamento da proteína Spindly e da combinação com o taxol.

Imagens de túnel (verde) e marcação com DAPI (azul), de células MCF-7, demonstrando a presença de corpos apoptóticos após a depleção da proteína Spindly, no taxol só e na combinação.

3 Avaliação do efeito anti-proliferativo da depleção da proteína Cdc20 e da combinação com Taxol

A proteína Cdc20 é um co-factor essencial para a ativação do APC/C, permitindo assim aprogressão da célula na mitose. Quando ocorrem erros durante a divisão celular o "checkpoint" mitótico é ativado, fazendo com que o complexo do "checkpoint" mitótico seja formado. Este complexo é responsável por sequestrar a proteína Cdc20, deixando o APC/C inativo. Enquanto a proteína Cdc20 não é libertada, a célula não consegue transitar da metafase para a anafase. Portanto uma sobre expressão desta proteína pode levar a uma activação desregulada do APC/C e consequente saída prematura da mitose. Uma saída prematura da célula da mitose pode levar à aneuploidia nas células filhas, caraterística bastante comum em diversos cancros sólidos. Vários estudos já descreveram uma sobre-expressão da Cdc20 em variados cancros, associando assim esta sobre-expressão à proliferação desregulada das células cancerígenas. (25, 44)Tendo em conta o seu papel,proteína Cdc20 poderá representar um novo alvo para interferir com o silenciamento do "checkpoint" e levar a uma paragem das células em mitose. Assim, como objetivo desta secção, propõe-se verificar esta capacidade,após a depleção da proteína, bem como a sua capacidade de potenciar o efeito do taxol num tratamento combinado.

3.1 Nível de expressão da proteína Cdc20

Neste trabalho foram usadas duas linhas de cancro de colo-rectal – Caco-2 e SW480- onde primeiramente foi analisada a expressão da proteína Cdc20 em ambas as linhas, com o intuito de verificar se esta proteína se encontrava sobre-expressa nas linhas em estudo,procedendo à sua depleção e análise do fenótipo.

Inicialmente, recorrendo à técnica de PCR quantitativo em tempo real, foram analisados os níveis de expressão da proteína Cdc20 nas linhas celulares Caco-2 e SW480, tendo como comparação uma linha normal de cólon, NCM460. Os resultados obtidos mostraram que os níveis de expressão da proteína Cdc20 encontraram-se aumentados em ambas as linhas analisadas, estando 3 vezes mais aumentado na linha Caco-2 e 4 vezes superior na linha SW480 (Gráfico 3.10). Verificou-se assim pela primeira vez, que tanto na linhaCaco-2 como na linha SW480, a expressão da Cdc20 se

encontra aumentada, com maior expressão na linha SW480 Atendendo a este resultado, optou-se por usar apenas a linha celular SW480nas experiências que se seguiram.

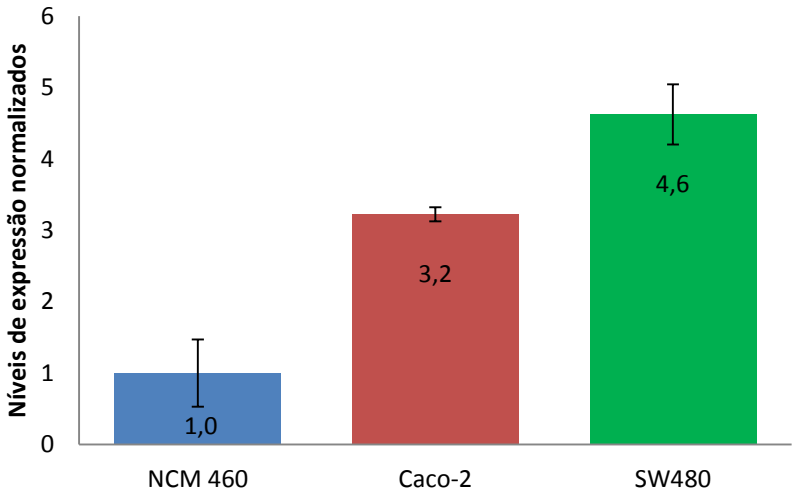


Gráfico 3. 7 - Expressão relativa dos mRNAs da Cdc20 nas linhas celulares do cancro colo-rectal.
Os valores obtidos foram normalizados com os níveis de expressão da actina, e com valor obtido na linha celular de NCM 460 estabelecido como 1 (100%). Em ambas as linhas de cancro colo-rectal observa-se uma sobre-expressão dos genes codificantes da proteína Cdc20.

