



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS E MEDICINA

***CHECKPOINT MITÓTICO COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA SENSIBILIZAR
CÉLULAS CANCERÍGENAS A AGENTES ANTIMITÓTICOS***

Vânia Sofia Dos Reis Diogo

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

Checkpoint Mitótico como alvo terapêutico para sensibilizar células cancerígenas a agentes antimitóticos

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.

Vânia Sofia dos Reis Diogo

«Copyright» Vânia Sofia dos Reis Diogo

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 CESPUP – 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

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

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*)

Silva PMA*, **Diogo V***, Teixeira J*, Bousbaa H. Spindle assembly checkpoint and resistance to antimetabolic drugs. (*In preparation*)

Teixeira J*, **Diogo V***, Silva PMA*, Bousbaa H. Targeting Cdc20 to sensitize cancer cells to taxol. (*In preparation*)

Silva PMA, **Diogo V***, Teixeira J*, Bousbaa H. Spindly as a potential therapeutic anticancer target. (*In preparation*)

(*) *Equal contribution*

Comunicações orais

Diogo V, Silva PMA, Teixeira J and Bousbaa H. Therapeutic targeting of the mitotic checkpoint to increase sensitivity of glioblastoma cells to antimetabolic agents. 8º Encontro Investigação Jovem da Universidade do Porto IJUP, 13 a 15 de Maio de 2015, Porto, Portugal

Teixeira J, Silva PMA, **Diogo V** and Bousbaa H. Targeting Cdc20 protein to increase sensitivity of colorectal cancer cells to paclitaxel. 8º Encontro Investigação Jovem da Universidade do Porto IJUP, 13 a 15 de Maio de 2015, Porto, Portugal

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem o contributo e apoio de várias pessoas. Por esse motivo quero agradecer a todos os que, de uma maneira ou de outra, me ajudaram a concretizá-lo.

Ao Professor Hassan Bousbaa, por me ter recebido no seu laboratório e me ter orientado neste último ano, pela disponibilidade e confiança demonstradas, e pelo incentivo constante.

À Patrícia Silva, por me ter acompanhado desde o primeiro dia, pela paciência, pelo encorajamento, pela dedicação e amizade.

À Joana Teixeira, por ter sido a minha companheira nesta aventura, por me aturar todos os dias durante todo o dia, pelo apoio mútuo e por todos os momentos partilhados.

À Ana Henriques, à Joana Fonseca, à Joana Nunes, à Nilza Ribeiro, à Sandra Marques e à Vanessa Nascimento por se mostrarem sempre prestáveis, pela boa disposição, pelos bons momentos e sobretudo pela amizade.

Aos meus amigos Daniela Freitas, Marta Castilho, Sara Cruz e Jorge Oliveira, pela amizade que persiste apesar dos nossos caminhos terem divergido.

Ao meu namorado Ricardo Godinho, que mesmo estando longe esteve sempre presente, pelo amor e companheirismo, pela paciência, pela dedicação, pela motivação e pela inspiração.

Aos meus avós, Belmira e José Diogo, pelo apoio constante, pelos conselhos de vida e pela dedicação desde os meus primeiros passos.

À minha tia Ermelinda Januário, por toda a ajuda e confiança depositada em mim ao longo dos anos.

À minha sobrinha Sofia Diogo, por alegrar os meus dias mesmo não sabendo.

Ao meu irmão Vasco Diogo, por fazer a distância não contar, pelas palavras de incentivo constantes, pelo exemplo de persistência e audácia.

Aos meus pais, Cremilde Rosa e José Diogo, pelos sacrifícios que permitiram o meu percurso académico, pelo apoio incondicional, pela confiança transmitida, pelo encorajamento e pelo modelo de vida que são para mim.

Resumo

Muitos cancros são tratados com agentes antimitóticos, como o taxol. Estes agentes param as células em mitose ao danificarem os microtúbulos, ativando o *checkpoint* mitótico (SAC), mecanismo que controla a correta segregação dos cromossomas durante a mitose. Contudo, células resistentes conseguem contornar esses danos e prosseguir com a mitose, emergindo assim o SAC como potencial alvo terapêutico no tratamento do cancro. Desta forma surgiu o primeiro objetivo deste trabalho: identificar potenciais inibidores da proteína BubR1, envolvida na ativação do SAC e na estabilização das ligações entre microtúbulos e cinetocoros, numa linha celular de cancro cervical. Dos compostos testados houve um que se destacou pela sua interferência na viabilidade celular e revelou ser um potencial inibidor desta proteína. O objetivo principal deste trabalho foi sensibilizar duas linhas celulares de glioblastoma e uma linha celular de cancro do pulmão ao taxol através da depleção das proteínas Cdc20 ou Spindly, envolvidas na saída da mitose e no silenciamento do SAC, respetivamente. Para isso, estas proteínas foram depletadas por RNAi e foi adicionado taxol às mesmas células. Esta depleção provocou uma redução da viabilidade celular e da capacidade clonogénica, tendo este efeito sido mais pronunciado quando se adicionou taxol, sugerindo que a depleção das proteínas Cdc20 ou Spindly sensibiliza estas células à ação do taxol.

Palavras chave: *Checkpoint* mitótico, instabilidade genómica, BubR1, Cdc20, Spindly, taxol.

Abstract

Many cancers are treated with antimetabolic agents, such as taxol. These agents stop cells in mitosis by damaging microtubules, activating the mitotic checkpoint (SAC), which controls the correct chromosome segregation during mitosis. However, resistant cells can bypass these damages and proceed with mitosis, emerging thus the SAC as a potential therapeutic target in the treatment of cancer. In this way arose the first aim of this work: to identify potential BubR1 inhibitors, a protein involved in SAC activation and in the stabilization of the bindings between microtubules and kinetochores, in a cervical cancer cell line. Of the compounds tested there was one that stood out for its interference on cell viability and revealed to be a potential inhibitor of this protein. The main goal of this work was to sensitize two glioblastoma cell lines and a lung cancer cell line to taxol by depleting Cdc20 or Spindly, involved in the mitotic exit and in SAC silencing, respectively. To achieve this goal, these proteins were depleted by RNAi, and taxol was added to cells lacking these proteins. These depletions caused a reduction in cell viability and in clonogenic ability, which was more evident when taxol was added, suggesting that depletion of Cdc20 or Spindly sensitizes these cells to the action of taxol.

Keywords: Mitotic checkpoint, genomic instability, BubR1, Cdc20, Spindly, taxol.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	viii
1. Introdução	1
1.1 Bases Moleculares do Cancro	1
1.2 Ciclo Celular.....	3
1.2.1 Mitose	4
1.3 Regulação do ciclo celular	5
1.3.1 <i>Checkpoint</i> Mitótico.....	7
1.4 SAC e Cancro	9
1.4.1 SAC como alvo terapêutico	11
1.5 Agentes Antimitóticos.....	12
1.6 Objetivos	13
2. Materiais e Métodos	15
2.1 Desenho Experimental.....	15
2.2 Linhas celulares.....	16
2.3 Condições de cultura	16
2.3.1 Subcultura de Células	16
2.4 Congelação e Descongelação de Células	17
2.5 Extração de RNA total	18
2.6 Síntese de DNA complementar	19
2.7 RT-qPCR	19
2.8 Desenho de Primers	19
2.9 Transfecção com siRNAs	20
2.10 Tratamento de lamelas com Poli-L-Lisina	20

2.11	Imunofluorescência indireta	21
2.12	Preparação de Extratos Proteicos e Quantificação de Proteínas	22
2.13	<i>Western Blotting</i>	22
2.14	Determinação do Índice Mitótico	23
2.15	Ensaio MTT.....	24
2.16	Ensaio Clonogénico.....	24
2.17	Ensaio <i>Wound Healing</i>	25
2.18	<i>Cytospin</i>	25
2.19	TUNEL.....	26
2.20	Microscopia e Tratamento de Imagem	27
2.21	Análise Estatística dos Resultados.....	27
3.	Resultados	28
3.1	À procura de um inibidor da proteína cinase BubR1	28
3.1.1	Rastreo de Compostos para identificação de potenciais inibidores de BubR1.....	28
3.2	Cdc20 como potencial alvo terapêutico	30
3.2.1	A depleção da proteína Cdc20 foi eficiente.....	31
3.2.2	A depleção da proteína Cdc20 induz paragem em mitose.....	31
3.2.3	A depleção da proteína Cdc20 reduz a viabilidade de células cancerígenas e torna-as sensíveis à ação do taxol.....	33
3.2.4	O tratamento de combinação siCdc20 + taxol retém as células na mitose	36
3.2.5	A depleção da Cdc20 interfere com a migração de células cancerígenas	38
3.3	Spindly como potencial alvo terapêutico	41
3.3.1	A Spindly está sobre-expressa na linha tumoral NCI-H460	41
3.3.2	A depleção da proteína Spindly foi eficiente.....	42
3.3.3	A depleção da Spindly induz paragem na mitose.....	43
3.3.4	A depleção da Spindly inibe a proliferação celular	44

3.3.5 Morte celular após a depleção da proteína Spindly	46
4. Discussão	48
4.1 À procura de um inibidor da proteína cinase BubR1	48
4.2 Cdc20 como potencial alvo terapêutico	48
4.3 Spindly como potencial alvo terapêutico	50
5. Conclusão	52
6. Bibliografia	53

Índice de Figuras

Figura 1.1 Marcos do cancro	1
Figura 1.2 Ciclo celular	4
Figura 1.3 Mitose	5
Figura 1.4 Regulação do ciclo celular	6
Figura 1.5 Funcionamento do checkpoint mitótico	8
Figura 1.6 Mecanismo de ação do taxol	12
Figura 2.1 Diagrama do plano experimental realizado neste trabalho	15
Figura 3.1 Rastreio de compostos potencialmente inibidores da proteína BubR1 na linha celular HeLa	28
Figura 3.2 Efeito do composto E5 300 μ M na linha celular HeLa	30
Figura 3.3 A proteína Cdc20 foi depletada com eficiência nas linhas celulares U251 e U373	31
Figura 3.4 A depleção da proteína Cdc20 induz pagarem mitótica nas linhas celulares U251 e U373	33
Figura 3.5 A depleção da Cdc20 promove a redução da viabilidade celular a curto prazo, com ou sem a adição de taxol	34
Figura 3.6 A depleção da Cdc20 promove a diminuição da viabilidade celular a longo prazo, com ou sem o tratamento com taxol	36
Figura 3.7 A depleção da proteína Cdc20 promove o desalinhamento de cromossomas e a sua combinação com taxol 5 nM promove a acumulação de células mitóticas	38
Figura 3.8 A depleção da proteína Cdc20, sozinha ou em combinação com o taxol, diminui a capacidade migratória das linhas celulares U251 e U373	41
Figura 3.9 Sobre-expressão de Spindly na linha celular NCI-H460	42

Figura 3.10 A proteína Spindly foi depletada com sucesso na linha celular NCI-H460.	43
Figura 3.11 A depleção da proteína Spindly induz paragem da mitose na linha celular NCI-H460.....	43
Figura 3.12 A depleção da Spindly tem um efeito antiproliferativo a curto prazo na linha celular NCI-H460	44
Figura 3.13 A depleção da proteína Spindly tem um efeito antiproliferativo a longo prazo na linha celular NCI-H460	45
Figura 3.14 Morte celular e depleção da proteína Spindly na linha celular NCI-H460.	47

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 Proteínas do SAC que estão desreguladas em vários tipos de cancro	10
Tabela 2.1 Sequências oligonucleotídicas dos primers utilizados no RT-qPCR.....	20

Lista de Abreviaturas

AEPiCM – *Alveolar Epithelial Cell Medium*
APC/C – *Anaphase-promoting complex/cyclosome*
BSA – *Bovine serum albumin*
Bub – *Budding uninhibited by benzimidazole*
BubR1 – *Bub1-related protein*
Cdc20 – *Cell division cycle protein 20*
Cdk – *Cyclin-dependent kinase*
cDNA – *DNA complementar*
CENP-E – *Centrosome-associated protein E*
CIN – *Chromosome instability*
C-Mad2 – *Closed Mad2*
DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO – *Dimetilsulfóxido*
DNA – *Deoxyribonucleic acid*
DNase – *Deoxyribonuclease*
dUTPs – *deoxyuridine triphosphate nucleotides*
ECL – *Enhanced Chemiluminescence*
EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
FBS – *Fetal Bovine Serum*
FGF – *Fibroblast Growth Factor*
Hec – *Highly expressed in cancer protein*
HPAEPiC - *Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells*
HRP – *Horseradish Peroxidase*
IM – *Índice Mitótico*
M – *Mitose*
Mad – *Mitotic-arrest deficient*
MCC – *Mitotic checkpoint complex*
Mps1 – *Multipolar spindle-1*
mRNA – *RNA mensageiro*
MTT – *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*
PBS – *Phosphate-Buffered Saline*
PBST – *Tween20 0,05% em Phosphate-buffered Saline*

PDGF – *Platelet-Derived Growth Factor*
PFA – Paraformaldeído
PI3K/AKT – *Phosphoinositide 3-kinase/ Protein kinase B*
Plk1 – *Polo-like kinase-1*
pRb – Retinoblastoma
PSA – Persulfato de amônia
O-Mad2 – *Open Mad2*
RNAi – RNA de interferência
RNase – Ribonuclease
RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*
RT-qPCR – *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*
RZZ – *Rod (rough deal)–Zw10 (zeste white10)–Zwilch complex*
SAC – *Spindle assembly checkpoint*
SD – *Standard Deviation*
SDS – *Sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
siRNA – *Small interference RNA*
SSC – *Saline sodium citrate*
TBST – *Tris-Buffered Saline Tween20*
TdT – *terminal deoxynucleotidyl transferase*
TEMED – *N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine*
TUNEL – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

1. Introdução

1.1 Bases Moleculares do Cancro

Uma das características mais marcantes do cancro é a sua elevada heterogeneidade, não só entre diferentes tecidos, mas também na constituição do próprio tumor [2]. Há 15 anos, Hanahan e Weinberg conseguiram distinguir algumas características que promoviam a transformação maligna das células e que seriam comuns à maior parte dos cancros, senão a todos. Estes marcos foram descritos com base na teoria de que todas as células cancerígenas apresentam defeitos nos mecanismos reguladores da proliferação e da homeostasia [3]. Com o decorrer dos anos, novos estudos foram descortinando novas particularidades e, em 2011, a lista de características do cancro foi atualizada (figura 1.1). Estas consistiam na autosuficiência em sinais de crescimento, na insensibilidade aos sinais supressores de proliferação, na evasão à apoptose, no potencial de replicação ilimitado, na angiogénese constitutiva, na capacidade de invasão e metastização, na desregulação da energética celular e na evasão ao sistema imunitário. Adicionalmente, foram descritas 2 características essenciais: a inflamação promotora de tumorigénese e a instabilidade genómica [1].

Para manter o equilíbrio entre o número de células num tecido e preservar a sua morfologia e funções, as células normais controlam a produção e libertação de sinais de crescimento. Contudo, as células tumorais induzem as células vizinhas a libertar sinais de crescimento, como PDGF (*platelet-derived growth factor*), e tornam-se autossuficientes em sinais de crescimento, como FGF (*fibroblast growth factor*) [4]. Além disso, estas células apresentam sobre-expressão de

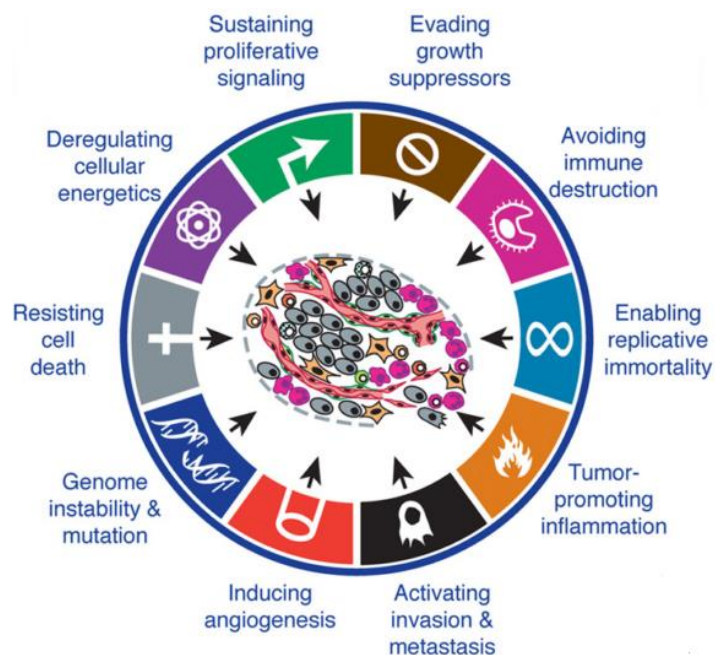


Figura 1.1 Marcos do cancro. Os marcos do cancro consistem na autosuficiência em sinais de crescimento, na insensibilidade aos sinais supressores de proliferação, na evasão à apoptose, no potencial de replicação ilimitado, na angiogénese constitutiva, na capacidade de invasão e metastização, na desregulação da energética celular, na evasão ao sistema imunitário, na inflamação promotora de tumorigénese e na instabilidade genómica (Hanahan and Weinberg, 2011).

recetores de sinais de crescimento e exibem alterações em componentes abaixo desses recetores, tornando-os constitutivamente ativos.

Por outro lado, as células tumorais tornam-se insensíveis a sinais antiproliferativos regulados por genes supressores de tumor, como o retinoblastoma (pRb) e o p53, que estão envolvidos nos mecanismos de regulação da proliferação, senescência e apoptose [5, 6]. Adicionalmente, a inibição por contacto entre células vizinhas parece ser nula entre células cancerígenas e células normais, promovendo a invasão de tecidos normais [7].

A apoptose é um mecanismo de morte programada utilizada para eliminar células anormais ou não funcionais [8]. Dada a natureza das células tumorais, estas necessitam de contornar este mecanismo para permitir a sua propagação. Curiosamente, o gene p53 e a via PI3K/AKT, envolvidos na reparação de DNA, na inibição da proliferação, na promoção da apoptose e na transmissão de sinais de sobrevivência, são os mais mutados no cancro humano [6, 9]. A morte celular por necrose também pode estar associada à progressão tumoral uma vez que as células necróticas libertam o seu conteúdo para o microambiente, promovendo o recrutamento de células inflamatórias [10].

Todas as células normais têm um limite replicativo. Quando esse limite chega ao fim, as células entram em senescência, estado não proliferativo mas viável, ou entram em crise, que envolve morte celular [11]. Um dos fatores promotores da senescência e da crise é o encurtamento gradual dos telómeros que impossibilita a replicação das extremidades dos cromossomas a cada divisão celular. No entanto, a maior parte das células tumorais regula positivamente a enzima telomerase, que adiciona repetições teloméricas às extremidades dos cromossomas, promovendo a imortalização das células.

O oxigénio e nutrientes fornecidos às células através da vasculatura são essenciais à sua função e sobrevivência. Enquanto nas células normais a angiogénese, processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros já existentes, é ativada apenas temporariamente, nas células tumorais este mecanismo está sempre ativado, promovendo a expansão do tumor [12]. No entanto, a vasculatura desenvolvida pelo tumor é distinta da vasculatura normal uma vez que é marcada pela ramificação excessiva, vasos permeáveis e baixa perfusão do sangue [13].

Os tumores malignos seguem uma sequência de passos denominada cascata de invasão-metastização [14]. A aquisição das competências que promove esta sequência deve-se à expressão de fatores de transcrição que promovem a perda de adesão às células vizinhas e à matriz extracelular, a expressão de enzimas que degradam a matriz

extracelular, a resistência à apoptose e a transição epitelial-mesenquimal, processo pelo qual as células epiteliais adquirem características de células mesenquimais.

Para que as células cresçam e proliferem precisam de energia resultante da redução da glucose, que acontece através da fosforilação oxidativa (condições aeróbias) e da glicólise (condições anaeróbias). No entanto, as células tumorais têm a capacidade de reprogramar o seu metabolismo de maneira a que a degradação da glucose seja feita sobretudo através da glicólise, mesmo em condições aeróbias [15]. Apesar desta via ser menos eficiente, ela está ligada ao desvio de intermediários glicolíticos para diversos processos de biossíntese necessários à formação de novas células tumorais.

O sistema imunitário funciona como uma barreira contra à invasão de microrganismos patogénicos e à formação e progressão de tumores. Assim sendo, os tumores resultam de células tumorais que conseguiram evadir à sua destruição pelo sistema imunitário. Essa evasão pode ter origem na capacidade das células cancerígenas em reduzir a sua imunogenicidade e em modular o microambiente tumoral de modo a suprimirem a resposta imunitária do organismo [16]. Adicionalmente, tem sido descrita a presença de células do sistema imunitário em neoplasias que imitam condições inflamatórias em tecidos normais. Além de aumentar a taxa de mutações numa célula, a inflamação pode fornecer moléculas bioativas ao microambiente do tumor que servem como efetores da progressão tumoral [16].

A formação e a progressão tumoral depende em grande escala de mutações em genes chave para a aquisição dos vários marcos do cancro aqui descritos. No entanto, todas as células têm mecanismos de regulação que detetam erros no DNA e os reparam, reduzindo assim a taxa de mutações numa célula. Foi então proposto que as células tumorais conseguem aumentar a sua mutabilidade através do colapso de componentes específicos dos sistemas de manutenção do DNA [17]. Outra forma de instabilidade genómica está ligada ao ganho e perda de porções de cromossomas que além de resultar numa variabilidade cariotípica, resulta na alteração do número de cromossomas numa célula – aneuploidia [18]. A instabilidade cromossómica (CIN, de *chromosome instability*) pode resultar de erros num mecanismo de regulação, o *checkpoint* mitótico, que controla a correta segregação dos cromossomas durante a mitose (secção 1.3.1.).

1.2 Ciclo Celular

O ciclo celular é o processo vital pelo qual uma célula cresce e dá origem a duas células filhas com o mesmo conteúdo genético, sendo por isso essencial à preservação

das características de uma espécie. Este ciclo é constituído pela interfase e pela mitose, seguida pela citocinese (figura 1.2). A interfase é constituída pela fase S, quando ocorre a síntese de DNA, e pelas fases G1 e G2, momentos de preparação para a duplicação do conteúdo genético e para a entrada em mitose, respetivamente, em que ocorre o crescimento celular e a duplicação do conteúdo proteico e de organelos [8]. Durante a mitose ocorre a divisão do conteúdo genético da célula, que é seguida pela separação física das duas células filhas (citocinese). Após a citocinese, quando as

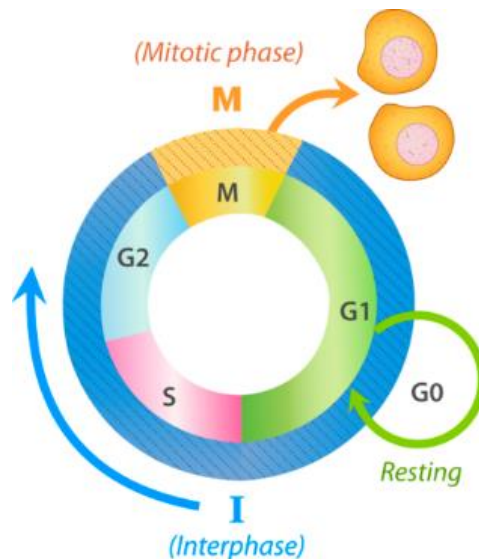


Figura 1.2 Ciclo celular. O ciclo celular é constituído pela interfase (G1, S e G2) e pela mitose, podendo existir uma fase G0.

condições extracelulares são desfavoráveis ou quando as células atingem o limite de diferenciação, estas podem ingressar numa fase designada de G0. Nesta fase, as células tornam-se quiescentes, ou seja, não crescem nem se dividem mas continuam viáveis e exercendo as suas funções. Algumas células permanecem em G0 até à sua morte, como os neurónios, ou re-entram em G1, como os hepatócitos, caso as condições se tornem favoráveis, como na presença de fatores de crescimento ou de estímulos de proliferação.

1.2.1 Mitose

A mitose divide-se em 5 fases: profase, prometafase, metafase, anafase e telofase (figura 1.3) [8]. A profase marca o início da mitose com a condensação dos cromossomas e com a migração dos dois centrossomas para pólos opostos da célula. Durante a prometafase, o envelope nuclear é degradado e o fuso mitótico começa a formar-se, promovendo a ligação entre os microtúbulos e os cinetocoros de cada cromátídeo irmão. À medida que essa ligação acontece, os cromossomas vão sendo alinhados bipolarmente na placa equatorial, completando a metafase. Segue-se a anafase, processo durante o qual cada cromátídeo irmão é puxado para pólos opostos da célula, através do encurtamento dos microtúbulos e pela ação da dineína citoplasmática (proteína motora). Na telofase volta-se a formar o envelope nuclear à volta de cada conjunto de cromossomas, que começa a descondensar. Por fim, durante a citocinese, forma-se um anel contráctil de actina e miosina que divide o citoplasma e vai fechando até as duas células filhas estarem separadas.

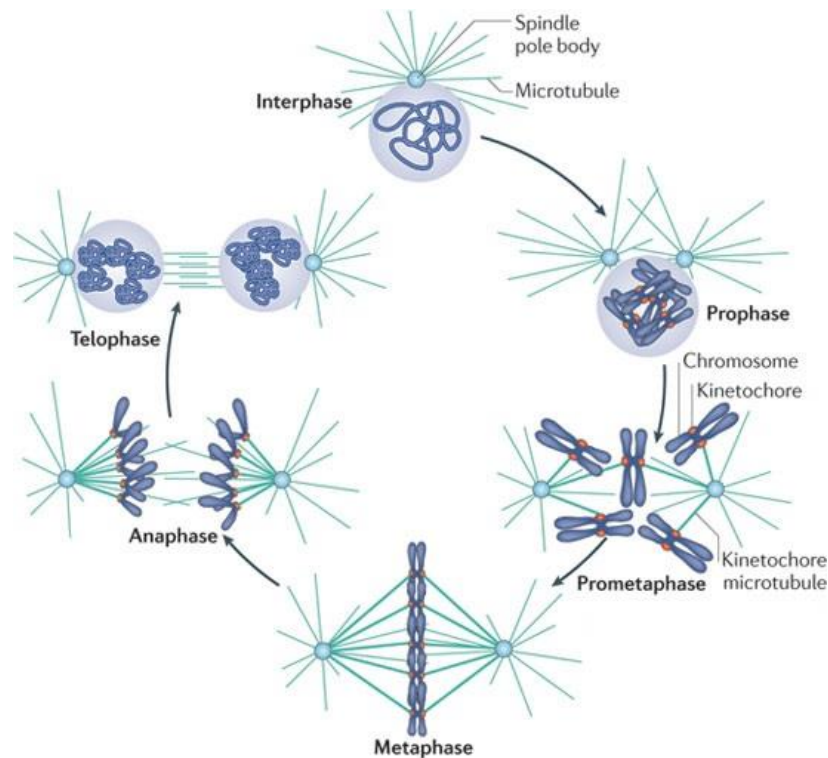


Figura 1.3 Mitose. Durante a interfase, a célula cresce e duplica o seu conteúdo. A célula inicia a mitose na profase, com a condensação dos cromossomas e com a migração dos centríolos para pólos opostos na célula. Segue-se a prometáfase que é marcada pela fragmentação do envelope nuclear e pela formação do fuso mitótico, dando início à ligação entre microtúbulos e cromossomas, através do cinetocoro. A correta ligação entre microtúbulos e cromossomas e o correto alinhamento destes na placa equatorial do fuso completa a metafase. Durante a anafase, os cromatídeos irmãos migram para pólos opostos da célula, dando início à telofase, que é caracterizada pela formação de um novo envelope nuclear à volta de cada conjunto de cromatídeos irmãos e pela descondensação destes (adaptado de Cheeseman, 2008).

1.3 Regulação do ciclo celular

Sendo o ciclo celular um processo crucial para a manutenção da vida, este tem de ser amplamente regulado para evitar a propagação de erros, tais como danos no DNA e números aberrantes de cromossomas, nas gerações seguintes. Um dos mecanismos que regula a progressão da célula pelo ciclo celular envolve a atividade das ciclinas e das Cdk (Cyclin-dependent kinase) (figura 1.4 A). As ciclinas são proteínas que respondem a sinais mitogénicos e associam-se às Cdk, ativando-as [20]. O principal alvo desses sinais é a ciclina D que, associada à Cdk4 e à Cdk6, fosforila proteínas como a pRb, resultando na inativação de mecanismos que sustentam a proliferação e na entrada da célula na fase G1. A Cdk2 associa-se às ciclinas E e A em diferentes momentos do ciclo celular. O complexo Cdk2-ciclina E promove a progressão da célula da fase G1 para a fase S, enquanto o complexo Cdk2-ciclina A fosforila diversas proteínas envolvidas na fase S, nomeadamente na replicação e reparação de DNA. A Cdk1 é a cinase essencial para a

entrada da célula em mitose. A sua associação com as ciclinas A e B promove a progressão pela fase G2 e a transição G2-mitose (M). Além disso, o complexo Cdk1-ciclina B está envolvido na condensação dos cromossomas, na desintegração do complexo de Golgi e na fragmentação do envelope nuclear. A regulação através da interação entre Cdks e ciclinas é conseguida através da degradação cíclica das ciclinas, pela ação de ubiquitina ligases, que as marcam para serem clivadas pelo proteossoma, em momentos específicos do ciclo celular.

Nas células eucariotas, existe também um conjunto de quatro mecanismos de controlo chamados *checkpoints*, que promovem a progressão do ciclo celular (figura 1.4 B) [8]. O *checkpoint* no final da fase G1, também denominado ponto de restrição, assegura a integridade do DNA antes deste ser replicado durante a fase S [21]. Caso sejam detetados danos no DNA, o ciclo celular é interrompido até que estes sejam reparados, impedindo assim a replicação de DNA danificado. O *checkpoint* da fase S assegura que a replicação do DNA é feita corretamente, inibindo-a sempre que são detetados erros durante este processo [22]. O *checkpoint* que controla a transição G2/M impede a entrada da célula na mitose caso sejam detetados erros após replicação do DNA, prevenindo a divisão de cromossomas com conteúdo genómico aberrante [23]. O *checkpoint* mitótico, que controla a correta segregação dos cromossomas na transição metafase-anáfase, bloqueia a progressão para a anáfase até que todos os cromossomas estejam corretamente ligados aos microtúbulos do fuso mitótico e alinhados na placa equatorial (secção 1.3.1) [24].

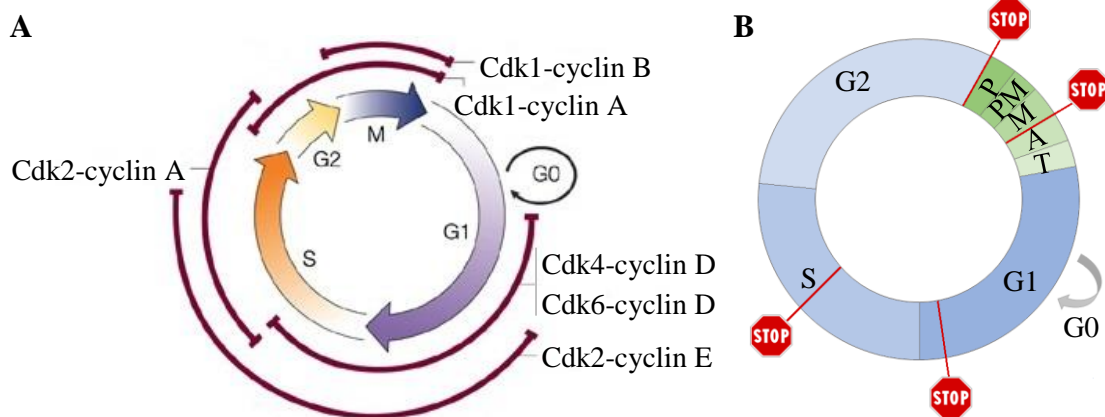


Figura 1.4 Regulação do ciclo celular. (A) A formação e a degradação cíclica dos complexos Cdk-ciclina promovem a progressão pelo ciclo celular (adaptado de Adams, 2004). (B) Os *checkpoints*, representados pelos sinais STOP, atuam durante a transição G1-S, a fase S, a transição G2-mitose e a transição metafase-anáfase, impedindo a progressão pelo ciclo celular quando são detetados erros, até que estes sejam corrigidos. P – profase; PM – prometáfase; M – metáfase; A – anáfase; T - telófase.

1.3.1 Checkpoint Mitótico

O *checkpoint* do fuso mitótico (SAC, de *Spindle Assembly Checkpoint*), ou *checkpoint* mitótico, é o mecanismo de controlo que assegura a correta segregação dos cromossomas através do atraso da mitose, até que estes formem ligações bipolares com os microtúbulos do fuso mitótico e sejam corretamente alinhados na placa equatorial do fuso. A ativação do SAC é desencadeada pelo cinetocoro, complexo proteico localizado na região centromérica do cromossoma, que difunde um sinal de “espera” e promove a formação do complexo do *checkpoint* mitótico (MCC, de *Mitotic Checkpoint Complex*), constituído pelas proteínas Bub3, Mad2, BubR1 e Cdc20 (figura 1.5 A) [26]. Este complexo inibe a ubiquitina ligase APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) ao impedir a sua ligação com a proteína Cdc20. Para acelerar a formação do MCC, o sinal inibidor de “espera” é amplificado através do modelo da Mad2. De acordo com este modelo, no cinetocoro está presente um complexo formado pela Mad1 e pela Mad2 na conformação fechada (C-Mad2) que recruta a Mad2 na conformação aberta (O-Mad2) e promove a sua conversão para C-Mad2, a forma ativa [27]. A C-Mad2 interage com a Cdc20 de modo a formar o complexo C-Mad2-Cdc20 que, por ser estruturalmente semelhante ao complexo C-Mad2-Mad1, vai para o citosol e promove a conversão de mais O-Mad2 em C-Mad2, resultando na diminuição dos níveis de Cdc20 livre no citosol e na consequente amplificação do sinal inibidor. Recentemente, Izawa *et al* sugeriu que a rápida inibição da APC/C deve-se à capacidade do MCC em inibir a APC/C já ligada à Cdc20, sem que para isso seja necessária sinalização adicional proveniente do cinetocoro, contribuindo para a eficiência do SAC [28]. Durante a ligação dos cinetocoros aos microtúbulos, as proteínas BubR1 e Plk1, tal como a proteína Spindly e o complexo RZZ (formado pelas proteínas Rod, Zw10 e Zwilch), cooperam no sentido de estabilizar a interação cinetocoros-microtúbulos [29, 30]. Após o correto alinhamento dos cromossomas na placa equatorial, o MCC é desagregado e o SAC é silenciado. Um dos mecanismos pelo qual ocorre o silenciamento do SAC é através do transporte das proteínas que o integram pela proteína motora dineína, dos cinetocoros para os pólos do fuso mitótico [31, 32]. O recrutamento da dineína para o cinetocoro é dependente da proteína Spindly [33]. Após o silenciamento do SAC, a Cdc20 fica livre para ativar a APC/C, que marca a securina e a ciclina B para degradação pelo proteossoma (figura 1.5 B). A degradação da securina liberta a separase, que cliva as coesinas que mantêm os cromátídeos irmãos ligados. A degradação da ciclina B liberta a Cdk1 que fica inativa, promovendo assim a saída da mitose.

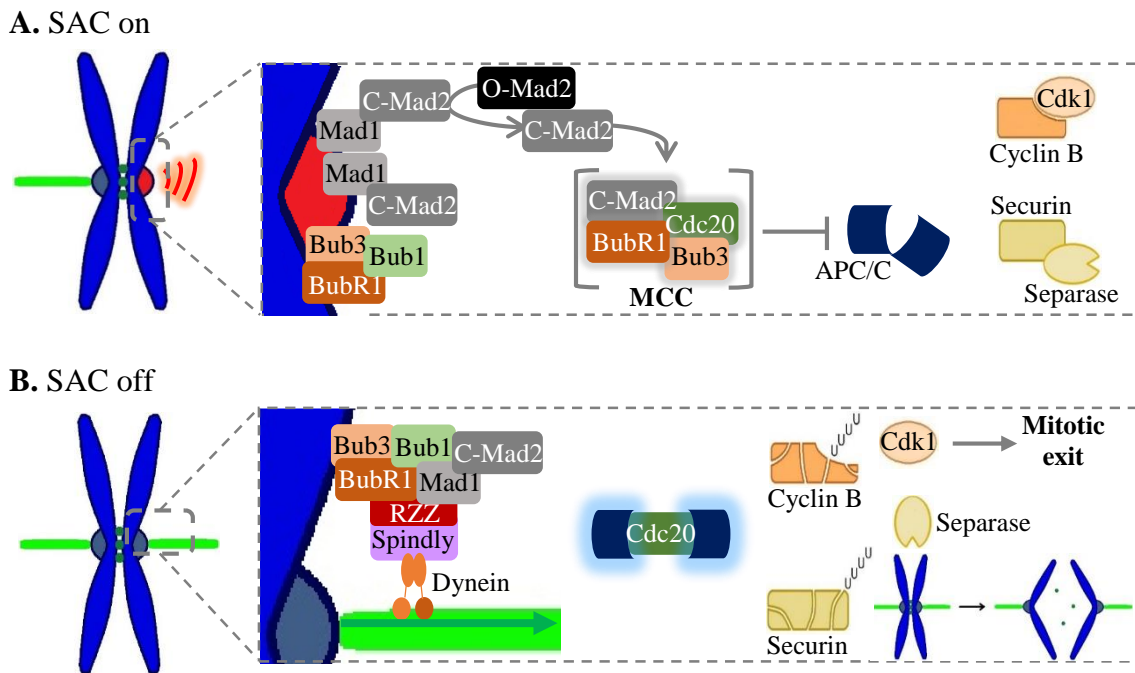


Figura 1.5 Funcionamento do checkpoint mitótico. (A) O cinetocoro livre desencadeia um sinal de “espera” que ativa o SAC e promove a formação do MCC, constituído por C-Mad2, Bub3, BubR1 e Cdc20, prevenindo a ativação da APC/C. (B) Após a correta ligação do cinetocoro ao microtúbulo, o SAC é silenciado através da Spindly, que recruta a Dineína para o cinetocoro. A Spindly, juntamente com o complexo RZZ e com as proteínas C-Mad2, Mad1, Bub3, Bub1, BubR1, são transportadas para o pólo mitótico, enquanto a Cdc20 livre ativa a APC/C, que marca a Securina e a Ciclina B para degradação, promovendo a separação dos cromatídeos irmãos e a saída da mitose, respetivamente.

Além das proteínas já mencionadas, existem outras com papéis igualmente importantes no SAC. Entre elas estão as proteínas Bub1, Mps1, Aurora B e Cenp-E, e o complexo Ncd80. A proteína Bub1, que é recrutada para o cinetocoro livre no início da profase, recruta outras proteínas envolvidas no SAC, como a Mad1, Mad2, BubR1 e Bub3 [24]. Adicionalmente, a Bub1 promove a fosforilação da Cdc20, contribuindo para a inibição da APC/C [34]. A proteína Mps1 participa no recrutamento das proteínas Mad1 e Mad2 para o cinetocoro [35]. A Aurora B corrige eventuais erros que possam ocorrer durante a ligação entre microtúbulos e cinetocoros [36]. A proteína motora Cenp-E contribui para o correto alinhamento dos cromossomas na placa equatorial do fuso mitótico e ativa a cinase BubR1 [37]. O complexo Ncd80, constituído pelas proteínas Hec1, Nuf2, Spc25 e Spc24, é necessário ao recrutamento das proteínas Mad1, Mad2 e Mps1 para os cinetocoros livres [38].

1.4 SAC e Cancro

A aneuploidia, que é definida por um número anormal de cromossomas, é uma característica comum à maior parte dos tumores sólidos humanos e está associada à resistência a alguns agentes quimioterápicos [39, 40]. Um dos fatores associados ao aparecimento de aneuploidia é a CIN, que está associada a um SAC deficiente [41]. Apesar de mutações em componentes do SAC terem sido reportadas como eventos raros, tem sido observada a desregulação de várias proteínas envolvidas neste mecanismo (tabela 1.1) [42]. Por exemplo, a sobre-expressão das proteínas Bub1 e BubR1 mostrou estar associada a um mau prognóstico no carcinoma da tiroide devido aos elevados níveis destas proteínas em carcinomas mais agressivos, que apresentavam metástases distantes e maiores taxas de recorrência local e morte dos pacientes [43]. Curiosamente, no cancro colorectal, a baixa expressão destas proteínas está também associada à formação de metástases e à reincidência dos tumores [44]. No entanto, atendendo a que se tratam de neoplasias diferentes, podem ter diferentes vias alteradas que contribuam para o desenvolvimento destas características. A proteína Mad1 foi reportada como estando associada a um mau prognóstico por promover a aneuploidia e a CIN através da má localização da proteína Mad2 [45]. Deste modo é esperado que também a desregulação da Mad2 esteja associada a um mau prognóstico. De facto, vários estudos em diferentes tipos de tumores mostram essa associação [43, 46-50]. No entanto, a sobre-expressão da Mad2 foi também associada, em alguns tumores, ao início da tumorigénese, sugerindo que a sua desregulação promove o desenvolvimento e a progressão tumoral [50-52]. A sobre-expressão da proteína Cdc20 está associada a cancros mais agressivos com um mau prognóstico e foi reportada por promover a transição prematura da metafase para a anafase, a má segregação dos cromossomas e, conseqüentemente, a aneuploidia [53-59]. Estes resultados são consistentes com o papel da Cdc20 na ativação do complexo APC/C, que leva à saída da célula da mitose. Também a Aurora B está associada a um mau prognóstico em vários tipos de cancro [60-62]. No carcinoma oral escamoso, a sobre-expressão desta proteína foi corelacionada com a proliferação celular, com a indução de células multinucleadas, com a diferenciação histológica e com o desenvolvimento de metástases [63]. A sobre-expressão da proteína Mps1 foi reportada como promotora de instabilidade genómica e, conseqüentemente, da tumorigénese em linhas celulares de cancro colorectal [64]. A proteína Plk1 foi reportada como tendo um papel no desenvolvimento e progressão de vários cancros, por ter sido mostrado que os níveis desta proteína aumentam de acordo com a agressividade do tumor, tendo sido também

associada ao desenvolvimento de metástases [65-73]. Com base nestes resultados, a Plk1 foi sugerida como um potencial marcador para identificar pacientes em risco de apresentarem metástases. No cancro do ovário, a proteína Hec1 foi também associada à progressão tumoral e a um mau prognóstico [74]. Estes estudos corroboram a importância do SAC no ciclo celular e na progressão de neoplasias, sendo por isso considerado um alvo terapêutico promissor no tratamento de diversos tipos de cancro.