3.2 Eficiência da depleção da proteína Cdc20

Com o objectivo de verificar os efeitos da depleção da proteína Cdc20 nas linhas de cancro de colo-rectal, foi utilizada a técnica de RNAi para a depleção a proteína. Após a depleção da proteína Cdc20, a eficiência da depleção foi comprovada através da técnica de imunofluorescência. As células foram transfetadas e 48h depois foram usados anticorpos primários e secundários, permitindo localizar a proteína de interesse nas células controlo e após transfecção. As células controlo foram inicialmente observadas ao microscópio de fluorescência, onde se verificou a marcação da proteína Cdc20 durante a prometafase. A proteína CREST foi usada nesta técnica como controlo da posição dos cinetocoros. Após a transfeção não se observou marcação da proteína Cdc20. Comparando as células controlo onde se detetou a Cdc20, nas células transfetadas é visível uma ausência da Cdc20, demonstrando a eficiência da depleção da

proteína Cdc20 (Figura 3.11). No entanto não foi possível demonstrar a eficiência da depleção através da técnica de western blotting, visto que após diversas tentativas a técnica não demonstrou qualquer resultado, sendo apenas possível verificar a eficiência através de imunofluorescência.

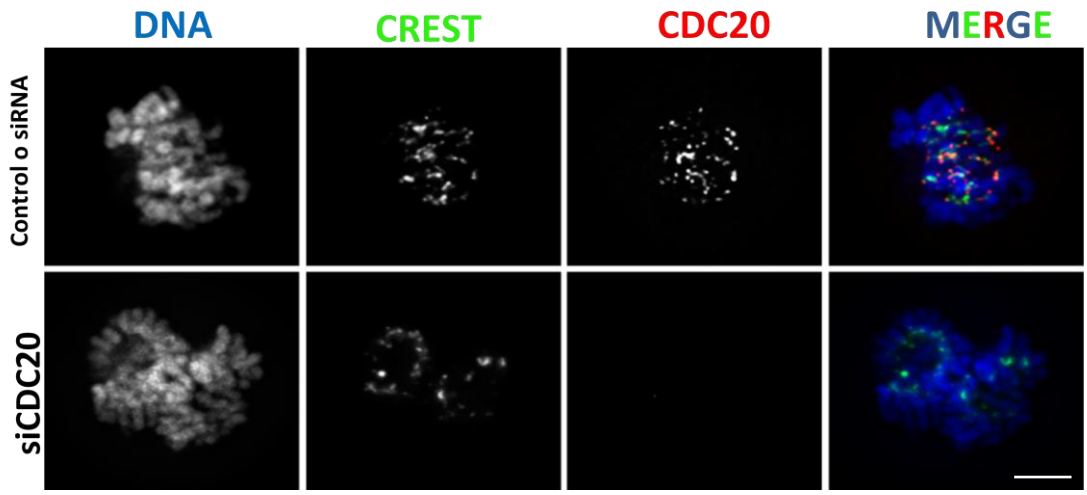


Figura 3. 9 - Eficiência da depleção da proteína Cdc20 através de imunofluorescência, na linha SW480.
Imagens de imunofluorescência, de células do cancro do colo-rectal, em prometafase, marcadas com os anticorpos anti-Spindly (vermelho) e anti-CREST (verde), demonstrando a ausência da proteína Cdc20 nos cinetocoros após a transfecção com RNAi, na linha SW480. Bar, 5 µm

3.3 Fenótipo resultante da depleção da proteína Cdc20

Após a comprovada a eficiência da depleção da proteína Cdc20, fomos verificar o efeito da depleção sobre a acumulação em mitose como seria expetável, através do cálculo do índice mitótico, sendo analisado em culturas controlo, transfetadas com siCdc20 e na adição do composto nocodozole, como controlo positivo.

Através da observação por microscopia de contraste de fase, procedeu-se com a determinação do índice mitótico, em que foi possível observar um aumento mais significativo no número de células mitóticas na cultura transfectada comparando com o controlo. Verificou-se com estes resultados que a depleção da proteína Cdc20 resulta num aumento, de células em mitose.