Tabela 1.1 Proteínas do SAC que estão desreguladas em vários tipos de cancro.

Proteína	Expressão	Tipos de cancro	Referências
Bub1	Aumentada/ Diminuída	Coloretal, gástrico, glândula salivar, glioblastoma, mama, renal, tiroide	[43, 44, 75-78]
BubR1	Aumentada/ Diminuída	Bexiga, coloretal, esofágico, hepatocelular, gástrico, glândula salivar, glioblastoma, leucemia mieloide aguda, mama, oral escamoso, ovário, pancreático, próstata, pulmão, renal, tiroide	[43, 75-77, 79-91]
Bub3	Aumentada/ Diminuída	Coloretal, gástrico, glândula salivar, glioblastoma, mama	[75-78, 92]
Mad1	Aumentada	Coloretal, glioblastoma, mama, renal	[45, 46, 78, 91]
Mad2	Aumentada/ Diminuída	Bexiga, células escamosas, coloretal, esofágico, glândula salivar, glioblastoma, hepatocelular, mama, osteossarcoma, pancreático, pulmão, renal, retinoblastoma, tiroide	[43, 46-52, 78, 81, 88, 91, 93]
Cdc20	Aumentada/ Diminuída	Bexiga, cabeça e pescoço, células escamosas, cervical, coloretal, gástrico, glioblastoma, hepatocelular, leucemia, mama, oral escamoso, pancreático	[52-59, 78, 94, 95]
Aurora B	Aumentada/ Diminuída	Astrocitoma, coloretal, endometrial, melanoma, oral escamoso, próstata, pulmão, seminoma, tiroide	[60-63, 80, 96-99]
Mps1	Aumentada	Coloretal, glioblastoma, mama	[46, 64, 78]
Plk1	Aumentada/ Diminuída	Bexiga, cervical, coloretal, endometrial, esofágico, gástrico, glioblastoma, hepatocelular, leucemia, mama, melanoma, ovário, pancreático, pulmão, tiroide	[53, 65-73, 100-104]
Hec1	Aumentada	Glioblastoma, ovário	[46, 74]
Cenp-E	Aumentada	Glioblastoma, melanoma	[46, 96]

1.4.1 SAC como alvo terapêutico

Devido ao papel que o SAC tem na formação e desenvolvimento de tumores, este tem surgido como um alvo terapêutico promissor no tratamento do cancro. Alguns estudos têm explorado o benefício da inibição de várias proteínas envolvidas no SAC através do uso de pequenas moléculas ou de RNA de interferência (RNAi). Por exemplo, a inibição das proteínas Bub1, Bub3, Cenp-E, Mad2, e Zw10 em linhas celulares primárias de fibroblastos humanos através de siRNA promoveu a segregação deficiente dos cromossomas, levando à formação de micronúcleos e ao surgimento de células aneuploides [105]. Além disso, neste estudo observou-se que quanto maior é a instabilidade cromossômica, maior é a taxa de apoptose. O uso de RNAi para inibir as proteínas BubR1 ou Mad2 em linhas celulares cancerígenas provocou uma saída prematura da mitose sem citocinese, com reduplicação do DNA na fase S subsequente, resultando em células com um conteúdo genómico aberrante e, posteriormente, em morte celular [41]. Noutros estudos, a depleção da proteína BubR1 *in vitro* provocou a paragem da mitose, a diminuição da proliferação e da capacidade clonogénica, a inibição do crescimento independente de ancoragem e o aumento de micronúcleos e *in vivo* provocou a inibição do crescimento tumoral e a redução de metástases [77, 106]. A depleção da proteína Mps1 por RNAi em linhas celulares do cancro da mama originou mitoses aberrantes, bem como um decréscimo da viabilidade celular devido à indução da apoptose [107]. O tratamento com a pequena molécula INH1, que interfere com a função da proteína Hec1, em linhas celulares tumorais, promoveu *slippage* (processo pelo qual a célula escapa à mitose num estado poliploide), seguido de morte celular [108]. Além disso, a INH1 inibiu o crescimento de tumores *in vivo*. A inibição da proteína Plk1 por RNAi em linhas celulares de cancro do pulmão, além de ter suprimido o crescimento celular, causou disfunções no ciclo celular, levando à retenção das células na mitose e à morte celular por apoptose [109]. Adicionalmente, a depleção da Plk1 inibiu o crescimento de metástases no fígado em modelos de rato injetados com células tumorais do pulmão. O uso de RNAi contra a proteína Cdc20, em várias linhas celulares cancerígenas, provocou morte celular durante a paragem em mitose, inibiu o *slippage* e suprimiu o crescimento celular [110, 111]. Curiosamente, o mesmo estudo mostrou que a morte celular induzida pela depleção da Cdc20 era independente do SAC. A inibição da família das cinases Aurora, por RNAi ou pelo inibidor VX680, em linhas celulares renais metastáticas, resultou na inibição do crescimento celular, levando a uma paragem em mitose, e na inibição da capacidade de invasão [112]. O conjunto destes estudos mostra

que o aumento da instabilidade genómica através da inibição de proteínas do SAC pode ser uma estratégia para promover a morte celular de células cancerígenas, sendo por isso uma abordagem promissora no tratamento do cancro.

1.5 Agentes Antimitóticos

A quimioterapia continua a ser a terapia mais utilizada no tratamento do cancro, de forma isolada ou em combinação com terapias dirigidas. Os quimioterápicos mais utilizados pertencem à classe dos agentes antimitóticos, cuja principal função é inibir a progressão da mitose. As principais classes de agentes antimitóticos são os taxanos (taxol e docetaxel) e os vinca alcaloides (vinblastine, vincristine e vinorelbine) [113]. Ambas as classes interferem com a dinâmica dos microtúbulos, componentes do citoesqueleto constituídos por heterodímeros de tubulina α/β que afetam a forma, o transporte, a motilidade e a divisão celular [114]. Contudo, enquanto os taxanos estabilizam os microtúbulos através da sua polimerização, os vinca alcaloides destabilizam-nos através da sua despolimerização [115, 116]. A alteração desta dinâmica resulta em erros de ligação entre os microtúbulos e os cinetocoros, impedindo a congressão dos cromossomas na placa equatorial do fuso mitótico, levando à ativação do SAC e à consequente paragem das células em mitose [117]. Uma vez que as células inativam a transcrição e a síntese proteica no início da mitose, estas não conseguem ficar paradas indefinidamente nesta fase do ciclo celular. Assim, as células tratadas com drogas que interferem com os microtúbulos, depois de pararem em mitose, podem seguir dois caminhos distintos:

(1) morte celular ou (2) *slippage*. Caso a célula percorra o segundo caminho, esta pode ativar mecanismos de morte celular, pode entrar em senescência, ou pode continuar o ciclo celular com um conteúdo genómico aberrante (figura 1.6).

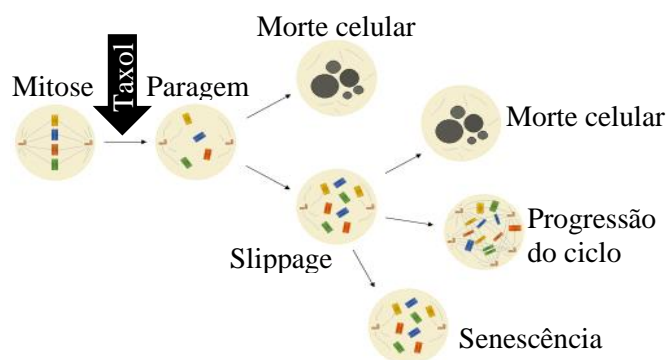


Figura 1.6 Mecanismo de ação do taxol. O taxol provoca uma paragem das células em mitose que resulta em morte celular ou em *slippage*. As células que seguiram a via do *slippage* podem ativar uma mecanismo de morte celular, progredir com o ciclo celular com um conteúdo genómico aberrante ou podem-se tornar senescentes.

Os agentes antimitóticos têm mostrado a sua eficácia ao longo dos anos, contudo, não tem sido suficiente para baixar a incidência e a mortalidade associadas ao cancro. De facto existem várias limitações associadas ao uso destes fármacos que limitam a sua

eficiência, como os efeitos secundários e a aquisição de resistência ao tratamento. Os efeitos secundários mais frequentes estão associados à toxicidade hematológica e neurológica [118, 119]. No entanto, a resistência é o principal fator para a limitação da eficiência destas drogas. O mecanismo de resistência mais conhecido é a sobre-expressão de bombas de efluxo de drogas, que causa a diminuição da concentração intracelular da droga através do seu transporte para o meio extracelular [120].

1.6 Objetivos

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo a segunda principal causa de morte em Portugal [121, 122]. Apesar de todo o avanço tecnológico no desenvolvimento de novos fármacos e moléculas anticancerígenas, estes continuam a apresentar várias limitações, nomeadamente a elevada toxicidade e a resistência ao tratamento, o que se reflete na sua eficácia. Por esse motivo, mantém-se urgente a necessidade de encontrar novos alvos terapêuticos para travar o cancro. Neste trabalho participámos num rastreio de compostos em colaboração com o Departamento de Bioquímica da *Oxford Brookes University*, que visava identificar potenciais inibidores da proteína do *checkpoint* BubR1, com base na estrutura tridimensional desta proteína cinase. Esta abordagem permite criar ligandos com uma elevada afinidade para o recetor e com a capacidade de modular processos celulares de interesse com sucesso, de modo a garantir o efeito terapêutico desejado [123]. A BubR1 surge como um potencial alvo no tratamento do cancro devido à sua desregulação em várias neoplasias (tabela 1.1), que está associada a um mau prognóstico da doença, e ao papel que desempenha durante a mitose, particularmente na ativação do SAC e na estabilização das interações microtúbulo-cinetocoro. Assim, o primeiro objetivo deste trabalho é identificar compostos que sejam capazes de inibir a função da BubR1.

Uma das características do cancro é a instabilidade genética, que pode resultar de falhas no SAC. Diversos estudos realizados tanto em linhas celulares tumorais, como em tecidos tumorais apontam para uma desregulação dos níveis de expressão de componentes envolvidos na via molecular do SAC (tabela 1.1) e fazem uma associação com a resistência aos fármacos utilizados nos tratamentos atuais. Por exemplo, a CIN associada ao SAC foi reportada como mediadora do desenvolvimento de resistência em células tumorais previamente tratadas com agentes, como a cisplatina, a doxorubicina ou o taxol. Deste modo, surgiu a segunda hipótese deste estudo: o silenciamento do SAC e a saída da mitose seriam potenciais alvos terapêuticos no tratamento do cancro. Para testar esta

hipótese, este estudo incidiu na depleção por RNAi da proteína Cdc20, envolvida na saída da mitose, e da proteína Spindly, envolvida no silenciamento do SAC, em linhas celulares tumorais. Com a depleção da Cdc20 é esperado que as células não consigam sair da mitose e que ativem mecanismos de morte celular durante a sua paragem nesta fase, exibindo um efeito antiproliferativo. Atendendo à função que a Spindly desempenha na inativação do SAC, espera-se que a sua depleção provoque igualmente uma retenção das células na mitose, levando-as a ativar mecanismos de morte celular, sendo por isso pertinente explorar o seu potencial terapêutico.

Uma vez que os agentes antimitóticos, como o taxol, interferem na dinâmica dos microtúbulos, despoletando a ativação do SAC, este estudo focou-se também na avaliação da capacidade deste mecanismo em modular o efeito antiproliferativo destes agentes. Assim surgiu a última hipótese deste estudo: a depleção de proteínas envolvidas na saída da mitose ou no silenciamento do SAC seria um meio viável para sensibilizar as células cancerígenas à ação do taxol. Para testar esta hipótese, após a depleção das proteínas Cdc20 ou Spindly, as células foram tratadas com diferentes concentrações de taxol. Com esta abordagem é esperado que as células não consigam prosseguir com a mitose, como é observado em células que adquirem resistência ao taxol, e que haja um efeito sinérgico entre a depleção destas proteínas e o taxol que resulte na ativação de mecanismos de morte celular.

Resumidamente, os objetivos deste trabalho são: (1) rastrear e identificar compostos com atividade inibidora da proteína BubR1; (2) avaliar a depleção das proteínas Cdc20 e Spindly como potencial abordagem terapêutica e (3) avaliar o efeito antiproliferativo do tratamento de combinação da depleção das proteínas Cdc20 e Spindly com taxol.

2. Materiais e Métodos

2.1 Desenho Experimental

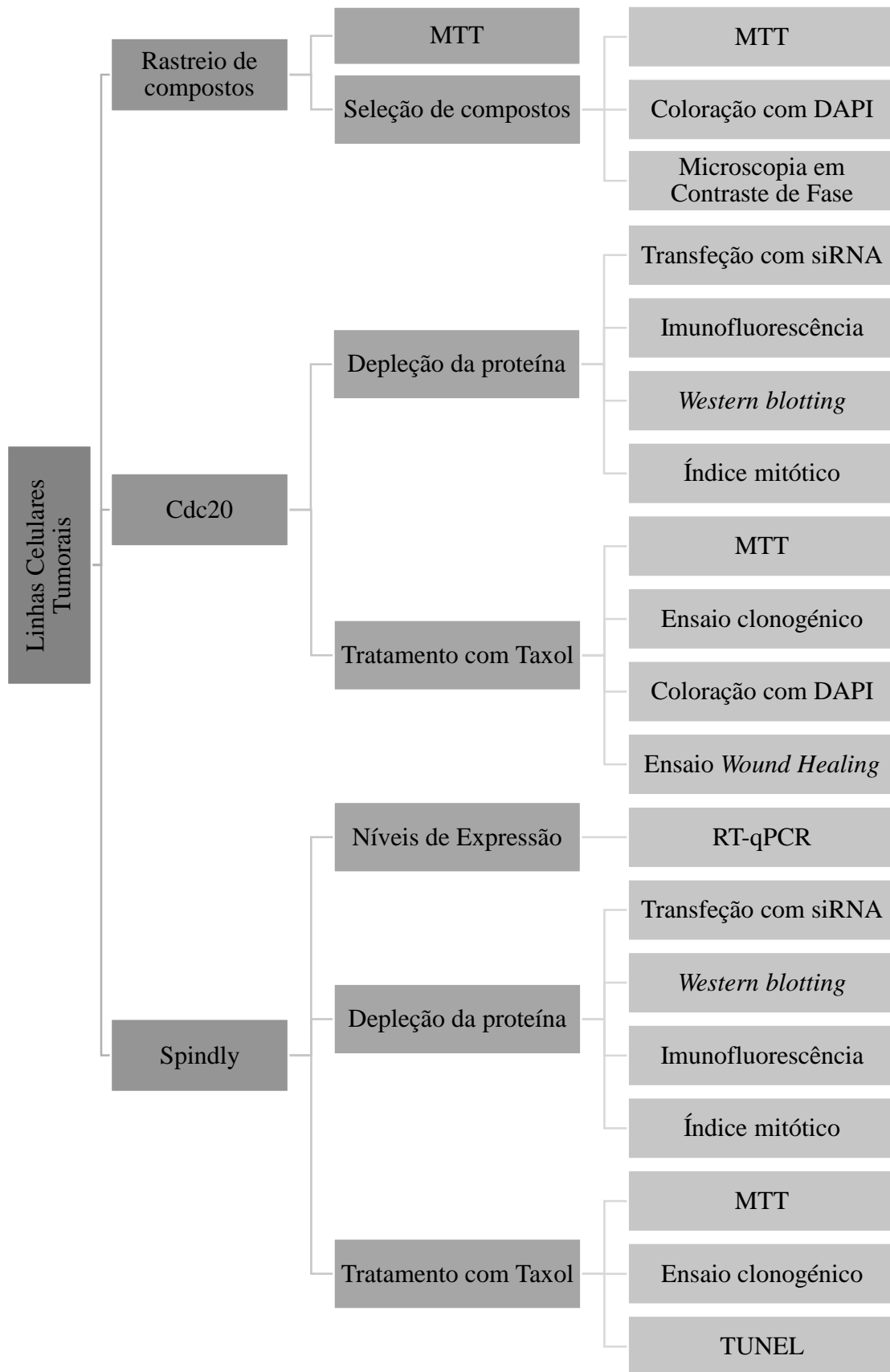


Figura 2.1 Diagrama do plano experimental realizado neste trabalho.

2.2 Linhas celulares

Neste estudo foram utilizadas uma linha celular humana de cancro cervical, HeLa (Instituto de Medicina Molecular de Lisboa), duas linhas celulares humanas de glioblastoma, U373 e U251 (cedidas por Rui Reis, Instituto de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade do Minho), uma linha celular humana de cancro do pulmão NCI-H460 (Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto) e uma linha humana de células alveolares pulmonares normais, HPAEpiC (ScienCell).

2.3 Condições de cultura

O stock de células foi mantido em monocamada em frascos de cultura T25 (25 cm² de área, VWR). As linhas U373 e U251 foram cultivadas com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Biochrom GmbH) enriquecido com 10% (v/v) de Soro Bovino Fetal (FBS de *Fetal Bovine Serum*; Superior Biochrom GmbH) e com 1% (v/v) de antibiótico antimicótico (100U/ml penicilina, 0,1mg/ml streptomina, 0,25µg/ml anfotericina; Lonza). A linha HPAEpiC foi cultivada com meio *Alveolar Epithelial Cell Medium* (AEpiCM; ScienCell). A linha NCI-H460 foi cultivada com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI; Lonza) enriquecido com 5% (v/v) de FBS. Todas as linhas celulares foram mantidas numa incubadora (Heraeus Hera Cell) a 37°C com uma atmosfera húmida e 5% de CO₂.

Para promover o crescimento exponencial e evitar restrições de espaço e nutrientes, sempre que os frascos de cultura apresentaram cerca de 80% de confluência, as células foram subcultivadas num novo frasco T25 contendo meio de cultura novo.

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação das células foram realizados numa câmara de segurança biológica de nível II com fluxo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P), de modo a proporcionar-se um ambiente asséptico.

2.3.1 Subcultura de Células

Antes de se iniciar qualquer procedimento, a morfologia das células e o aspeto geral da cultura foi observada ao microscópio de contraste de fase invertido (Zeiss Primo Vert).

O meio de cultura foi removido dos frascos de cultura, a monocamada celular foi lavada com uma solução tampão de fosfato isosmótica (PBS; NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, pH7,4) e foi adicionada uma solução da protease tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) para promover o destacamento das células. Estas foram incubadas a 37°C durante 3-4 minutos. Observou-se ao microscópio o completo destacamento das

células e a ação enzimática da tripsina foi inibida pela adição de meio de cultura suplementado com FBS, que inclui na sua composição inibidores de proteases. De acordo com a taxa de crescimento de cada linha celular, foi feita uma diluição em meio de cultura num novo frasco de cultura. Todas as soluções foram previamente aquecidas a 37°C (Precistern).

Aquando a necessidade de plaquear um determinado número de células, é necessário determinar a densidade celular. Para isso, após a obtenção da suspensão celular, foram recolhidos 30 µl de suspensão e adicionados 30 µl de 0,4% (v/v) corante azul de Tripano (Sigma-Aldrich). O azul de Tripano é um corante por exclusão que permite a distinção das células mortas das células viáveis. Este efeito deve-se à internalização deste corante apenas pelas células mortas, uma vez que as células viáveis têm a membrana celular intacta que impede a sua incorporação. A contagem foi realizada numa câmara de Neubauer (Superior Marienfeld) recorrendo ao microscópio invertido de contraste de fase com uma objetiva 10x. A densidade celular foi calculada a partir da seguinte expressão:

$$\text{Densidade celular (n}^\circ \text{ células/ml)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total células contadas}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Quando as experiências foram realizadas em placas de 6 poços, plaquearam-se $0,045 \times 10^6$ de células U251 por poço, $0,1 \times 10^6$ de células U373 por poço e $0,12 \times 10^6$ de células NCI-H460 por poço. Quando foram usadas placas de 96 poços, plaquearam-se $0,0045 \times 10^6$ de células U251 por poço, $0,006 \times 10^6$ de células U373 por poço e $0,005 \times 10^6$ de células NCI-H460 por poço.

2.4 Congelação e Descongelação de Células

A fim de manter um stock de células viáveis com o menor número de passagens possível, estas foram congeladas e mantidas em azoto líquido, para se manterem viáveis durante longos períodos de tempo, ou a -80°C, para períodos mais curtos. Durante o processo de congelação, o conteúdo de um frasco T25 com cerca de 85% de confluência foi tripsinizado e a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm, durante 5 minutos, à temperatura ambiente (Heraeus Biofuge Primo R). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento uma solução de congelação constituída por 10% (v/v) DMSO (Acros Organics) em meio de cultura da própria linha celular. O sedimento foi ressuspendido e transferido para um criotubo (Thermo Scientific). Este foi colocado a -80°C num contentor de congelação com isopropanol (Nalgene® Mr. Frosty® Crio 1°C

Freezing Container) para uma diminuição gradual da temperatura (1°C por minuto), permitindo um amolecimento mais suave do metabolismo celular e promovendo, deste modo, a viabilidade das células. Após 24 horas, o criotubo foi transferido para azoto líquido.

No processo de descongelamento de células, o criotubo foi rapidamente transferido de azoto líquido ou -80°C para um banho-maria regulado para 37°C. Após a descongelamento do conteúdo, este foi transferido para um tubo de centrífuga contendo 5 ml de meio. A suspensão resultante foi centrifugada a 1000 rpm, durante 5 minutos, à temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado de forma a remover o DMSO. Adicionou-se 5 ml de meio ao sedimento e homogeneizou-se. A suspensão celular foi passada para um frasco T25 e incubada a 37°C, com 5% de CO₂. As células foram monitorizadas para analisar o crescimento das mesmas e mudar o meio sempre que necessário.

2.5 Extração de RNA total

Com o objetivo de avaliar os níveis de expressão de RNA mensageiro (mRNA) foi extraído RNA total das linhas celulares a testar. Obtida a suspensão celular através do processo de tripsinização, a suspensão foi centrifugada a 1000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento 1 ml de PureZol™ RNA Isolation Reagent (Bio-Rad), que foi homogenizado e deixado a incubar durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio (Sigma-Aldrich) sob agitação vigorosa e a mistura foi incubada durante 5 minutos, à temperatura ambiente, agitando periodicamente. A amostra foi centrifugada a 12000 xg, durante 15 minutos, a 4°C. Sem perturbar a interfase, a fase aquosa foi recolhida para um novo tubo, ao qual foram posteriormente adicionados 500 µl de isopropanol (Fisher Chemical). Após agitar vigorosamente a amostra e incubá-la durante 5 minutos, à temperatura ambiente, esta foi centrifugada a 12000 xg durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, deixando ficar o RNA em forma de pellet, que foi lavado com 1 ml de 75% etanol (Panreac) e centrifugado a 7500 xg durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento deixado a secar ao ar. De seguida foram adicionados 20 µl de água ao RNA, tendo este sido ressuscitado, homogeneizado e aliquoteado.

A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi corrido a 90 v, durante 60 minutos, e analisado sob luz UV no densitómetro Doc™ XR (BioRad).

Para avaliar a quantidade de RNA extraído, a amostra foi analisada no espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific).

Durante todo o procedimento foram utilizados equipamentos e soluções RNase-free.

2.6 Síntese de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA extraído no ponto anterior, de forma a ser posteriormente analisado por *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-qPCR). Na execução desta síntese foi utilizado o kit *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Para cada linha celular, foi preparada uma mistura de reação contendo 10 µl de *master mix*, 2 µl de *enzyme mix*, 1 µg de RNA e 7 µl de água. As misturas preparadas foram colocadas num termociclador MJ Mini™ (Bio-Rad) de acordo com o seguinte programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C, 5 minutos a 85°C. De seguida, foi adicionado 1 µl de RNase para degradar qualquer resto de RNA e a mistura foi colocada novamente no termociclador com o programa: 20 minutos a 37°C. No fim do programa, as amostras foram armazenadas a -80°C.

2.7 RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR foi utilizada com o intuito de avaliar a expressão dos genes de interesse. Para isso, foi utilizado o kit *iQ™ SYBR® Green Supermix* (Bio Rad) e foram preparadas misturas de reação para cada sequência de mRNA a analisar (sequência de interesse e sequência de referência) e para cada controlo (*RNA non-template control*). Cada mistura foi composta por 12,5 µl de *iQ SYBR Green SuperMix*, 0,25 µl de *forward primer* 10 µM, 0,25 µl de *reverse primer* 10 µM, 10 µl de água RNase-free e 2 µl de cDNA ou de água. As amostras foram colocadas num termociclador *iQ Thermal Cycler* (Bio-Rad) e analisadas no *software* do aparelho.

2.8 Desenho de Primers

Os primers utilizados no RT-qPCR foram desenhados recorrendo aos programas *Beacon Designer* versão 8.14 e *PerlPrimer* versão 1.1.21 (tabela 2.1). No desenho dos primers teve-se o cuidado de satisfazer determinados critérios: tamanho compreendido entre 18-25 bases, conteúdo em G/C compreendido entre 45-55%, temperatura de fusão entre 50-70°C, tamanho dos fragmentos amplificados entre 80-200pb, primers localizados na junção de exões, primers específicos para os genes em estudo. A síntese dos primers foi realizada pela empresa STABvida (Oeiras, Portugal). Para confirmar a

especificidade e temperatura de emparelhamento e a ausência de DNA genômico, realizou-se um PCR usando como referência a linha celular HeLa.

Tabela 2.1 Sequências oligonucleotídicas dos primers utilizados no RT-qPCR.

Gene	Primer	Sequência oligonucleotídica
Cdc20	<i>Forward</i>	5'-CCAGAGGGTTATCAGAACAG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-CCACAAGGTTTCAGGTAATAGT-3'
Spindly	<i>Forward</i>	5'-CTCAAAGAGGCTGAAGAAGAG-3'
	<i>Reverse</i>	5'-TG TTCATAACTCTCAGTCATGG-3'
Actina	<i>Forward</i>	5'-AATCTGGCACCACACCTTCTA-3'
	<i>Reverse</i>	5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'

2.9 Transfecção com siRNAs

A transfecção de células com *small interfering RNA* (siRNA) teve como objetivo depletar as proteínas Cdc20 e Spindly, recorrendo à utilização de oligonucleótidos de RNA com cerca de 20-25 nucleótidos, dirigidos contra a sequência de mRNA alvo. Como controlo foi utilizada uma sequência aleatória de siRNA sem nenhum alvo específico para garantir que o silenciamento se deve à utilização dos oligonucleótidos contra as sequências de mRNA alvo e não de efeitos não específicos da técnica. Os siRNAs de Cdc20 (siCdc20) e de Spindly (siSpindly) foram obtidos comercialmente (Qiagen FlexiTube) e foram otimizadas as concentrações a utilizar de forma a potenciar a eficácia do silenciamento dos respetivos genes alvo.

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços, a uma densidade otimizada para a linha celular em uso. Após 24 horas, apresentando a cultura cerca de 30-40% de confluência, o meio foi substituído por meio sem antibiótico antimicótico. Foi preparada uma mistura de transfecção tendo a seguinte composição para cada poço a transfetar: 200 µl de meio de cultura não suplementado; 3 µl de siCdc20 40 nM ou 1,5 µl de siSpindly 100 nM; 2,5 µl de INTERFEIn siRNA *Transfection Reagent* (PolyPlus). A mistura foi incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente e adicionada ao poço. As células foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO₂, durante 48 horas.

2.10 Tratamento de lamelas com Poli-L-Lisina

As lamelas foram tratadas com Poli-L-Lisina para promover a adesão das células ao vidro, de modo a evitar perdas significativas de células, sobretudo células mitóticas, durante o seu processamento. Para isso, as lamelas foram incubadas durante 16 horas a 56°C numa solução de HCl 1M. Após o arrefecimento da solução, as lamelas foram

lavadas 5 vezes com água destilada e depois 5 vezes com água bidestilada. Após as lavagens, as lamelas foram mergulhadas numa solução de etanol 100% (Panreac). Uma a uma, as lamelas foram retiradas dessa solução e limpadas em papel. As lamelas foram submersas numa solução de 500 µg/ml Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich) e incubadas com agitação rotativa, durante 1 hora. As lamelas foram novamente lavadas com água destilada e água bidestilada, 5 vezes cada. Seguidamente, as lamelas foram novamente mergulhadas numa solução de etanol 100% e limpadas, uma a uma, em papel.

2.11 Imunofluorescência indireta

A imunofluorescência foi realizada com o intuito de verificar a depleção das proteínas Cdc20 ou Spindly, 48 horas após a transfeção. Para isso, as células plaqueadas em placas de 6 poços, contendo lamelas tratadas com Poli-L-Lisina, foram fixadas com 2% (m/v) Paraformaldeído (PFA; Sigma-Aldrich) em PBS 1x. De seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x, durante 5 minutos, e adicionou-se 0,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em PBS 1x para permeabilizar as membranas celulares. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1x, durante 5 minutos, e as lamelas foram colocadas numa câmara húmida e escura e deixadas a incubar durante 30 minutos com uma solução de bloqueio, contendo 10% FBS em 0,05% Tween20 (Sigma-Aldrich) em PBS 1x, para inibir reações inespecíficas. Removeu-se o excesso da solução de bloqueio das lamelas e adicionaram-se os seguintes anticorpos primários diluídos em 5% FBS em 0,05% Tween20 em PBS (PBST): anti-Cdc20 de rato (Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:1000) ou anti-Spindly de coelho (Sigma, diluição 1:3000), e anti-CREST humano (cedido por Elsa Bronze, IBMC, Porto, Portugal, diluição 1:4500) para marcar os cinetocoros. Os anticorpos primários foram deixados a incubar durante 60 minutos. De seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBST, durante 5 minutos, e incubadas durante 60 minutos com os anticorpos secundários anti-rato Alexa568 (*Molecular Probes*, diluição 1:1500) ou anti-coelho Alexa 568 (*Molecular Probes*, diluição 1:1500) e anti-humano Alexa488 (*Molecular Probes*, diluição 1:1500), diluídos em 5% FBS em PBST. As células foram lavadas 2 vezes com PBST e a última lavagem com PBS 1x, durante 5 minutos, e foram montadas sobre lâminas de vidro contendo 0,2 mg/ml DAPI (Sigma-Aldrich) diluído em meio de montagem Vectashield (*Vector Laboratories Inc.*).

2.12 Preparação de Extratos Proteicos e Quantificação de Proteínas

A fim de se obterem extratos proteicos de células controle e células transfetadas com siRNA foram plaqueadas $0,045 \times 10^6$ células U251 por poço, $0,1 \times 10^6$ células U373 por poço e $0,12 \times 10^6$ células NCI-H460 por poço, numa placa de 6 poços. Passadas 48 horas da transfeção, o meio de cultura foi removido e guardado num tubo de centrífuga, e as células foram tripsinizadas. Após o destacamento das células, a suspensão resultante foi adicionada ao meio reservado no tubo de centrífuga, que foi a centrifugar a 4000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado numa solução contendo tampão de lise (50 mM Tris pH7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100) e um inibidor de proteases (Sigma P8340). De forma a promover a lise celular, a suspensão foi passada várias vezes por uma seringa 19 G e foi incubada no gelo durante 20 minutos. As suspensões celulares foram centrifugadas a 13000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a concentração determinada pelo *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Os extratos foram armazenados a -80°C até à data da sua utilização.

2.13 Western Blotting

O *Western Blotting* foi usado para avaliar a eficiência da depleção da proteína de interesse após transfeção com siCdc20 ou siSpindly.

Os extratos proteicos a serem analisados foram descongelados em gelo e foram diluídos 15 µg de extratos 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 cocktail). As amostras foram aquecidas a 100°C num *Dry Block ThermoStat* (Biosan Bio TDB-100) de modo a promover a desnaturação das proteínas.

Foi utilizado um sistema de eletroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) constituído por um gel resolvente 10% (H₂O ultrapura, 30% poliacrilamida, 1,5 M Tris pH8,8, 10% SDS, 10% PSA, 0,1% TEMED) e um gel de empacotamento 4% (H₂O ultrapura, 30% poliacrilamida, 1 M Tris pH6,8, 10% SDS, 10% PSA, 0,1% TEMED) através do suporte *Mini-Protean 3* (BioRad). De seguida, foram adicionadas a cada poço 15µg de cada amostra e utilizados 3µl do marcador de pesos moleculares (NzyColor Marker II). A eletroforese foi realizada a 200 v. A transferência das amostras para uma membrana de nitrocelulose (Whatman Protran) foi feita a 300 v, durante 1 hora e 15 minutos, com um sistema de transferência *semi-dry*

(Hoefer SemiPhor). Após a transferência, a membrana foi corada com um corante de proteínas reversível Ponceau S (Panreac) para avaliar o sucesso da transferência, e foi posteriormente lavada com *Tris-Buffered Saline Tween20* (TBST). De seguida, a membrana foi incubada com uma solução de bloqueio (5% leite magro em pó em TBST) com agitação suave, durante 60 minutos, e lavada durante 5 minutos por 3 vezes com TBST. Após a lavagem, a membrana foi incubada com os anticorpos primários de interesse, com agitação suave durante 60 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram anti-Cdc20 rato (Santa Cruz *Biotechnology*, diluição 1:1000) ou anti-Spindly coelho (Sigma, diluição 1:3000) e anti-actina rato (Santa Cruz *Biotechnology*, diluição 1:2500) ou anti-tubulina rato (Sigma-Aldrich, diluição 1:5000), consoante se pretendesse confirmar a depleção da Cdc20 ou da Spindly, respetivamente. Os anticorpos anti-actina e anti-tubulina serviram como controlo da quantidade de proteína analisada para permitir a comparação de bandas obtidas dos extratos controlo siRNA e dos extratos siCdc20 ou siSpindly, respetivamente. Todos os anticorpos primários foram diluídos em 1% leite magro em pó em TBST. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBST, durante 5 minutos, e incubada com os anticorpos secundários anti-rato conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (Vector, diluição 1:1500) e/ou anti-coelho conjugado com HRP (Vector, diluição 1:1000), diluídos em 1% leite magro em pó em TBST, com agitação, durante 60 minutos. Por fim, a membrana foi lavada 2 vezes com TBST e 1 vez com PBS 1x, durante 5 minutos. Para o processo de revelação, a membrana foi embebida durante 3 minutos numa solução quimioluminescente (100 mM Tris pH 8,5; 45 mM ácido comárico; 50 mM luminol; 0,25 % (v/v) H₂O₂) e exposta a um filme radiográfico (Kodak Sigma-Aldrich) durante diferentes períodos de tempo, aos quais se seguiu a revelação manual. O filme radiográfico foi colocado num recipiente contendo uma solução de revelação (Kodak Sigma-Aldrich), ao que se seguiu uma lavagem com água, e foi colocado num recipiente contendo uma solução de fixação (Kodak Sigma-Aldrich), seguindo-se outra lavagem com água. Os filmes obtidos foram digitalizados pelo *software* de análise *The Discovery Series™ Quantity One® 1-D*, versão 4.6.1 (Bio-Rad *Laboratories*, Inc.), no densitómetro Doc™ XR (Bio-Rad *Laboratories*, Inc.).

2.14 Determinação do Índice Mitótico

Após a depleção das proteínas Cdc20 e Spindly foi determinado o índice mitótico de células sem tratamento, células tratadas com Nocodazole (Sigma-Aldrich) (controlo positivo – tratamento que induz a acumulação de células mitóticas *a priori*) e células

transfetadas com siCdc20 ou siSpindly. O índice mitótico representa a percentagem de células em mitose na população total de células em cultura. Para tal, as células foram plaqueadas em poços de placas de 6 e, 48 horas após a transfeção, foram contadas ao microscópio de contraste de fase. As células mitóticas foram identificadas pela sua morfologia arredondada em contraste com as células interfásicas que apresentam uma morfologia “estrelada”. O índice mitótico foi determinado pela fórmula:

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{número de células mitóticas}}{\text{número total de células}} \times 100\%$$

2.15 Ensaio MTT

A viabilidade celular após a transfeção com siCdc20 ou siSpindly, sozinha ou em combinação com o taxol, foi determinada com recurso ao ensaio MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) nas linhas celulares U251, U373 e NCI-H460. Este ensaio tem como princípio a redução do composto MTT apenas pelas células metabolicamente ativas, através da ação das enzimas desidrogenases, que geram o composto roxo formazan capaz de ser solubilizado e quantificado por espectroscopia. O ensaio consistiu em adicionar uma solução de 0,5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) em PBS 1x, depois de remover o meio de cultura das células e adicionar meio novo não suplementado. As células foram incubadas durante 4 horas, a 37⁰C, com 5% CO₂, e foi adicionada uma solução detergente (89% isopropanol, 10% Triton X-100, 0,37% HCl) para solubilizar as membranas celulares. A placa com as células plaqueadas foi agitada durante 10 minutos na ausência de luz e foi novamente incubada durante 2 horas. Os valores de absorvância foram lidos a 570 nm num leitor de placas, tendo-se utilizado o meio de cultura das células como valor de branco. Neste ensaio foram analisadas células controlo (sem tratamento), células transfetadas com siCdc20 ou siSpindly durante 96 horas, células tratadas com taxol a 2 nM, 4 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM ou 100 nM durante 48 horas e células expostas à combinação dos dois tratamentos (taxol durante 48 horas, adicionado 48 horas após a depleção das proteínas Cdc20 ou Spindly).

2.16 Ensaio Clonogénico

O ensaio clonogénico foi realizado para determinar o efeito antiproliferativo a longo prazo das linhas celulares U251, U373 e NCI-H460 após o tratamento individual ou de combinação de siCdc20 ou siSpindly com Taxol, através da capacidade de formação de colónias. As células foram plaqueadas e transfetadas em placas de 6 poços, e incubadas

durante cerca de 24 horas a 37⁰C, com 5% de CO₂. De seguida, as células foram tripsinizadas para serem plaqueadas 500 ou 750 células por poço (U251 e U373: 500 células; NCI-H460: 750 células), numa placa de 6 poços. No dia seguinte, após nova incubação a 37⁰C, com 5% de CO₂, foi adicionado Taxol a diferentes concentrações (2 nM, 4 nM, 5 nM e 10 nM). As células foram novamente incubadas numa estufa a 37⁰C, com 5% de CO₂, durante 48 horas, o meio foi removido e foi adicionado meio de cultura novo. As células foram novamente incubadas, durante 10 dias. No décimo dia, o meio foi removido e foi adicionado 4% (v/v) PFA em PBS 1x para fixar as colónias. O PFA foi removido e foi adicionada uma solução de cristal violeta 0,05% (m/v) em água destilada, ficando a incubar à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Os poços foram lavados com água destilada e deixados a secar à temperatura ambiente para serem contadas as colónias formadas. A coloração com cristal violeta possibilitou a contagem das colónias a olho nu com o auxílio de um contador. Apenas foram consideradas colónias os conjuntos com mais de 50 células.

2.17 Ensaio *Wound Healing*

O ensaio *Wound Healing* foi usado com o propósito de averiguar a capacidade migratória das células. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços, transfetadas com siCdc20 e incubadas a 37⁰C, com 5% de CO₂. Quando as células atingiram a confluência máxima, o meio foi removido e a monocamada de células foi lavada com PBS 1x. Em cada poço foi traçado um risco com uma ponta de pipeta P200 de modo a atravessar o poço. As células foram analisadas num microscópio Nikon Eclipse TE2000-4 com uma objetiva 10x e foram tiradas fotos da “ferida” através do programa Nikon ACT-1. Depois de tirada a primeira foto, adicionou-se meio novo e Taxol a diferentes concentrações (5 nM, 10 nM e 50 nM) nos respetivos poços. Foram tiradas fotos de 12 em 12 horas, durante 48 horas, após a adição do Taxol para avaliar a capacidade das células em fechar a “ferida”. Para cada tempo, a área da ferida foi calculada através do programa Fiji ImageJ [124].

2.18 *Cytospin*

Para evitar a perda de células que se encontravam em suspensão foi realizada a técnica de *cytospin*, que consiste em centrifugar células sobre uma lâmina de microscópio. Para isso, o meio de cultura foi recolhido para um tubo de centrífuga e as células foram tripsinizadas. A suspensão celular resultante foi adicionada à suspensão previamente

recolhida e foi determinada a densidade celular. Foi preparada uma amostra constituída por $0,05 \times 10^6$ de células NCI-H460 em 200 μ l de meio RPMI suplementado com FBS e com 8 μ l de 3% de albumina sérica bovina (BSA, de *Bovine Serum Albumin*) para evitar o esmagamento das células durante a técnica. As amostras foram adicionadas aos funis de *cytospin*, previamente preparadas sobre filtros e lâminas em citoclips. As amostras foram centrifugadas a 800 rpm, durante 5 minutos, numa citocentrífuga *Cytospin 4* (ThermoScientific).