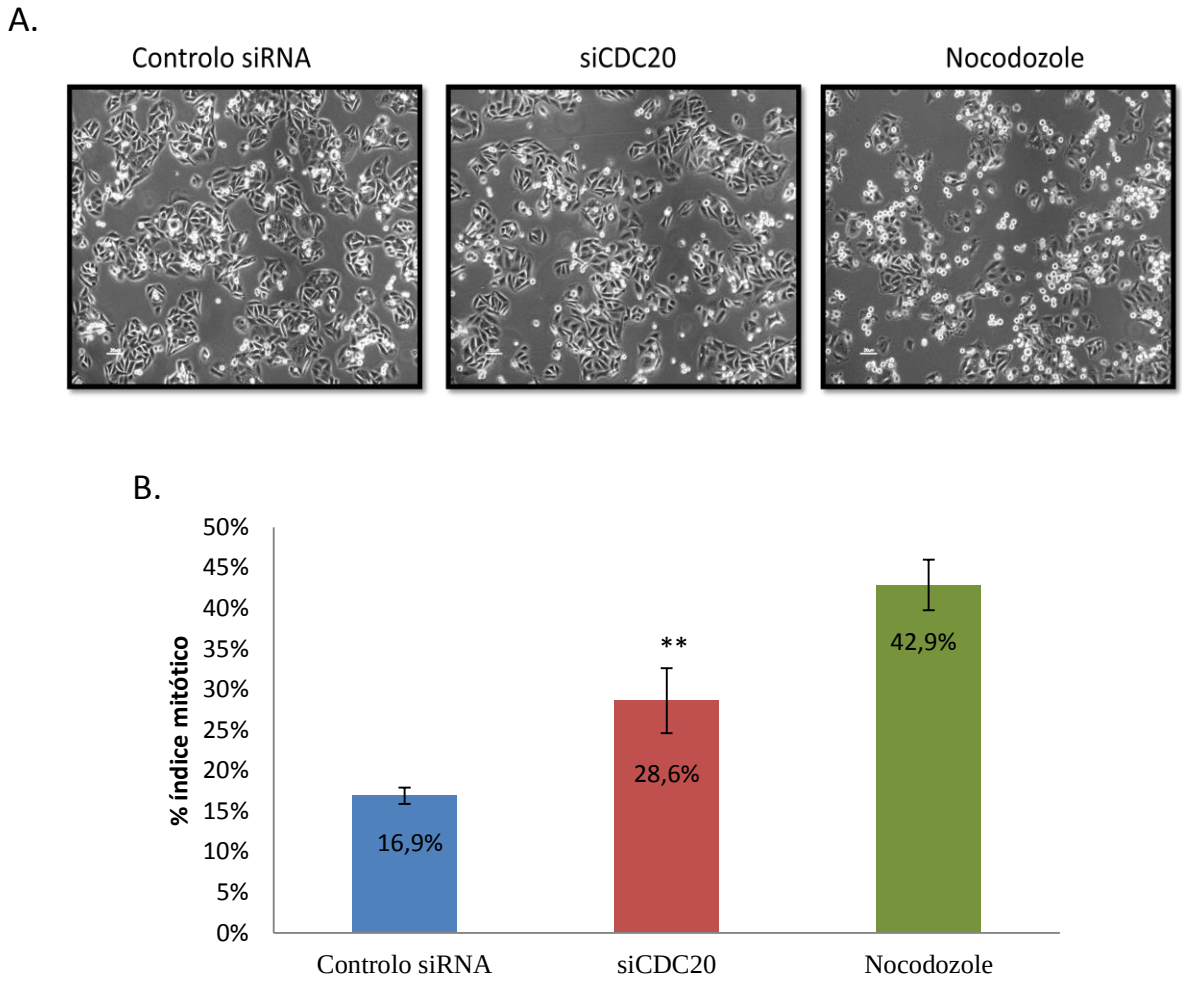


Figura 3. 10 - Índice mitótico resultante da depleção da proteína Cdc20, em linhas celulares de cancro colo-rectal.
Imagens de contaste de fase de culturas controlo e após a depleção da proteína Cdc20, na linha celular SW480 (A). Os valores obtidos demonstram que existe uma acumulação de células mitóticas após a transfeção, comprando o controlo (B). As percentagens obtidas representam a média aritmética ± desvio padrão de três experiências independentes. **p<0,001

3.4 Tratamento combinado siRNAs e Taxol

3.4.1 Efeito a curto prazo da combinação siRNA com Taxol

Fomos verificar o efeito na viabilidade celular, através do ensaio de MTT,da combinação da depleção da proteína Cdc20 com a adição do Taxol a cinco

concentrações diferentes (2nM;5Nm;10nM;50nM e 100nM), em duas linhas de cancro de colo-rectal.

Analisada a viabilidade celular, na linha SW480, as células transfetadas apresentaram um decréscimo significativo, de aproximadamente 25%, da viabilidade quando comparando com as células controlo. Quando comparada a combinação a 2nM com o taxol a 2nM verificamos um decréscimo significativo da viabilidade celular, no entanto este efeito não foi cumulativo tendo em conta que comparando com a depleção da cdc20, não houve um decréscimo da viabilidade. Por outro lado, nas concentrações de 5,10 e 50nM observamos um efeito aditivo, tendo em conta que ocorreu um decréscimo significativo da viabilidade comparando não só com o taxol sozinho como com também com a depleção da Cdc20 (Gráfico 3.13). Concluindo, a combinação da depleção com a adição do taxol nas concentrações de 5,10 e 50nM apresenta um efeito aditivo na redução da viabilidade celular a curto prazo, na linha SW480.