2.19 TUNEL

O ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase. dUTP nick end labeling*) foi realizado com o intuito de verificar a existência de morte celular por apoptose, que é marcada pela fragmentação do DNA, após a depleção da proteína Spindly, sozinha ou em combinação com Taxol 4 nM, na linha celular NCI-H460. Neste ensaio utilizou-se o kit TUNEL *DeadEnd™ FluorometricTunel System* (Promega), que consiste em marcar células em apoptose através da ação da enzima TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) que adiciona dUTPs (*deoxyuridine triphosphate nucleotides*) marcados com fluoresceína aos fragmentos de DNA. Para isso foram plaqueadas $0,12 \times 10^6$ células por poço, em placas de 6 poços, e foram transfetadas com siSpindly. Passadas 48 horas, o taxol foi adicionado e as células foram incubadas mais 48 horas. As lâminas montadas através da técnica de *cytospin* foram colocadas numa solução de 4% PFA em PBS 1x, durante 10 minutos. Foram feitas 2 lavagens em PBS 1x, durante 5 minutos. As lâminas foram colocadas numa solução de Triton-X 0,2% em PBS 1x, durante 5 minutos, para promover a permeabilização das membranas celulares. Foram feitas 2 novas lavagens em PBS 1x. Para o controlo positivo (células expostas a um tratamento que fragmenta as cadeias de DNA *a priori*), as células foram incubadas com 15 μ l de tampão DNase 10x em água autoclavada, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O tampão foi removido e as células foram novamente incubadas, durante 10 minutos, em 15 μ l de tampão DNase 10x, contendo 1 μ l da enzima DNase, que fragmenta as cadeias de DNA. O excesso de tampão foi removido e foram feitas 3 lavagens com água ultrapura. A todas as lâminas foram adicionados 15 μ l de tampão de equilíbrio, onde as células ficaram a incubar durante 10 minutos. O tampão de equilíbrio foi removido e foi adicionada às amostras a solução TUNEL (75% tampão de equilíbrio, 15% mistura de nucleótidos e 5% enzima TdT ou água ultrapura, conforme se tratasse do controlo positivo e amostras ou do controlo negativo, respetivamente). As células foram incubadas nesta solução durante 60

minutos, numa câmara húmida a 37⁰C. Para terminar a reação, as células foram incubadas com uma solução de citrato de sódio salina (SSC, de *Saline Sodium Citrate*) 2x em água ultrapura, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Foram feitas 3 lavagens em PBS 1x, durante 5 minutos e as lamelas foram montadas sobre as lâminas contendo as células e 0,2 mg/ml DAPI diluído em meio de montagem Vectashield.

2.20 Microscopia e Tratamento de Imagem

Para a obtenção de imagens em contraste de fase foi usado um microscópio Nikon TE 2000-U com uma objetiva 10x e com uma câmara digital DXM1200F, acoplado ao *software* Nikon ACT-1 (Melville, NY).

As lâminas de imunofluorescência foram analisadas num microscópio Axio Observer Z.1 SD (Carl Zeiss, Alemanha), acoplado a uma câmara AxioCam MR3, e com uma objetiva com plano apocromático 63x/NA 1.4 Zeiss Axio Observers Z1.

As imagens de imunofluorescência foram obtidas através do programa AxioVision Release 4.8.2 SPC e tratadas nos programas Fiji ImageJ e Adobe Photoshop CC.

2.21 Análise Estatística dos Resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada no programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad *software* Inc., CA, USA), usando o teste t de *Student* desemparelhado. Este teste estatístico foi usado para comparar dois grupos de resultados de cada vez, comparando a diferença entre a média de resultados e o respetivo desvio padrão entre os dois grupos. Os resultados foram expressos com média \pm SD (*Standard Deviation*) e resultaram da média de pelo menos três experiências independentes e do desvio-padrão correspondente. O nível de significância foi fixado nas probabilidades de *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0005 e ****p<0.0001.

3. Resultados

3.1 À procura de um inibidor da proteína cinase BubR1

Porque há a permanente necessidade de encontrar novos compostos com efeitos antiproliferativos para travar a disseminação do cancro, foi realizado um rastreio de compostos em colaboração com o Departamento de Bioquímica da *Oxford Brookes University*. Atendendo à função que a proteína BubR1 desempenha durante a mitose, na estabilização das ligações entre microtúbulos e cinetocoros e na ativação do SAC, foram analisados 7 compostos com base na estrutura tridimensional desta proteína. Este rastreio consistiu em avaliar a viabilidade celular da linha celular de cancro cervical HeLa após a adição dos vários compostos, através de ensaios MTT.

3.1.1 Rastreio de Compostos para identificação de potenciais inibidores de BubR1

A viabilidade celular dos compostos B9, D10, E5, E9, E10, F4 e F11 foi avaliada através de um ensaio MTT na linha celular de cancro cervical HeLa. Na maior parte dos casos, observou-se a diminuição da percentagem de células viáveis inversamente proporcional à concentração do composto (figura 3.1). No entanto, o composto E5 destacou-se desta seleção de compostos por provocar níveis de viabilidade celular inferiores a 50% com concentrações a partir dos 75 μM , chegando a 23,5% na concentração de 300 μM .

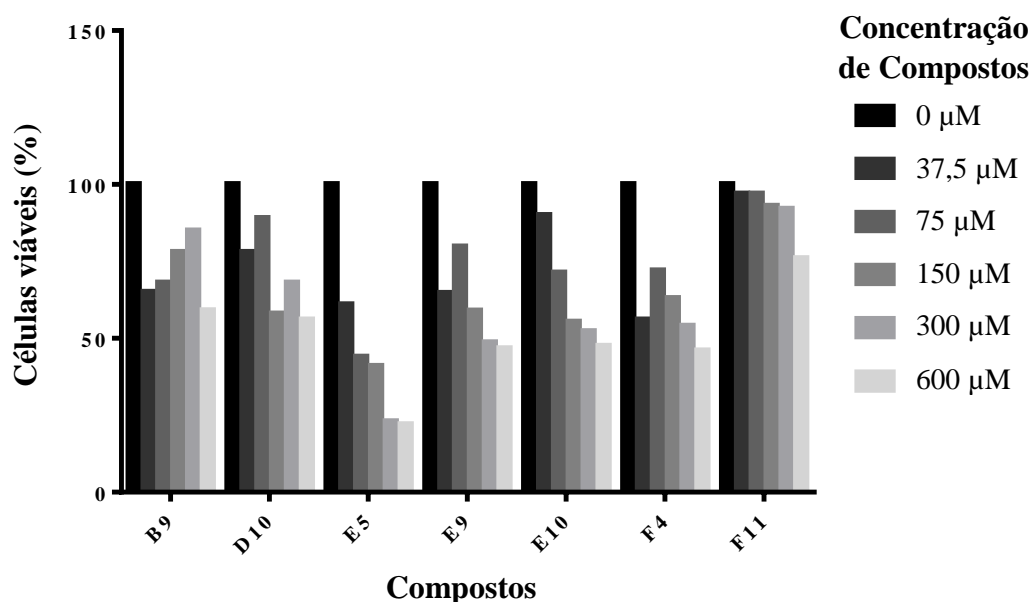
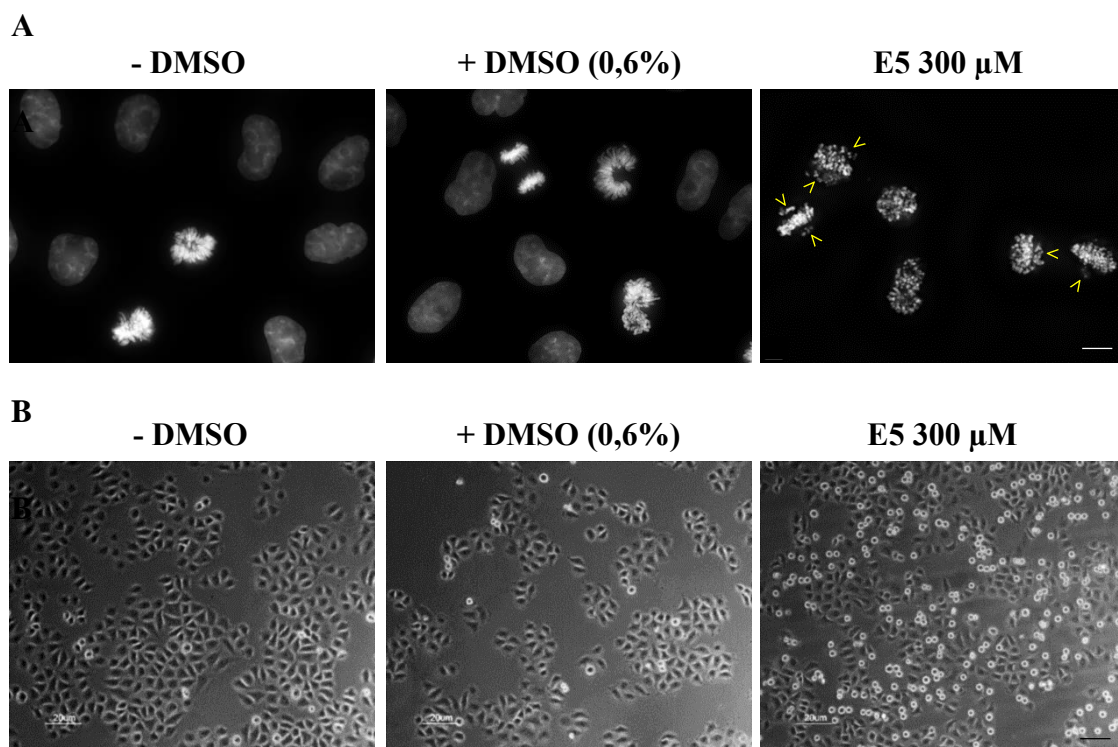


Figura 3.1 Rastreio de compostos potencialmente inibidores da proteína BubR1 na linha celular HeLa. O composto E5 destaca-se dos restantes pela redução mais pronunciada da viabilidade celular com concentrações mais baixas de composto.

Com o objetivo de perceber que alterações é que o composto E5 induzia nas células, procedeu-se à marcação com DAPI de células controlo, com e sem DMSO para descartar a possibilidade deste efeito se dever ao solvente do composto, e de células tratadas com 300 μM de composto. A marcação com DAPI revelou um maior número de células com cromossomas condensados na cultura tratada com o composto E5, comparativamente aos dois controlos, o que sugere a acumulação de células mitóticas (figura 3.2 A). De facto, quando observadas ao microscópio em contraste de fase, notou-se a retenção das células tratadas com E5 em mitose (figura 3.2 B), confirmando a tendência observada na marcação com DAPI. Atendendo à função que a BubR1 desempenha na ativação do SAC era esperada a saída prematura da mitose. No entanto observou-se também o desalinhamento de cromossomas nas células tratadas com E5 e marcadas com DAPI, que coincide com o fenótipo da depleção da BubR1 resultante da função que esta proteína desempenha na estabilização das ligações entre microtúbulos e cinetocoros (figura 3.2 A). Para observar o efeito deste composto a 300 μM na localização da BubR1 fez-se um ensaio de imunofluorescência usando anticorpos específicos contra as proteínas BubR1 e CREST, localizada nos cinetocoros. Neste ensaio verificou-se que o efeito do composto E5 não interfere com a localização da proteína BubR1 nos cinetocoros (figura 3.2 C). O conjunto destes resultados sugere que o composto E5 inibe a função da BubR1 na promoção de ligações estáveis entre microtúbulos e cinetocoros sem interferir com a sua função no SAC.



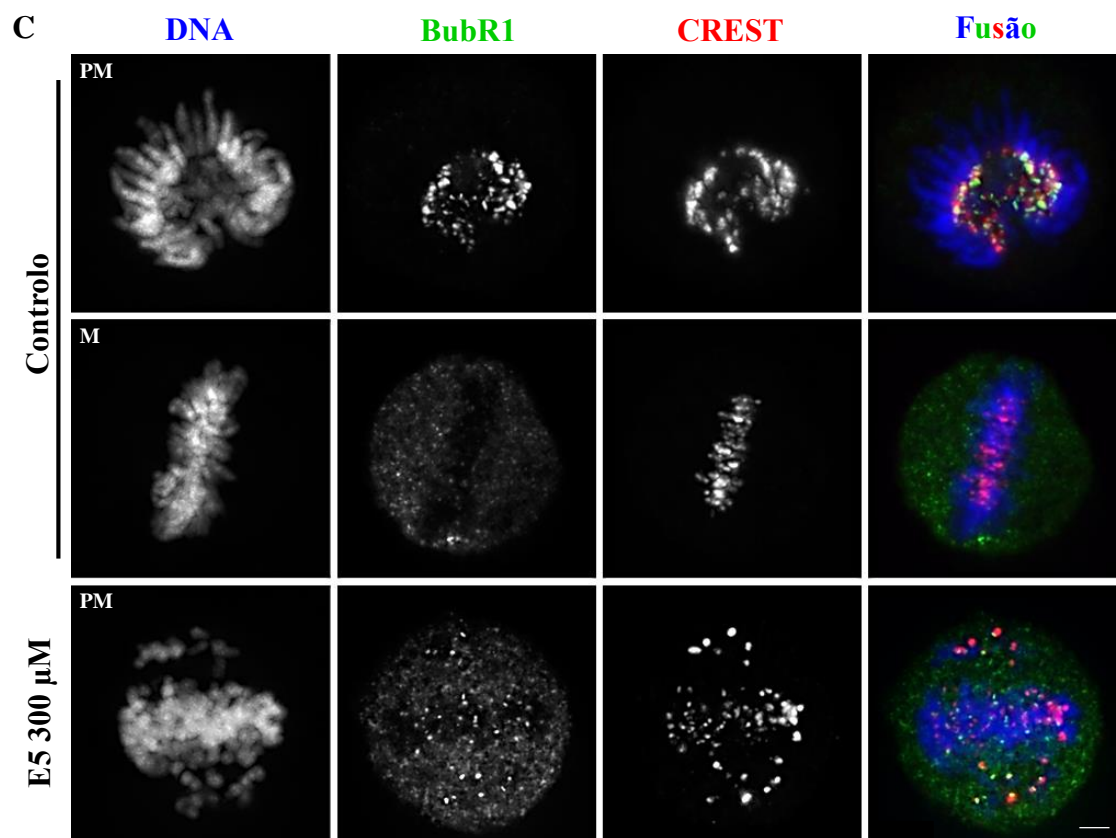


Figura 3.2 Efeito do composto E5 300 μ M na linha celular HeLa. (A) O composto E5 provoca a acumulação de células com os cromossomas condensados e o desalinhamento dos cromossomas (setas amarelas). Escala 10 μ m. (B) O composto E5 provoca uma acumulação de células mitóticas (células arredondadas). Escala 20 μ m. (C) A localização da proteína BubR1 não é afetada pelo composto E5. Nas células controlo é visível a marcação da BubR1 nos cinetocoros apenas na célula em prometáfase conforme esperado. Na célula tratada com E5, a BubR1 continua presente nos cinetocoros. PM – Prometáfase; M – Metáfase. Escala 5 μ m.

3.2 Cdc20 como potencial alvo terapêutico

Tendo em conta o papel que a proteína Cdc20 desempenha na saída da mitose, na ativação do complexo APC/C, foi proposto que a sua inibição poderia constituir uma abordagem terapêutica promissora no tratamento do cancro. Vários estudos reportam que a sua depleção quase total retém as células em mitose, induz morte celular, inibe o *slippage* e o crescimento celular [110, 111, 125]. Neste trabalho propomos verificar se a depleção desta proteína pode enaltecere o efeito do taxol. Para a análise do efeito da depleção da proteína Cdc20 e da sua combinação com o taxol foram utilizadas duas linhas celulares de glioblastomas, U251 e U373. Foram usadas concentrações de taxol próximas das usadas em quimioterapia (na ordem dos nM) [126].

3.2.1 A depleção da proteína Cdc20 foi eficiente

Resultados anteriores obtidos por RT-qPCR no laboratório indicavam que a proteína Cdc20 estava sobre-expressa nas linhas U373 e U251, em comparação com os astrócitos, podendo-se concluir que esta proteína encontra-se desregulada nestas linhas celulares. Assim sendo, prosseguiu-se para a depleção da proteína nestas células por RNAi. A depleção foi confirmada por imunofluorescência e por *western blotting*. A ausência de marcação da proteína Cdc20 é evidente nas imagens de imunofluorescência por comparação ao controlo (figura 3.3 A). Para confirmar a depleção da proteína Cdc20, os níveis proteicos de culturas controlo siRNA e culturas siCdc20 foram analisados por *western blotting*. A proteína Cdc20 foi depletada 95,76% na linha celular U251 e 98,09% na linha celular U373 (figura 3.3 B). Estes resultados confirmam a depleção eficiente desta proteína.

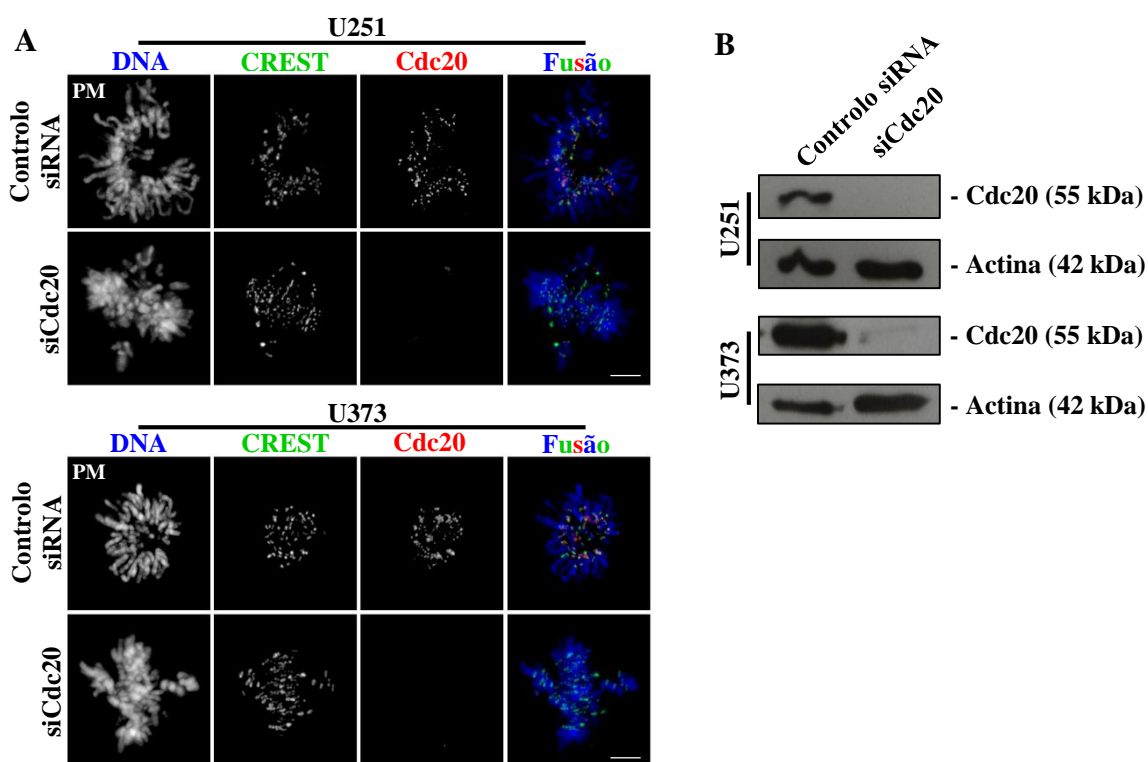
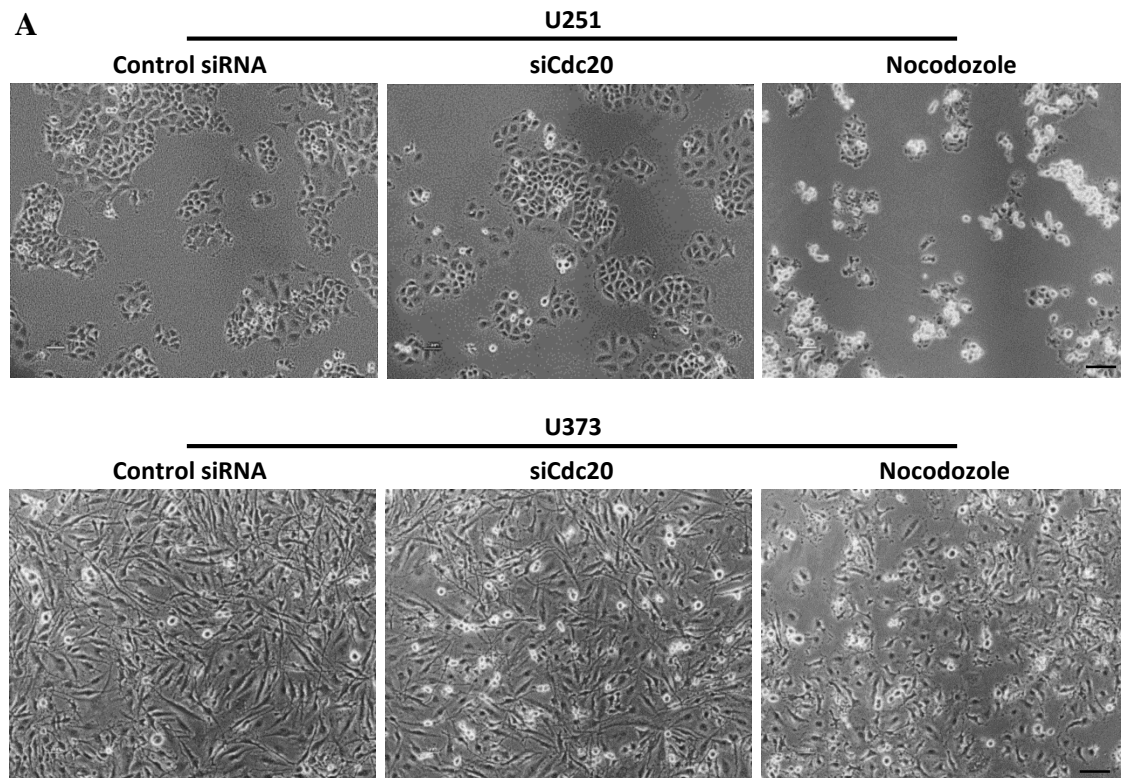


Figura 3.3 A proteína Cdc20 foi depletada com eficiência nas linhas celulares U251 e U373. (A) Imagens de imunofluorescência de células controlo siRNA e siCdc20. Nas células siCdc20 não há marcação da proteína Cdc20. PM – Prometáfase. Escala 5 μ m.. **(B)** Análise de *western blotting*. A proteína de interesse foi depletada com sucesso em ambas as linhas celulares.