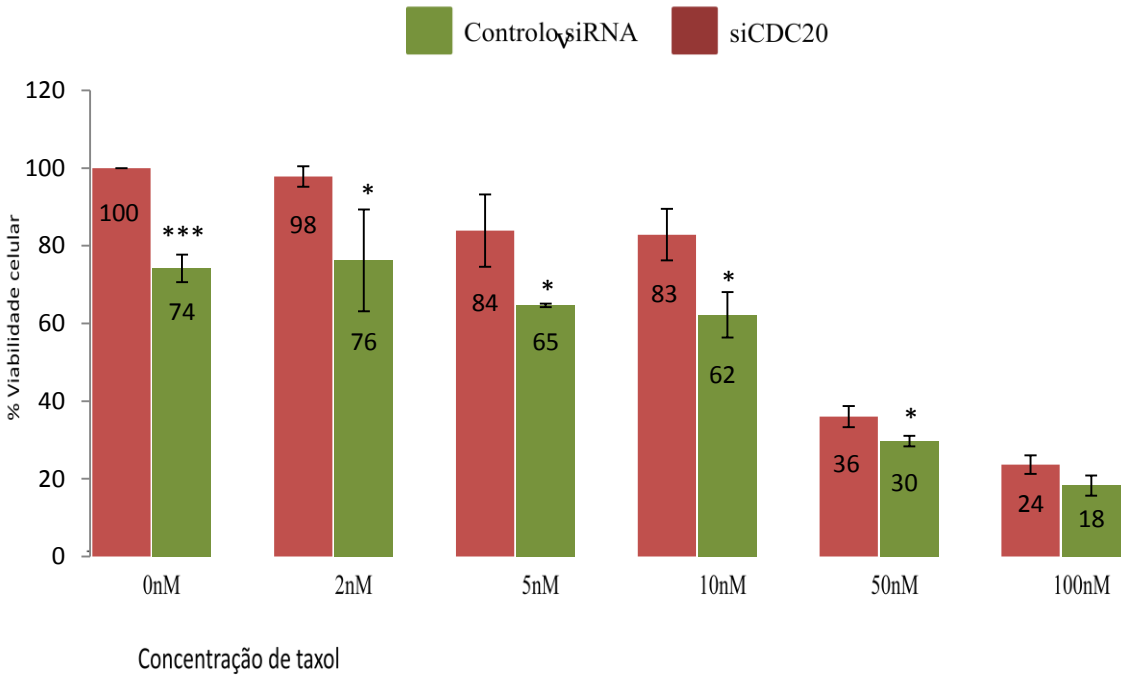


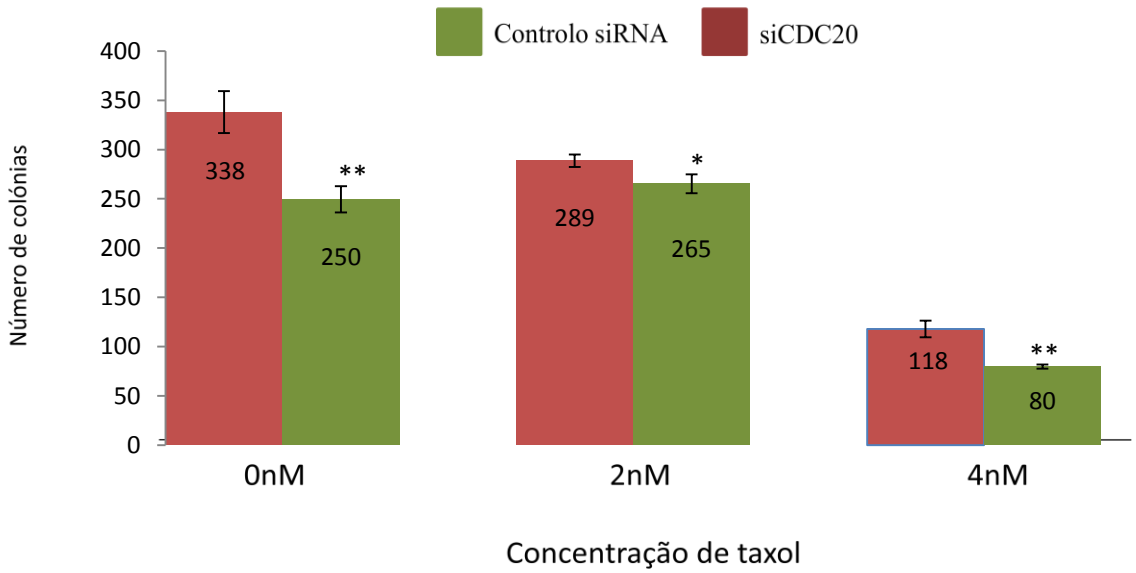
Gráfico 3. 8 - Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Cdc20 na viabilidade celular da linha SW480.
A depleção da proteína Cdc20 leva à diminuição da viabilidade celular comparando o controlo (0 nM). Observou-se um decréscimo significativo da viabilidade celular após a combinação a 2nM, 4nM, 10nM e 50nM comparando com o taxol das respetivas. As percentagens obtidas representam a média aritmética ± desvio padrão de três experiências independentes. *p<0,05 ***p<0,001

3.4.2 Efeito a longo prazo da combinação siRNA com Taxol

Procedeu-se à análise da proliferação celular a longo prazo através do ensaio de formação de colónias 96h após a transfeção com siCdc20 e 48h após a adição do Taxol nas doses terapêuticasde 2nM e 5nM.

Foi visível através do ensaio de formação de colónias uma diminuição significativa do número de colónias após a depleção da Cdc20 em comparação com o controlo(Figura 3.14).Após a comparação da combinação a 2nM com o taxol verificamos um ligeiro decréscimo no número de colónias. Por outro lado na concentração de 5nM o efeito foi mais evidente, observando-se um decréscimo muito significativo no número de colónias após a combinação (80), quer comparando com o taxol a 5nM (118) quer com a depleção (250).

A.



B.

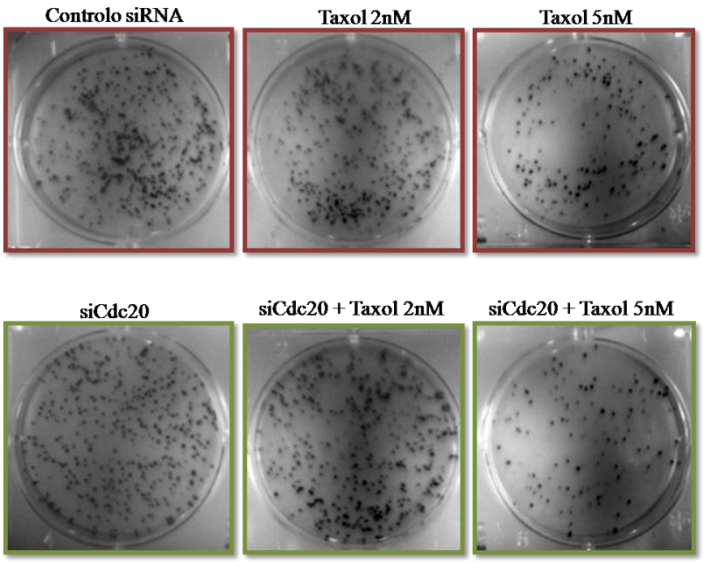


Figura 3. 11 - Avaliação do efeito do silenciamento da proteína Cdc20 na proliferação celular a longo prazo da linha SW480.

Através do ensaio de formação de colónias podemos verificar que a depleção da Spindly leva à diminuição do número de colónias comparando com o controlo. Comparando as diferentes concentrações de taxol à respetiva combinação também é possível verificar um decréscimo no número de colónias formadas após a combinação da depleção com adição do taxol (A.). Os mesmos resultados são suportados pela imagem relativa aos poços das culturas testadas 10dias após a incubação. A imagem presente apenas representa uma experiência (B). Os valores obtidos representam a média aritmética ± desvio padrão de três experiências independentes. *$p<0,05$ **$p<0,001$

Parte IV –Discussão/Conclusão

O presente trabalho consistiu em dois objetivos: i) Avaliação de pequenas moléculas com potencial inibidor da proteína do checkpoint mitótico; ii) combinar drogas anti-mitóticas com o silenciamento de proteínas do SAC, pretendendo combater as limitações e a resistência que alguns cancros apresentam a estes agentes.

A necessidade da descoberta de novos compostos com atividade anti-tumoral é uma realidade hoje em dia, no combate ao cancro.Nesse sentido, foi avaliada a capacidade de cinco pequenas moléculas em inibir a proteína BubR1, presente no SAC e nas corretas ligações dos cinetocoros aos microtúbulos. Inicialmente verificou-se que a apenas molécula E5 apresentava um efeito mais acentuado e promissor, reduzindo em maior percentagem a viabilidade celular nas diferentes concentrações testadas.Com o intuito de analisar acapacidade desta moléculaeminterferir com a proteína BubR1, foi analisado o fenótipo após a incubação com a molécula E5 às concentrações 150µM e 300µM. Observou-se um aumento inesperado de células mitóticas, visto não ser uma consequência da depleção desta proteína. No entanto a presença de cromossomas desalinhados, sugere que o composto pode estar a inibir a proteína BubR1 interferindo com a sua função/localização. Para verificarsea molécula E5 apresenta a capacidade de interferir com a proteína BubR1, realizou-se um ensaio de imunofluorescência, que através da marcação da proteína BubR1, foi demonstrado que a localização da proteína não é afectada.No entanto a molécula E5 pode estar a interferir com o papel da proteína na ligação dos cinetocoros aos microtúbulos. Apesar dos resultados obtidos, não é excluídaa possibilidade desta molécula poder estar a interferir com outras proteínas.

Asegunda parte deste trabalho foi dividida em duas secções, em que a primeira teve como objetivo avaliar o efeitoda depleção da proteína Spindly combinando este efeito com o agente anti-mitótico- Taxol.

A proteína Spindly está descrita como uma proteína envolvida nas ligações dos cinetocoros aos microtúbulos, contribuindo para o silenciamento do SAC. A sua depleção resulta na incapacidade da dineína de atingir os cinetocoros resultando na paragem da célula em mitose. Assim sendo, foi proposta a hipótese de que a depleção

da proteína Spindly representa um novo alvo no combate ao cancro, tendo a capacidade de sensibilizar as células cancerígenas à ação do taxol.

Após comprovada a eficiência da depleção da proteína Spindly na linha celular MCF-7, demonstrou-se que a depleção da spindly induz uma paragem significativa das células em mitose.De seguidafoi avaliado o efeito anti-proliferativo da depleção juntamente com a adição do taxol. Verificou-se que ao nível da viabilidade celular, a depleção da spindly apresentou um melhor efeito anti-proliferativo, tendo em conta que a combinação não demonstrou um efeito cumulativo a curto prazo. No entanto, a longo prazo observou-se um decréscimo significativo da capacidade proliferativa das células após a depleção da spindly, sendo mais evidente na combinação desta com o taxol.Após estes resultados verificou-se qual o mecanismo resultante do efeito anti-proliferativo observado. Apesar dos resultados obtidos serem insuficientes e considerados preliminares, sugerem que o mecanismo por detrás deste efeito é a apoptose.