3.2.2 A depleção da proteína Cdc20 induz paragem em mitose

Uma vez que a proteína Cdc20 tem um papel fundamental na saída da mitose foi-se averiguar a percentagem de células paradas nesta fase do ciclo celular após a depleção da Cdc20, nas linhas celulares U251 e U373, através da determinação do índice mitótico

(IM). Apesar da acumulação de células em mitose após a transfeção não ser muito evidente nas imagens em contraste de fase (figura 3.4 A), a análise quantitativa mostra um aumento significativo de células mitóticas na população de células transfetadas, em comparação com a população de células controlo siRNA, em ambas as linhas celulares (figura 3.4 B). Na linha U251, o controlo siRNA apresentou um IM de 3,3%, enquanto as células transfetadas apresentaram um IM de 6,1% ($p < 0,05$). Na linha celular U373, o controlo siRNA apresentou um IM de 5%, enquanto as células transfetadas apresentaram um IM de 13,2% ($p < 0,05$). Estes resultados mostram que após a depleção da proteína Cdc20, as células tem tendência a parar em mitose. No entanto esta acumulação em mitose não é tão apreciável tendo em conta o papel da Cdc20 na inibição da saída da mitose, sugerindo que as células usam mecanismos alternativos independentes da Cdc20 para saírem da mitose.



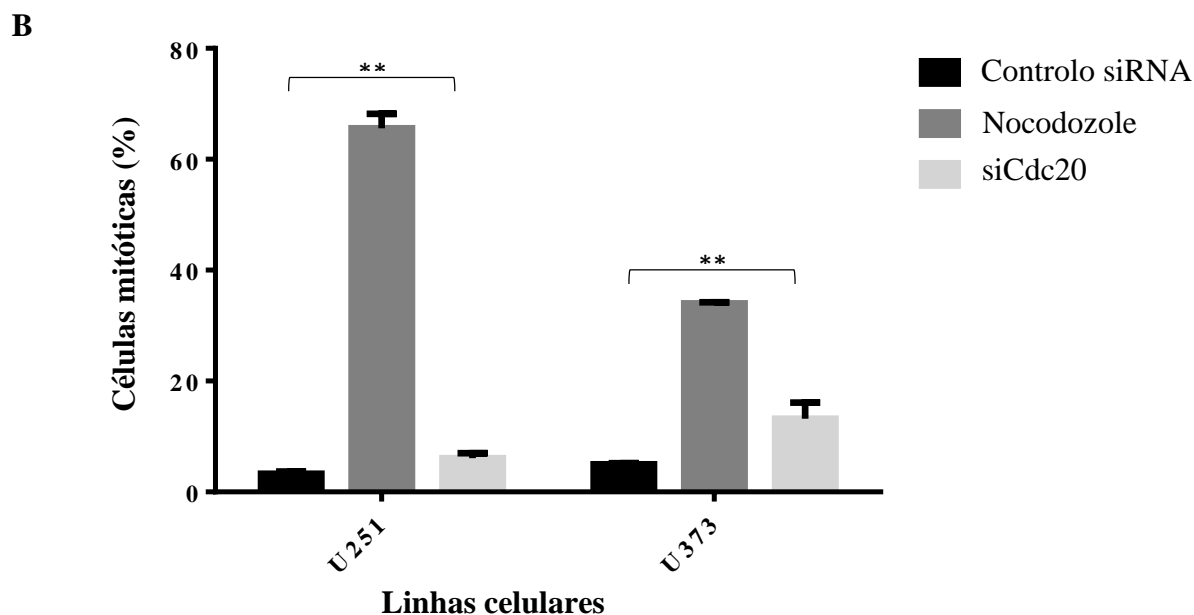


Figura 3.4 A depleção da proteína Cdc20 induz pagarem mitótica nas linhas celulares U251 e U373. (A) Imagens em contraste de fase. Há uma acumulação de células em mitose (células arredondadas) após a depleção da proteína Cdc20, comparativamente às células controlo. Escala 20 μ m. **(B)** O índice mitótico duplicou quando se depletou a proteína Cdc20, em ambas as linhas celulares.

** $p < 0,01$

3.2.3 A depleção da proteína Cdc20 reduz a viabilidade de células cancerígenas e torna-as sensíveis à ação do taxol

O ensaio MTT foi realizado com o intuito de averiguar se a depleção da proteína Cdc20 interfere com a viabilidade celular nas 2 linhas celulares de glioblastoma, U251 e U373. A depleção da proteína Cdc20 provocou uma ligeira mas significativa diminuição da viabilidade celular em ambas as linhas celulares (figuras 3.5 A-B). Após a depleção da Cdc20, a viabilidade celular baixou para 77,9% ($p < 0,0001$), na linha U251, e baixou para 88,2% ($p = 0,0121$), na linha U373, em comparação com o controlo. Este resultado sugere que a transfeção com siCdc20 tem um efeito antiproliferativo. De seguida foi avaliado o efeito da combinação da depleção da proteína Cdc20 e do taxol. Como resultado obteve-se um efeito sinérgico em ambas as linhas, sendo o efeito mais acentuado na linha U373. Para a linha U251, este efeito foi particularmente evidente nas combinações siCdc20 + taxol 2 nM e siCdc20 + taxol 5 nM, comparativamente ao tratamento individual com taxol (figura 3.5 A). De salientar que o efeito da combinação de siCdc20 + Taxol 5 nM mostrou-se significativo, não só em comparação com o taxol, mas também em comparação com o siCdc20, apontando para um efeito sinérgico. Na

linha celular U373, este efeito sinérgico foi obtido com todas as concentrações de taxol testadas na combinação (figura 3.5 B).

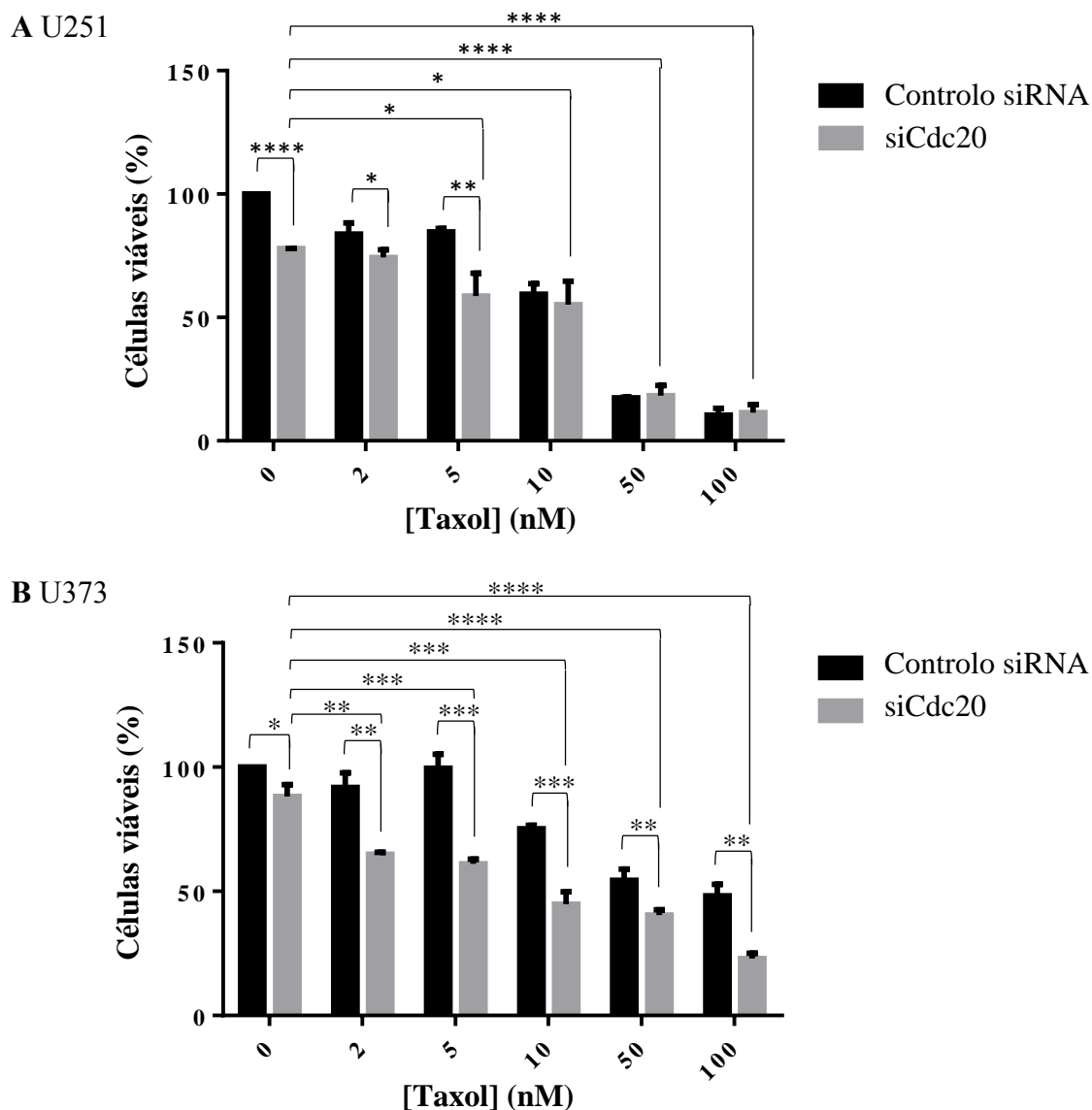


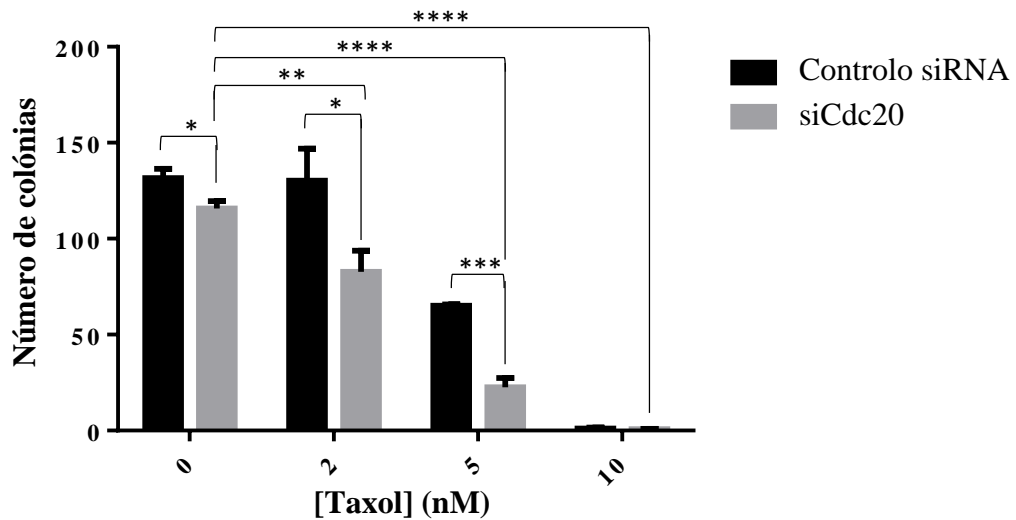
Figura 3.5 A depleção da Cdc20 promove a redução da viabilidade celular a curto prazo, com ou sem a adição de taxol. Os resultados do ensaio MTT nas linhas celulares (A) U251 e (B) U373 mostram uma diminuição da percentagem de células viáveis quando a proteína Cdc20 é depletada. A diminuição da viabilidade celular é mais pronunciada quando as células são tratadas com a combinação siCdc20 + taxol.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$

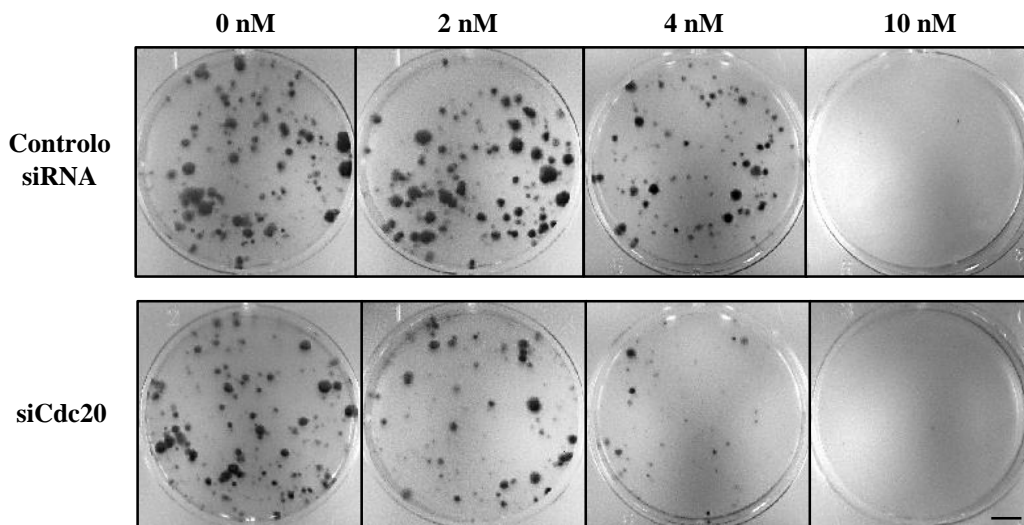
Adicionalmente comprovou-se este efeito antiproliferativo a longo prazo (~10 dias), através de um ensaio clonogénico. Em ambas as linhas celulares notou-se uma diminuição significativa do número de colónias quando comparados o controlo siRNA e as células transfetadas. Na linha U251 o número de colónias baixou de 132 para 116 ($p < 0,05$), células controlo e células transfetadas respetivamente (figura 3.6 A-B), e na linha U373

a quantidade de colónias baixou de 74 para 29 ($p>0,005$), células controlo e células transfetadas respetivamente (figura 3.6 C-D). Quando comparado o efeito antiproliferativo dos tratamentos individuais (taxol ou siCdc20) com o tratamento de combinação notou-se uma diminuição significativa do número de colónias no tratamento de combinação com taxol 2 nM e 5 nM, na linha U251, e no tratamento de combinação com todas as concentrações de taxol testadas, na linha U373. Contudo, o decréscimo do número de colónias foi mais significativo com o tratamento de combinação com concentrações de taxol a partir de 5 nM em ambas as linhas celulares. O conjunto destes resultados sugere que a depleção da proteína Cdc20 por si só possui um efeito antiproliferativo e, sinergeticamente, potencia o efeito do taxol contra a proliferação das linhas celulares de glioblastoma.

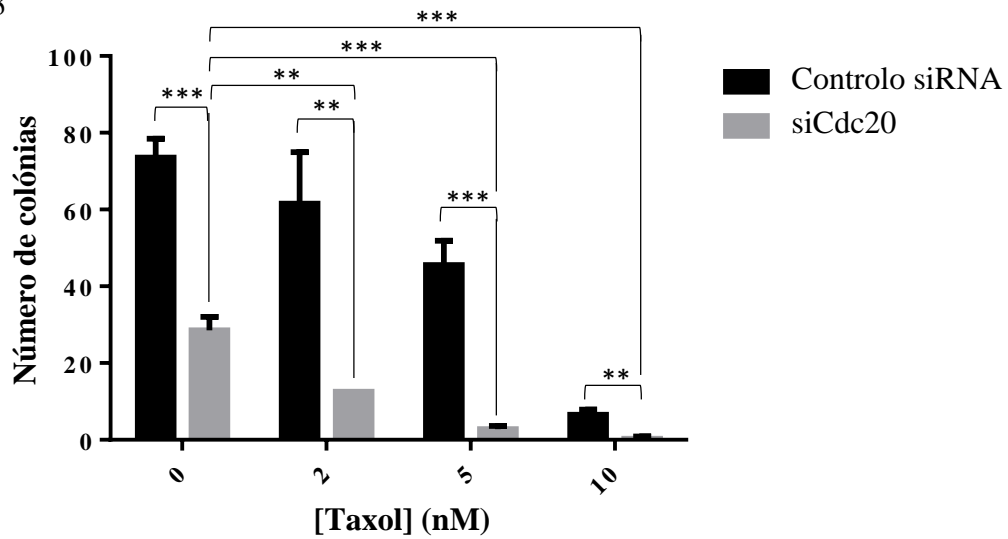
A U251



B U251



C U373



D U373

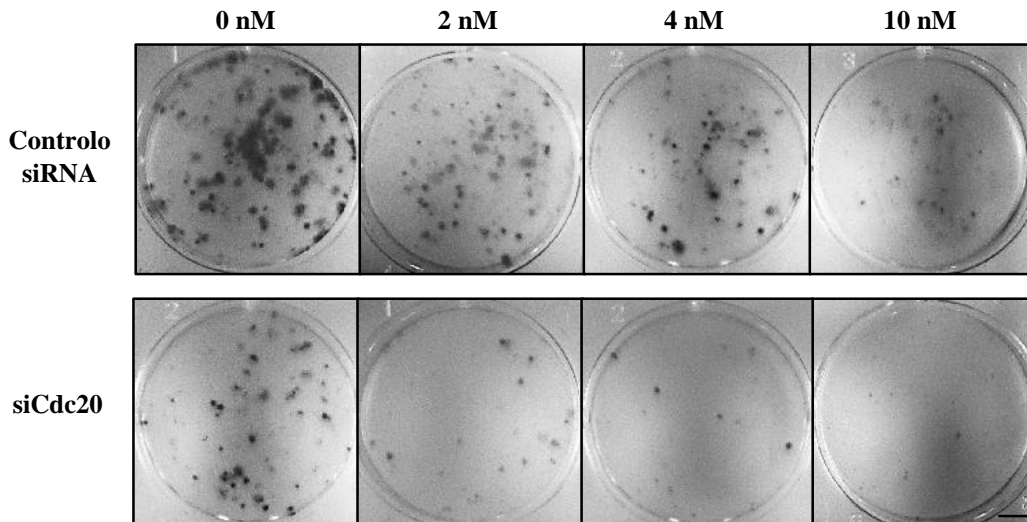


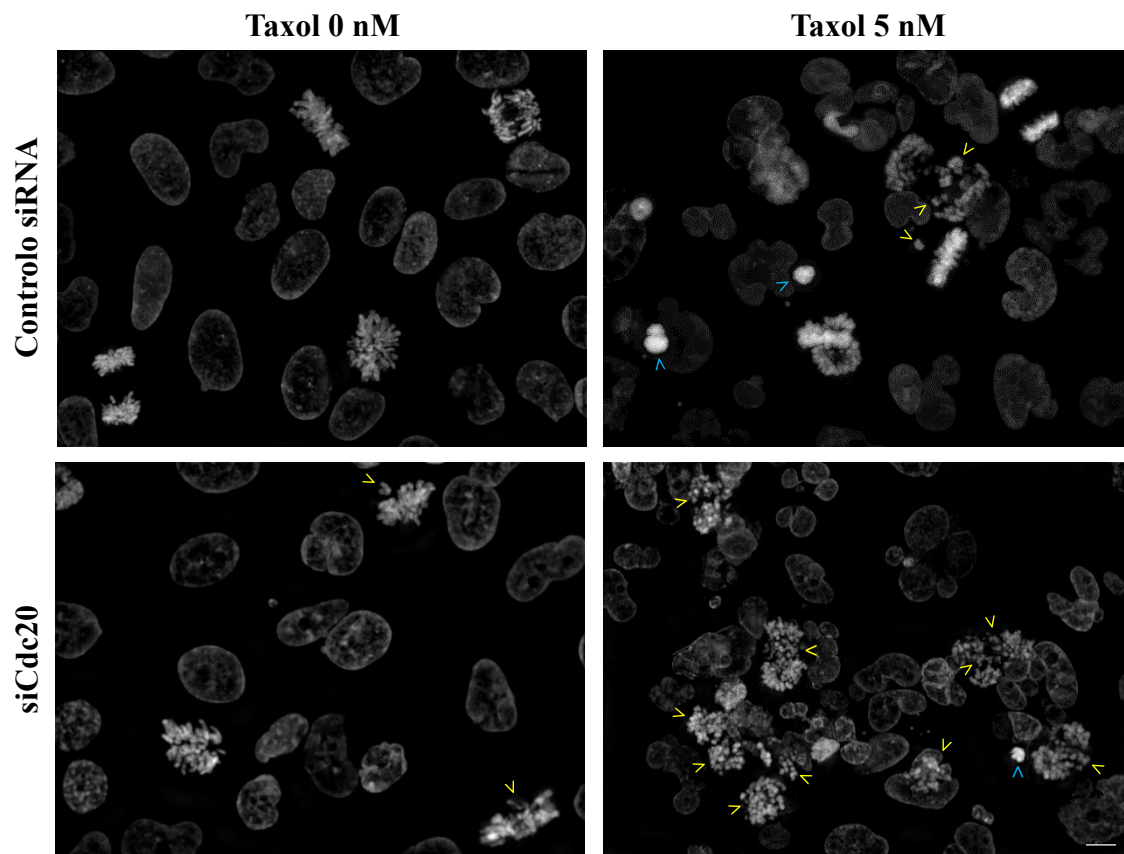
Figura 3.6 A depleção da Cdc20 promove a diminuição da viabilidade celular a longo prazo, com ou sem o tratamento com taxol. O ensaio clonogénico nas linhas celulares (A-B) U251 e (C-D) U373 indica que a depleção da proteína Cdc20 tem um efeito antiproliferativo a longo prazo, sendo este efeito mais evidente após a sua combinação com taxol. Escala 40 μ m.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$

3.2.4 O tratamento de combinação siCdc20 + taxol retém as células na mitose

O fenótipo da depleção da Cdc20, do taxol 5 nM e da combinação dos dois tratamentos foi observado nas linhas celulares U251 e U373, e foi comparado com o fenótipo de células sem tratamento, com o objetivo de perceber o que induzia o decréscimo da viabilidade celular, através da marcação do DNA com DAPI. Em ambas as linhas celulares observaram-se cromossomas desalinhados em ambos os tratamentos individuais, o que sugere erros de congressão ou de segregação dos cromossomas (figura

3.7 A-B). No tratamento de combinação com siCdc20 e taxol 5 nM, além de se terem observado cromossomas desalinhados, verificou-se uma acumulação notável de células mitóticas comparativamente aos tratamentos individuais e ao controlo. Este fenótipo foi observado em ambas as linhas celulares mas foi mais evidente na linha U373 (figura 3.7 B). No entanto, na linha U251 foram também observados micronúcleos tanto após o tratamento com taxol 5 nM como após o tratamento de combinação (figura 3.7 A). Estes resultados sugerem que os erros de congressão/segregação dos cromossomas induzidos pelos dois tratamentos individualmente ativa o SAC, provocando a acumulação de células em mitose, e que a depleção da Cdc20 impede as mesmas células de prosseguirem com o ciclo celular, contribuindo para a retenção das células na mitose.