Deste modo, analisando o conjunto de resultados obtidos pode-se concluir que a hipótese inicialmente proposta foi confirmada. Este trabalho demonstrou assim pela primeira vez, que a Spindlypoderá representar um novo alvo terapêutico e a sua combinação com o taxol revela uma nova estratégia no combate à resistência aos agentes anti-mitóticos

A segunda secção procurou demonstrar o efeito da depleção da proteína Cdc20 e da sua combinação com o Taxol.

A proteína CDC20 é uma proteína essencial para a progressão da célula na mitose. Mas quando ocorrem erros durante a divisão celular o SAC é activado, fazendo com a proteína Cdc20 seja sequestrada impedindo activação do APC/C, causando uma paragem da célula em mitose. Vários estudos demonstraram que uma sobre-expressão da Cdc20 está associada à proliferação desregulada das células cancerígenas.

Assim sendo foi proposta a hipótese de confirmar a potencialidade da depleção da Cdc20 como alvo terapêutico assim como o sua capacidade em sensibilizaras células aos efeito do taxol num tratamento combinado.

Inicialmente foi avaliada a expressão da proteína Cdc20 nas linhas celulares Caco-2 e SW480 derivadas do cancro do colo-rectal. Observou-se que os níveis de expressão da proteína Cdc20 encontraram-se 3 vezes mais aumentado na linha Caco-2 e 4 vezes mais na linha SW480, demonstrando assim pela primeira vez uma sobre-expressão da Cdc20 nas linhas celulares Caco-2 e SW480.Tendo em conta estes

resultados optou-se por trabalhar apenas com a linha celular SW480, aquela que apresentou uma maior expressão da Cdc20. Apesar de não ter sido possível comprovar a depleção da Cdc20 por western blotting, esta foi demonstrada através da técnica de imunofluorescência. Após a depleção, como seria de esperar, a célula apresenta um aumento no número de células mitóticas, no entanto apesar de significativo não foi acentuado, comprando com o controlo. No entanto, observando o efeito combinatório da depleção juntamente com o taxol, a curto prazo, verificou-se que após a depleção da Cdc20 a viabilidade celular reduziu significativamente, assim como nasconcentrações de 5,10 e 50nM, onde se observou um efeito cumulativo após a combinação das diferentes concentraçõescom a depleção da Cdc20. O mesmo se observou a longo prazo, verificando-se um impacto significativo na redução da proliferação celular, com maior ênfase na concentração de 5nM combinada com a depleção. Apesar da proteína Cdc20 ser já vastamente estudada em diversos cancros, a apresentação destes resultados, confirma-se a hipótese inicial que a depleção da Cdc20 representa um potencial alvo terapêutico, mediando a saída da mitose por parte da célula, assim como esta possui a capacidade de sensibilizar as células à ação do taxol.

Parte V – Perspetivas futuras

Através do trabalho realizado durante este projeto, foi possível abrir novas portas à investigação na área da Oncobiologia. O conjunto de resultados obtidos demonstrou uma contribuição para a descoberta de novas terapias anti-tumorias. No entanto é preciso fortificar os resultados adquiridos.

Dentro do estudo das pequenas moléculas, é necessária a realização de réplicas do ensaio de viabilidade celular da molécula E5, com o intuito de validar o resultado primeiramente obtido. De seguida seria interessante a marcação de outras proteínas envolvidas no SAC, com o intuito de verificar a possibilidade da molécula E5 estar a inibir outras proteínas.

No âmbito da depleção da proteína Spindly e da sua combinação com o taxol, apesar dos resultados apresentados se revelarem bastante promissores será importante uma consolidação destes, através de mais estudos, começando primeiramente pela análise da expressão da Spindly na linha em estudo, visto não ter sido possível durante a realização deste trabalho. Através darepetição noutras linhas celulares cancerígenas assim como em linhas celulares normais. O passo seguinte seria estudar este efeito num modelo *in vivo*sendo a perceção mais próxima da realidade. Seria importante a análise do ciclo celular, através do ensaio de citómetria de fluxo, permitindo confirmar não só a acumulação de células na fase M como também reforçar possivelmente a ideia da morte celular por apoptose. Também para uma melhor compreensão do que se passa em tempo real com a célula e de qual o seu destino após a paragem prolongada em mitose, era uma ótima abordagem a realização de *live-cell imaging*.

Na última secção deste trabalho os resultados obtidos, apesar de complementares a outros estudos já realizados, demonstraram mais uma vez o potencial da depleção da Cdc20 como alvo futuro e da sua combinação com o taxol. Assim sendo seria interessante e curioso a passagem destes ensaio de *in vitro* para *in vivo*, podendo se aproximar mais da realidade e dar mais consistência aos resultados obtidos. A análise do ciclo celular representa uma experiência muito importante permitindo descobrir a capacidade da depleção e da combinação em parar as células na mitose, sendo adicionalmente acompanhada de *live-cell imaging*.