A U251



B U373

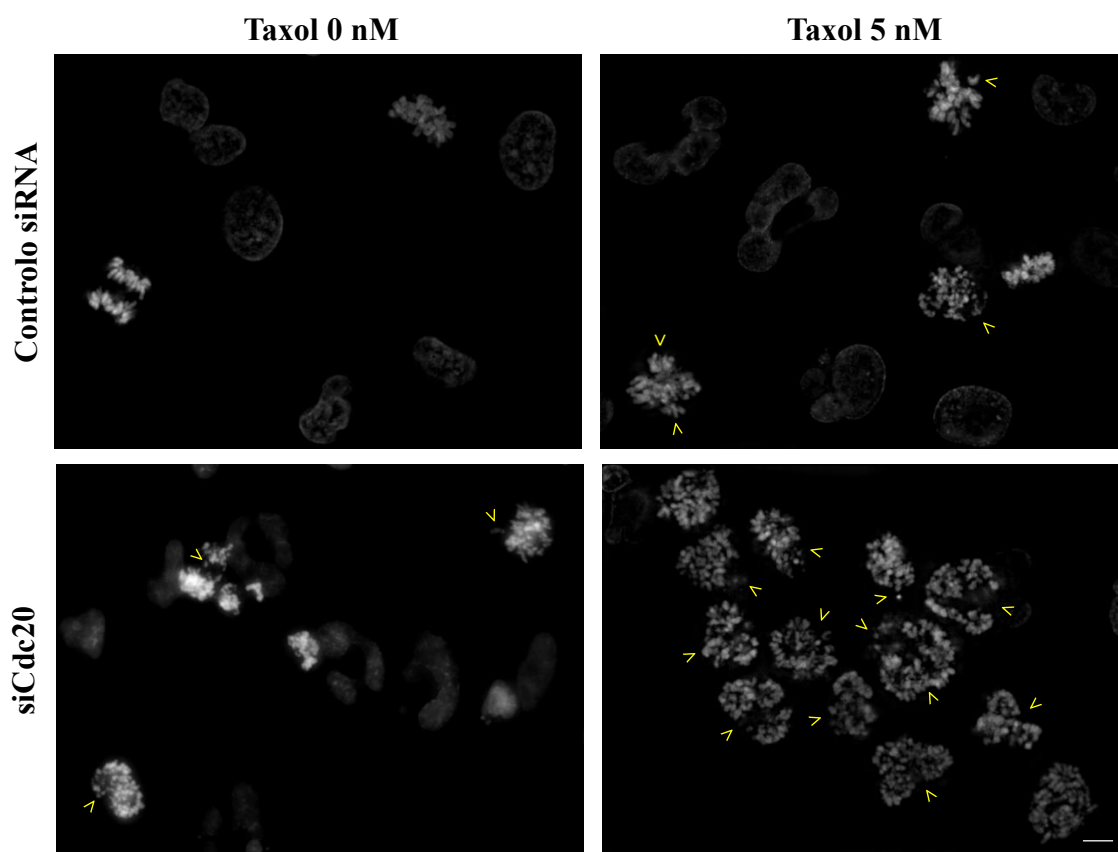
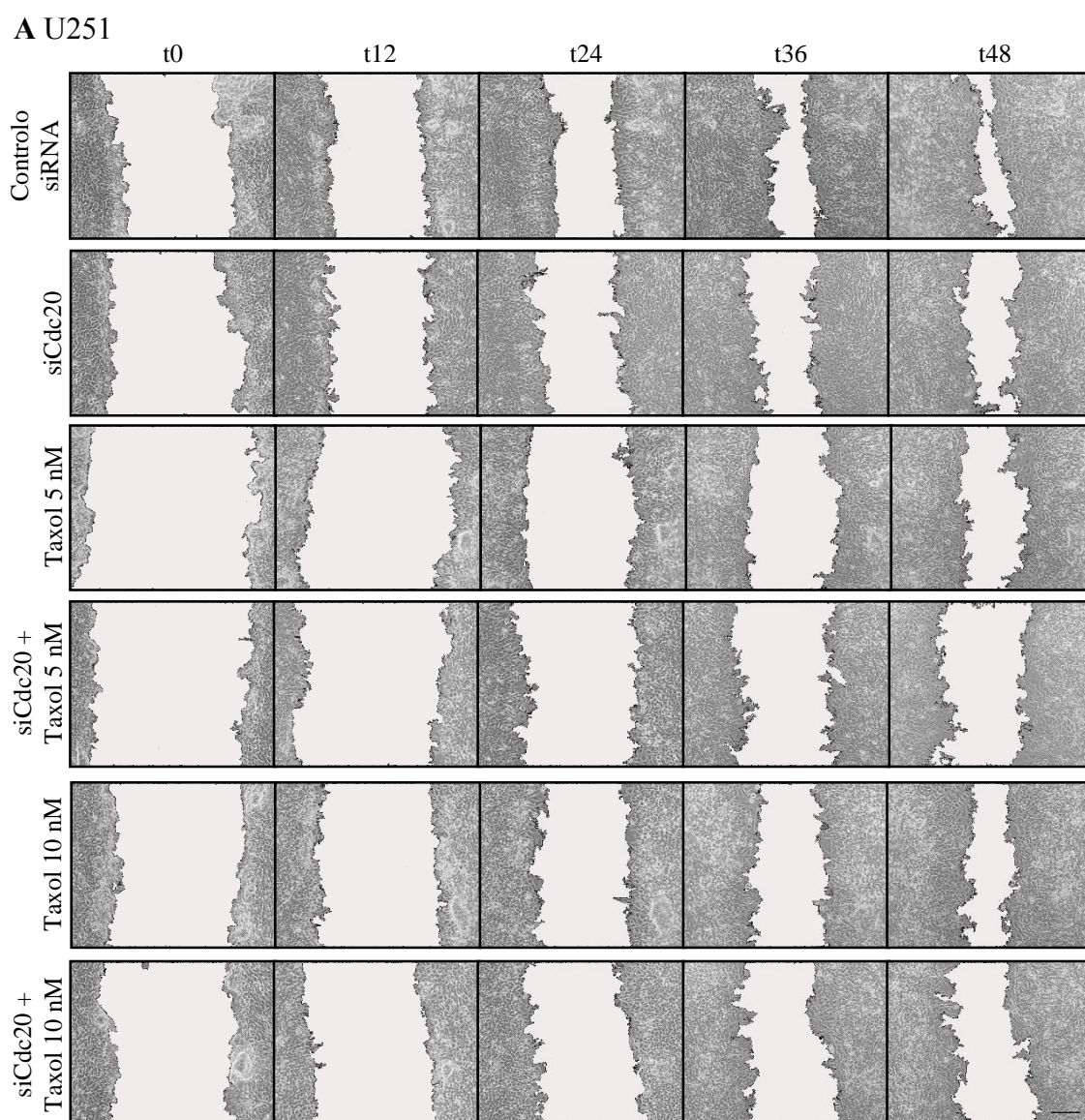


Figura 3.7 A depleção da proteína Cdc20 promove o desalinhamento de cromossomas e a sua combinação com taxol 5 nM promove a acumulação de células mitóticas. (A) Na linha celular U251, a depleção da Cdc20 induz o desalinhamento dos cromossomas (setas amarelas), fenótipo também visível nas células tratadas com taxol 5 nM e nas células expostas ao tratamento de combinação. Nas células tratadas com taxol 5 nM também é visível a formação de micronúcleos (setas azuis). A combinação dos dois tratamentos, além de induzir a formação de micronúcleos e o desalinhamento dos cromossomas, promove a acumulação de células mitóticas. (B) Na linha celular U373, tanto a depleção da Cdc20 como o tratamento com taxol 5 nM provocaram o desalinhamento de cromossomas (setas amarelas). O mesmo fenótipo foi observado no tratamento de combinação siCdc20 + Taxol 5 nM, assim como a acumulação de células mitóticas. Escala 10 μ m.

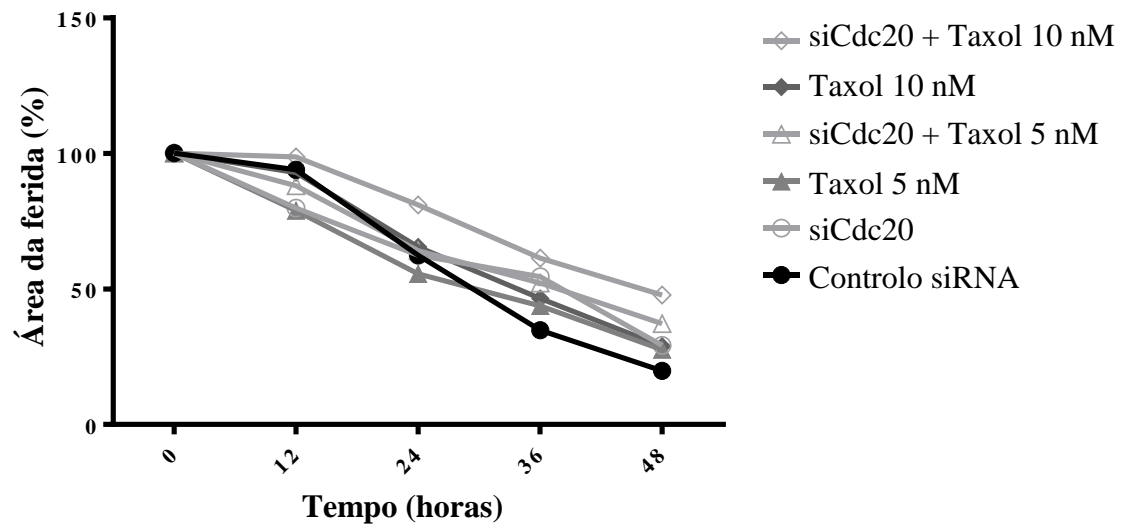
3.2.5 A depleção da Cdc20 interfere com a migração de células cancerígenas

Realizou-se um ensaio *wound healing* nas linhas celulares U251 e U373 com o intuito de avaliar a capacidade migratória das células após a depleção da proteína Cdc20 e na combinação de siCdc20 com taxol. Ainda que estes sejam apenas resultados preliminares, resultantes de apenas uma experiência, nota-se que a depleção da Cdc20 interfere com a migração celular em comparação com o controlo siRNA em ambas as linhas celulares (figura 3.8). Na linha U251, ao fim de 48 horas, a área da “ferida” nas células controlo era 19,8% da “ferida” inicial, enquanto nas células transfetadas era 29,2% (figura 3.8 A-

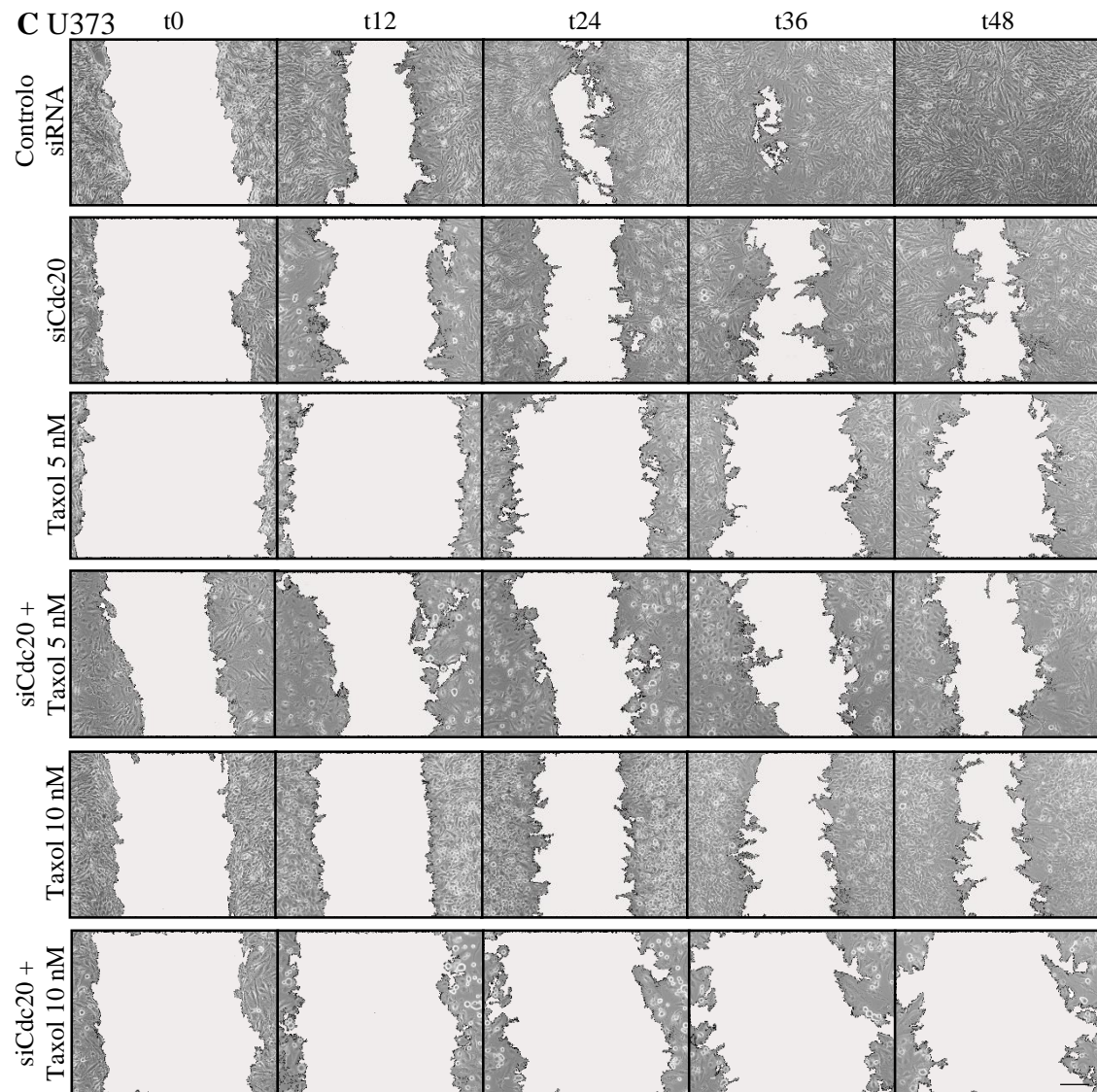
B). Na linha U373, a “ferida” traçada nas células controlo fechou completamente ao fim de 48 horas, enquanto as células transfetadas apresentavam 36,1% da “ferida” inicial (figura 3.8 C-D). Embora o tratamento com taxol também tenha interferido com a migração, a capacidade migratória destas células foi mais afetada pela combinação siCdc20 + taxol, sendo esse efeito mais notável na linha U373 (figura 3.8 C-D). Nessa linha celular, a combinação siCdc20 + taxol 5 nM e a combinação siCdc20 + taxol 10 nM apresentaram 83,0% e 101,3% da “ferida” inicial, respetivamente, ao fim de 48 horas. Estes resultados sugerem que a depleção da proteína Cdc20 interfere com a capacidade migratória das células e que potencia o efeito do taxol na migração.



B U251



C U373



D U373

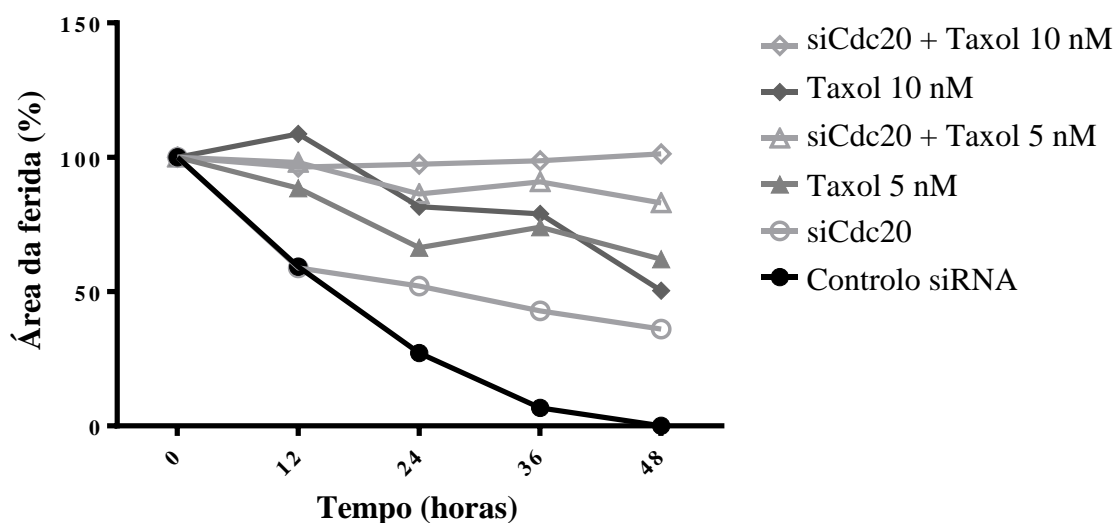


Figura 3.8 A depleção da proteína Cdc20, sozinha ou em combinação com o taxol, diminui a capacidade migratória das linhas celulares U251 e U373. (A) Imagens em contraste de fase da “ferida” traçada na linha U251 a 0, 12, 24, 36 e 48 horas. (B) A combinação do tratamento com siCdc20 e taxol 10nM produziu um efeito maior na migração das células U251. (C) Imagens em contraste de fase, tiradas de 12 em 12 horas, após feita a “ferida” na linha U373. (D) A transfeção com siCdc20 interferiu bastante na capacidade migratória das células U373, sozinha e em combinação com taxol a 5 nM ou a 10 nM. Escala 20 μ m.

3.3 Spindly como potencial alvo terapêutico

A proteína Spindly foi recentemente caracterizada como sendo necessária à estabilidade das ligações entre microtúbulos e cinetocoros, e ao recrutamento da proteína dineína para os cinetocoros, contribuindo para o silenciamento do SAC [30]. A sua depleção provoca a paragem da mitose e a congressão deficiente dos cromossomas no plano equatorial do fuso mitótico [127]. Com este fenótipo, a proteína Spindly tem o potencial para ser um alvo terapêutico, individualmente ou em combinação com outros fármacos, para inibir a proliferação de células tumorais. Para a avaliação deste potencial hipotético foi utilizada a linha de cancro do pulmão NCI-H460.

3.3.1 A Spindly está sobre-expressa na linha tumoral NCI-H460

Antes de analisar o potencial antiproliferativo da depleção da Spindly, averiguou-se primeiro a existência de alterações na expressão da Spindly na linha tumoral NCI-H460 por RT-qPCR. Verificou-se que a proteína Spindly está 3 vezes mais expressa na linha celular NCI-H460 do que na linha celular normal alveolar de pulmão HPAEpiC (figura 3.9).