Parte V - Referências

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. PubMed PMID: 21296855. Epub 2011/02/08. eng.
2. Statistics WHOWWH, http://www.who.int/gho/ GWAf, publications/world_health_statistics/EN_WHS2012_Full.pdf. World Health Organization (WHO). 2012.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230. Epub 2011/03/08. eng.
4. Brennan P. Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? Carcinogenesis. 2002 Mar;23(3):381-7. PubMed PMID: 11895852. Epub 2002/03/16. eng.
5. Dixon K, Kopras E. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. Seminars in cancer biology. 2004 Dec;14(6):441-8. PubMed PMID: 15489137. Epub 2004/10/19. eng.
6. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. Nature reviews Molecular cell biology. 2010 Mar;11(3):220-8. PubMed PMID: 20177397. Epub 2010/02/24. eng.
7. Giam M, Rancati G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. Cell division. 2015;10:3. PubMed PMID: 26015801. Pubmed Central PMCID: PMC4443636. Epub 2015/05/28. eng.
8. Nojima H. Cell cycle checkpoints, chromosome stability and the progression of cancer. Human cell. 1997 Dec;10(4):221-30. PubMed PMID: 9573481. Epub 1998/05/09. eng.
9. Aguilera A, Gomez-Gonzalez B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. Nature reviews Genetics. 2008 Mar;9(3):204-17. PubMed PMID: 18227811. Epub 2008/01/30. eng.
10. Wang H, Zhang X, Teng L, Legerski RJ. DNA damage checkpoint recovery and cancer development. Experimental cell research. 2015 Jun 10;334(2):350-8. PubMed PMID: 25842165. Epub 2015/04/07. eng.
11. Bakhoum SF, Compton DA. Chromosomal instability and cancer: a complex relationship with therapeutic potential. The Journal of clinical investigation. 2012 Apr;122(4):1138-43. PubMed PMID: 22466654. Pubmed Central PMCID: PMC3314464. Epub 2012/04/03. eng.
12. Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. Nature reviews Molecular cell biology. 2008 Jan;9(1):33-46. PubMed PMID: 18097444. Epub 2007/12/22. eng.
13. Zimmerman W, Doxsey SJ. Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. Traffic (Copenhagen, Denmark). 2000 Dec;1(12):927-34. PubMed PMID: 11208082. Epub 2001/02/24. eng.
14. Guo Y, Kim C, Mao Y. New Insights into the Mechanism for Chromosome Alignment in Metaphase. International review of cell and molecular biology. 2013;303:237-62. PubMed PMID: 23445812.
15. Ibrahim B. Spindle assembly checkpoint is sufficient for complete Cdc20 sequestering in mitotic control. Computational and structural biotechnology journal. 2015;13:320-8. PubMed PMID: 25977749. Pubmed Central PMCID: PMC4430708. Epub 2015/05/16. eng.

16. Silva P, Barbosa J, Nascimento AV, Faria J, Reis R, Bousbaa H. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. Cell proliferation. 2011 Oct;44(5):391-400. PubMed PMID: 21951282. Epub 2011/09/29. eng.
17. May KM, Hardwick KG. The spindle checkpoint. Journal of cell science. 2006 Oct 15;119(Pt 20):4139-42. PubMed PMID: 17038540. Epub 2006/10/14. eng.
18. Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. Cell. 2003 Feb 21;112(4):407-21. PubMed PMID: 12600307. Epub 2003/02/26. eng.
19. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. The Journal of cell biology. 2001 Sep 3;154(5):925-36. PubMed PMID: 11535616. Pubmed Central PMCID: PMC2196190. Epub 2001/09/06. eng.
20. Griffis ER, Stuurman N, Vale RD. Spindly, a novel protein essential for silencing the spindle assembly checkpoint, recruits dynein to the kinetochore. The Journal of cell biology. 2007 Jun 18;177(6):1005-15. PubMed PMID: 17576797. Pubmed Central PMCID: PMC2064361. Epub 2007/06/20. eng.
21. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. Nature. 1998 Mar 19;392(6673):300-3. PubMed PMID: 9521327. Epub 1998/04/01. eng.
22. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nature reviews Molecular cell biology. 2007 May;8(5):379-93. PubMed PMID: 17426725. Epub 2007/04/12. eng.
23. London N, Biggins S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. Nature reviews Molecular cell biology. 2014 Nov;15(11):736-47. PubMed PMID: 25303117. Pubmed Central PMCID: PMC4283840. Epub 2014/10/11. eng.
24. Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS. MAD2 and CDC20 are upregulated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists. 2014 Sep;33(5):517-23. PubMed PMID: 25083970. Epub 2014/08/02. eng.
25. Wu WJ, Hu KS, Wang DS, Zeng ZL, Zhang DS, Chen DL, et al. CDC20 overexpression predicts a poor prognosis for patients with colorectal cancer. Journal of translational medicine. 2013;11:142. PubMed PMID: 23758705. Pubmed Central PMCID: PMC3691738. Epub 2013/06/14. eng.
26. Teixeira JH, Silva P, Faria J, Ferreira I, Duarte P, Delgado ML, et al. Clinicopathologic significance of BubR1 and Mad2 overexpression in oral cancer. Oral diseases. 2015 Sep;21(6):713-20. PubMed PMID: 25754611. Epub 2015/03/11. eng.
27. Bargiela-Iparraguirre J, Prado-Marchal L, Pajuelo-Lozano N, Jimenez B, Perona R, Sanchez-Perez I. Mad2 and BubR1 modulates tumourigenesis and paclitaxel response in MKN45 gastric cancer cells. Cell cycle (Georgetown, Tex). 2014;13(22):3590-601. PubMed PMID: 25483095. Epub 2014/12/09. eng.
28. Morales AG, Pezuk JA, Brassesco MS, de Oliveira JC, de Paula Queiroz RG, Machado HR, et al. BUB1 and BUBR1 inhibition decreases proliferation and colony formation, and enhances radiation sensitivity in pediatric glioblastoma cells. Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery. 2013 Dec;29(12):2241-8. PubMed PMID: 23728478. Epub 2013/06/04. eng.
29. Shigeishi H, Yoneda S, Taki M, Nobumori T, Ohta K, Higashikawa K, et al. Correlation of human Bub1 expression with tumor-proliferating activity in salivary

gland tumors. Oncology reports. 2006 Apr;15(4):933-8. PubMed PMID: 16525682. Epub 2006/03/10. eng.
30. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. Current medicinal chemistry Anti-cancer agents. 2005 Jan;5(1):65-71. PubMed PMID: 15720262. Epub 2005/02/22. eng.
31. Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. Medicinal research reviews. 2011 May;31(3):443-81. PubMed PMID: 21381049. Pubmed Central PMCID: PMC3155728. Epub 2011/03/08. eng.
32. Perez EA. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. Molecular cancer therapeutics. 2009 Aug;8(8):2086-95. PubMed PMID: 19671735. Epub 2009/08/13. eng.
33. Mukhtar E, Adhami VM, Mukhtar H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. Molecular cancer therapeutics. 2014 Feb;13(2):275-84. PubMed PMID: 24435445. Pubmed Central PMCID: PMC3946048. Epub 2014/01/18. eng.
34. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. Nature reviews Cancer. 2010 Mar;10(3):194-204. PubMed PMID: 20147901. Epub 2010/02/12. eng.
35. Dumontet C, Jordan MA. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. Nature reviews Drug discovery. 2010 Oct;9(10):790-803. PubMed PMID: 20885410. Pubmed Central PMCID: PMC3194401. Epub 2010/10/05. eng.
36. Moudi M, Go R, Yien CY, Nazre M. Vinca alkaloids. International journal of preventive medicine. 2013 Nov;4(11):1231-5. PubMed PMID: 24404355. Pubmed Central PMCID: PMC3883245. Epub 2014/01/10. eng.
37. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. Nature reviews Cancer. 2004 Apr;4(4):253-65. PubMed PMID: 15057285. Epub 2004/04/02. eng.
38. Overlack K, Primorac I, Vleugel M, Krenn V, Maffini S, Hoffmann I, et al. A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. eLife. 2015;4:e05269. PubMed PMID: 25611342. Pubmed Central PMCID: PMC4337726. Epub 2015/01/23. eng.
39. Liu AW, Cai J, Zhao XL, Xu AM, Fu HQ, Nian H, et al. The clinicopathological significance of BUBR1 overexpression in hepatocellular carcinoma. Journal of clinical pathology. 2009 Nov;62(11):1003-8. PubMed PMID: 19861558. Epub 2009/10/29. eng.
40. Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. Cancer science. 2010 Mar;101(3):639-45. PubMed PMID: 20132214. Epub 2010/02/06. eng.
41. Hsieh PC, Chen YK, Tsai KB, Shieh TY, Chang YY, Chang JG, et al. Expression of BUBR1 in human oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics. 2010 Feb;109(2):257-67. PubMed PMID: 19926498. Epub 2009/11/21. eng.
42. Shichiri M, Yoshinaga K, Hisatomi H, Sugihara K, Hirata Y. Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. Cancer research. 2002 Jan 1;62(1):13-7. PubMed PMID: 11782350. Epub 2002/01/10. eng.
43. Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, et al. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. Science translational medicine. 2014 Mar 26;6(229):229ra43.

PubMed PMID: 24670687. Pubmed Central PMCID: PMC4176609. Epub 2014/03/29. eng.
44. Chang DZ, Ma Y, Ji B, Liu Y, Hwu P, Abbruzzese JL, et al. Increased CDC20 expression is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation and progression. Journal of hematology & oncology. 2012;5:15. PubMed PMID: 22475564. Pubmed Central PMCID: PMC3350393. Epub 2012/04/06. eng.