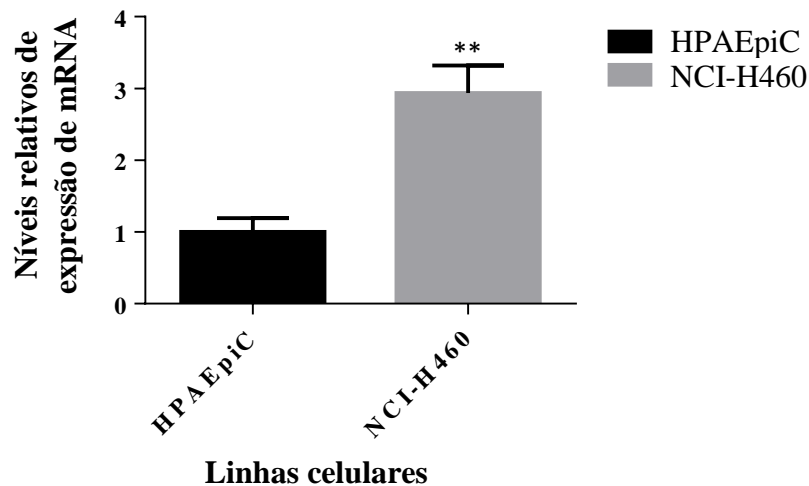


Figura 3.9 Sobre-expressão de Spindly na linha celular NCI-H460. O mRNA da Spindly é 3 vezes mais abundante na linha celular tumoral NCI-H460 do que na linha celular normal HPAEpiC.

**p<0,001

3.3.2 A depleção da proteína Spindly foi eficiente

A eficiência da transfeção com siSpindly foi verificada por imunofluorescência. A ausência de marcação da proteína Spindly nas células transfetadas é evidente através da comparação com o controlo (figura 3.10 A). Nas células controlo conforme esperado, a Spindly está presente nos cinetocoros da célula em prometáfase (fase em que os cromossomas não estão todos alinhados e ligados aos microtúbulos), mas não da célula em metafase (fase em que todos os cromossomas se encontram alinhados no plano equatorial do fuso). Na célula transfetada com siSpindly, a proteína Spindly não está presente nos cinetocoros dos cromossomas desalinhados. Adicionalmente, a eficiência da transfeção foi confirmada por *western blotting*. A transfeção com siSpindly provocou a depleção de 92,7% da proteína (figura 3.10 B). Estes resultados mostram que a depleção da proteína Spindly foi eficiente na linha celular NCI-H460.

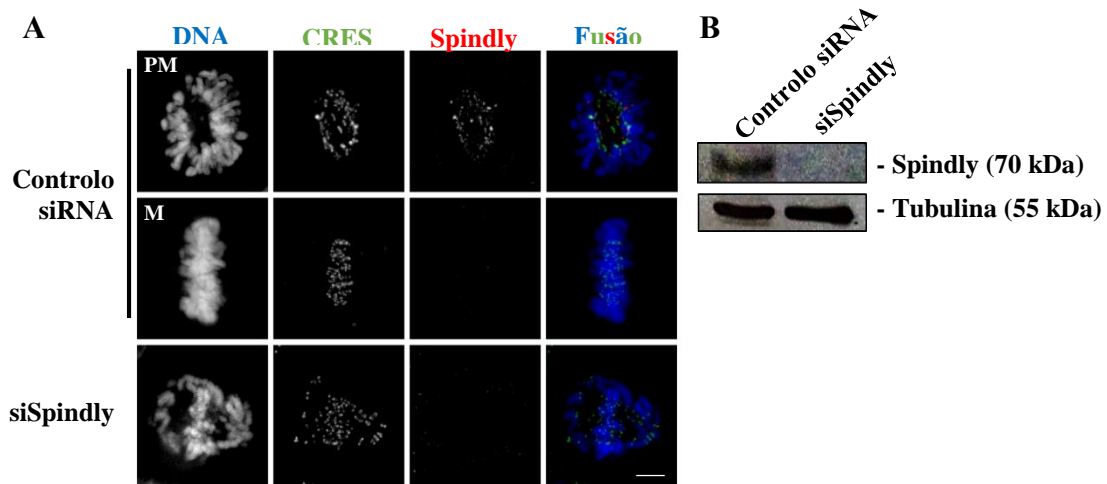


Figura 3.10 A proteína Spindly foi depletada com sucesso na linha celular NCI-H460. (A) Imagens de imunofluorescência de células controle siRNA e células transfetadas com siSpindly. No controle, a Spindly está marcada nas células em prometáfase mas não nas células em metafase, concordante com a sua função no SAC. Nas células transfetadas a marcação da proteína Spindly não é visível. PM – Prometáfase; M – Metafase. Escala 5 μ m (B) Análise de *western blotting*. Nos extratos proteicos de células transfetadas com siSpindly não se observa a banda correspondente à proteína Spindly.

3.3.3 A depleção da Spindly induz paragem na mitose

Devido ao papel que a proteína Spindly exerce na inativação do SAC, averiguou-se se a sua depleção alterava o índice mitótico na linha celular NCI-H460. Em comparação com células controle siRNA em que 1,7% das células se encontram em mitose, as células transfetadas apresentaram um aumento significativo de células mitóticas (35,6%, $p < 0,0001$) (figura 3.11). Este resultado mostra que a depleção da Spindly retém as células em mitose.

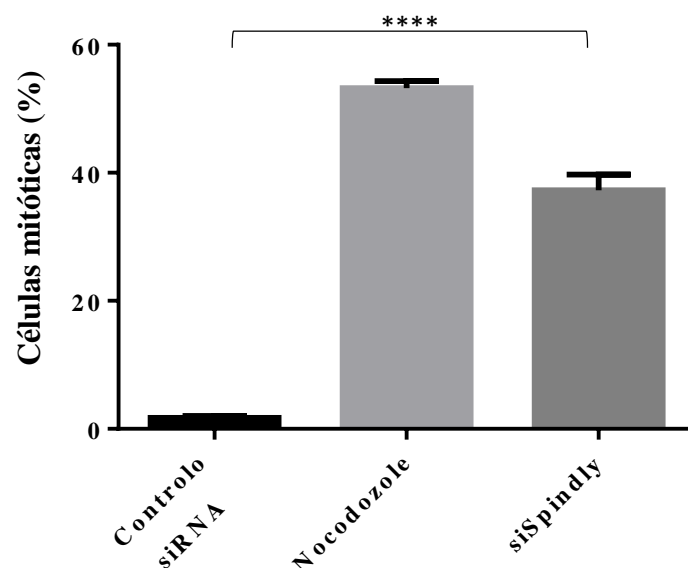


Figura 3.11 A depleção da proteína Spindly induz paragem da mitose na linha celular NCI-H460. A cultura de células transfetadas com siSpindly apresenta uma maior percentagem de células paradas na mitose comparativamente às células controle.

**** $p < 0,0001$

3.3.4 A depleção da Spindly inibe a proliferação celular

Com o objetivo de avaliar o efeito da depleção da proteína Spindly na linha celular NCI-H460, a curto e a longo prazo, realizou-se um ensaio MTT e um ensaio clonogénico, respetivamente. No primeiro ensaio, a viabilidade celular passou de 100%, no controlo, para 71,74%, nas células transfetadas ($p=0,0041$) (figura 3.12). Este resultado sugere que a transfeção com siSpindly tem um efeito antiproliferativo nesta linha celular. A adição de taxol só interferiu significativamente com a viabilidade celular comparativamente a células não tratadas quando se usaram concentrações de 10 nM. Todas as concentrações de taxol testadas em combinação com siSpindly promoveram uma diminuição significativa da viabilidade comparativamente à adição isolada de taxol nas concentrações correspondentes. No entanto, apenas as concentrações de 4 nM e 10 nM de taxol em combinação com a depleção da Spindly provocaram um decréscimo significativo da viabilidade celular em comparação com a depleção isolada da Spindly (figura 3.12). Estes resultados indicam que a depleção da Spindly e o taxol atuam sinergeticamente e que o efeito antiproliferativo desta combinação é superior ao efeito dos tratamentos individuais.

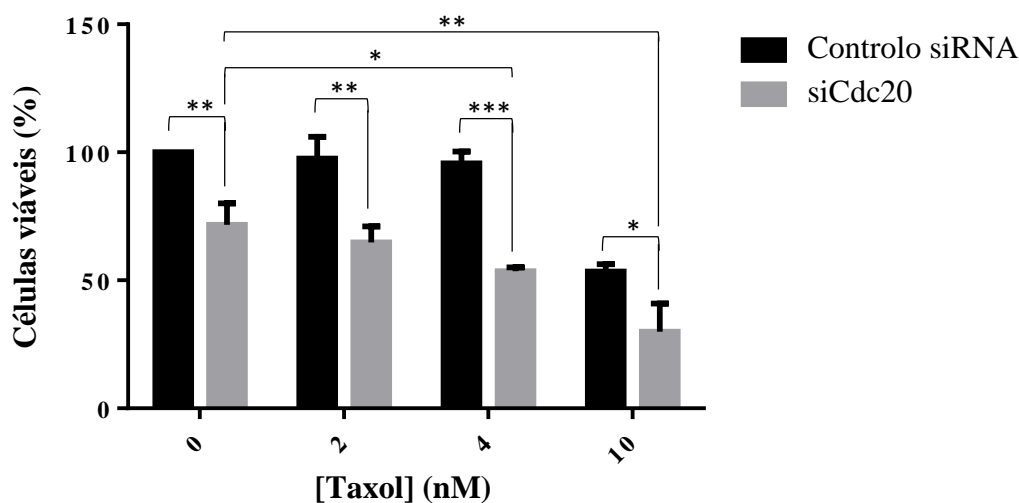


Figura 3.12 A depleção da Spindly tem um efeito antiproliferativo a curto prazo na linha celular NCI-H460. A depleção da proteína Spindly provocou uma diminuição da viabilidade celular, que foi mais pronunciada na presença de taxol a 2 nM, 4 nM e 10 nM.

* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$

A transfeção com siSpindly também interferiu, embora modestamente, com a capacidade das células em formar colónias. No controlo observaram-se 658,5 colónias, enquanto nas células transfetadas observaram-se 409,5 colónias, havendo uma diferença de cerca de 249 colónias ($p=0,0003$) (figura 3.13 B e C). Apesar de a longo prazo o efeito

do taxol adicionado de forma isolada ser mais evidente comparativamente ao controlo, a combinação do taxol com siSpindly provocou uma diminuição mais significativa do número de colónias em comparação com células tratadas apenas com taxol, mas não com células tratadas apenas com siSpindly. Apenas o tratamento de combinação siSpindly + taxol 10 nM, que apresentou 30,5 colónias, mostrou ser superior aos tratamentos individuais com siSpindly (409,5 colónias) ou taxol 10 nM (43 colónias). Globalmente, estes resultados sugerem que a depleção da Spindly potencia o efeito antiproliferativo do taxol a longo prazo.

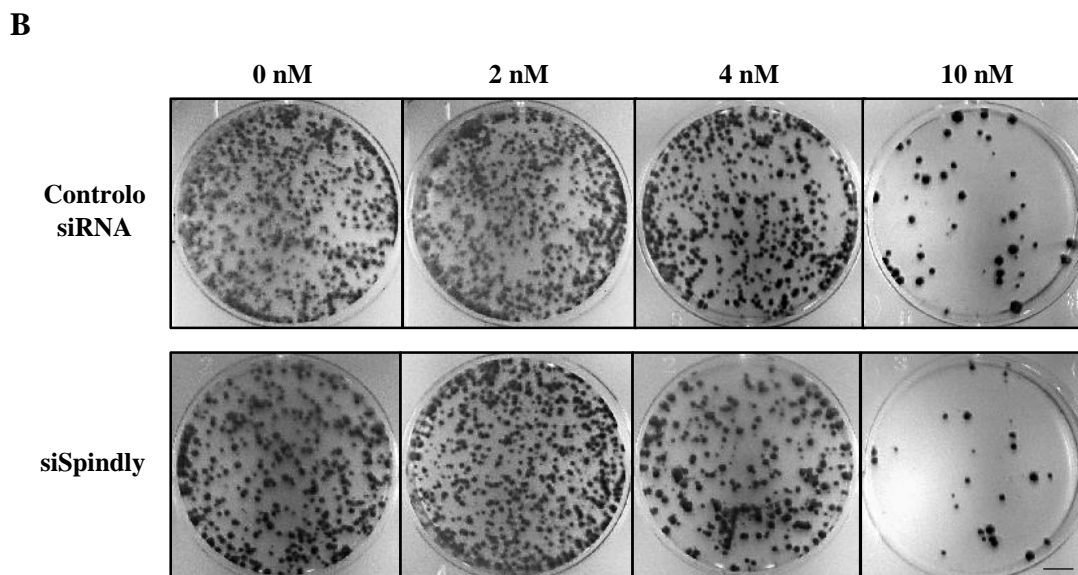
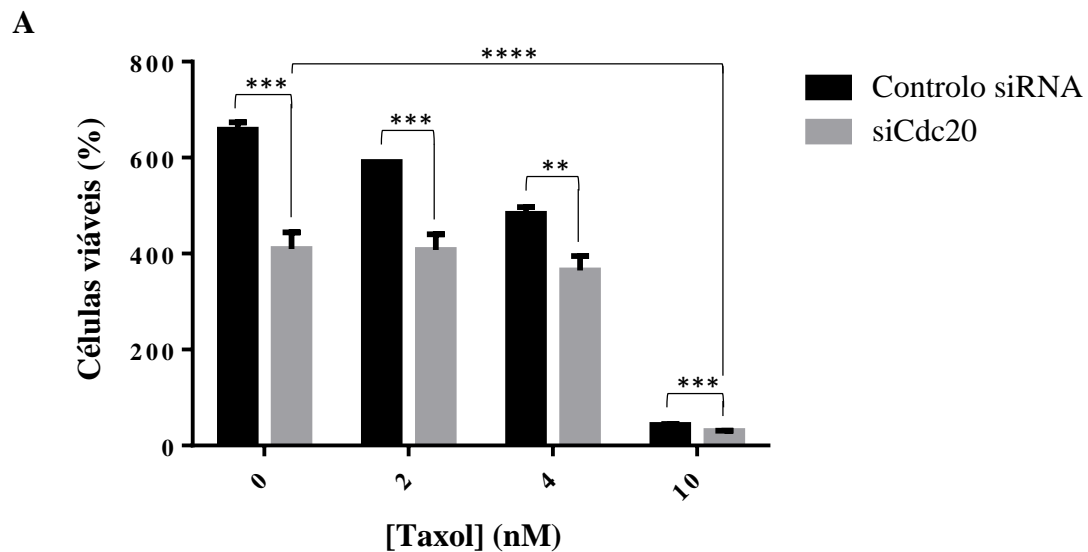


Figura 3.13 A depleção da proteína Spindly tem um efeito antiproliferativo a longo prazo na linha celular NCI-H460. **(A)** A transfeção com siSpindly interferiu com a capacidade de formar colónias. O tratamento de combinação foi mais eficiente comparativamente aos tratamentos individuais. **(B)** Imagens das colónias coradas com cristal violeta. Escala 40 μ m. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$

3.3.5 Morte celular após a depleção da proteína Spindly

Com o intuito de perceber se o decréscimo da viabilidade celular e da capacidade clonogénica na linha celular NCI-H460 se devia à indução de morte celular por apoptose realizou-se um ensaio TUNEL, que deteta a fragmentação das cadeias de DNA. No controlo negativo (células não tratadas e sem morte celular) não se observou marcação por TUNEL (figura 3.14). No controlo positivo, em que as células foram tratadas com DNase, todas as células estavam marcadas com TUNEL. Nas células tratadas com Taxol 4 nM observaram-se várias células marcadas com TUNEL, tal como nas células tratadas com siSpindly. O tratamento de combinação de siSpindly com Taxol 4 nM parece ter aumentado ligeiramente o número de células marcadas com TUNEL. Contudo, a figura 3.14 não representa bem o aumento do número de células marcadas entre os tratamentos individuais e o tratamento de combinação porque as células marcadas encontravam-se dispersas pela lâmina, não se tendo encontrado muitas células no mesmo campo de microscópio. Embora estes resultados sejam preliminares e necessitem de ser quantificados, estes apontam para a apoptose como um possível mecanismo responsável pela diminuição da viabilidade celular após o tratamento de combinação de siSpindly com taxol 4 nM.

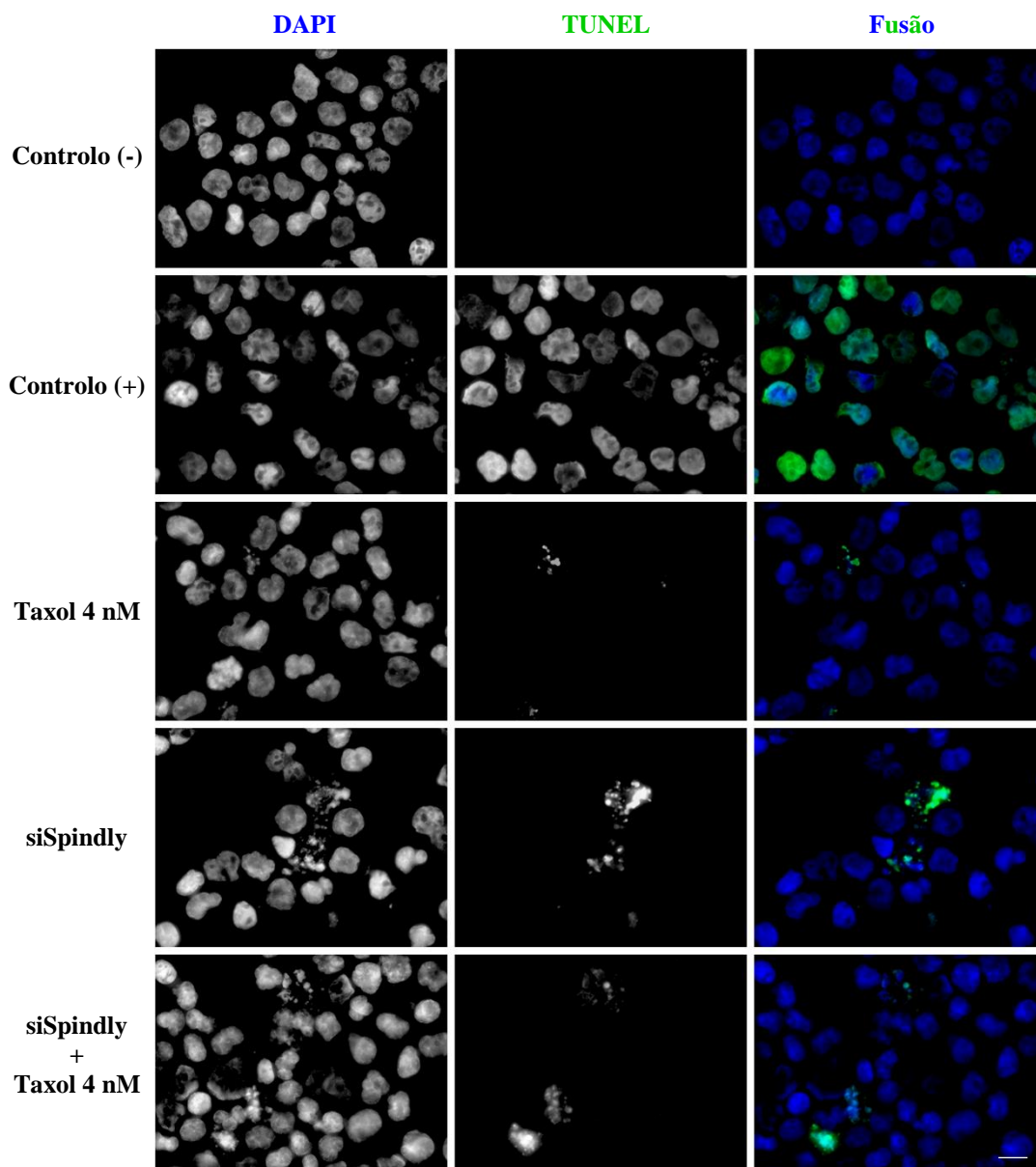


Figura 3.14 Morte celular e depleção da proteína Spindly na linha celular NCI-H460. As células foram marcadas com DAPI (azul) e TUNEL (verde). No controlo negativo não se observou marcação por TUNEL. No controlo positivo, as células foram tratadas com DNase, pelo que a marcação com TUNEL foi observada em todas as células. Nos restantes tratamentos observaram-se algumas células marcadas com TUNEL. Escala 30 μ m.

4. Discussão

Este trabalho foi dividido em três objetivos que visavam usar o SAC como estratégia para inibir a proliferação de linhas celulares tumorais: (1) encontrar um composto inibidor da proteína BubR1, (2) usar a saída da mitose mediada pela proteína Cdc20 para sensibilizar células tumorais à ação do taxol e (3) usar o silenciamento do SAC mediado pela proteína Spindly como potencial alvo terapêutico, sozinho ou em combinação com o taxol.

4.1 À procura de um inibidor da proteína cinase BubR1

Dos compostos testados houve um que se destacou pela evidente diminuição na viabilidade das células tratadas. O composto E5 mostrou que a 300 μ M reduz a viabilidade celular para 23,5% e promove o desalinhamento dos cromossomas, que resulta na paragem da mitose. Este fenótipo coincide com a depleção da BubR1 por RNAi, resultante da sua função na estabilização das ligações entre microtúbulos e cinetocoros [41]. No entanto, este composto provocou também a acumulação de células em mitose, sugerindo que a sua função no SAC permaneceu inalterada. De facto, observou-se que o composto E5 não interfere com a localização da proteína BubR1 nos cinetocoros. Estes resultados sugerem que o composto E5 inibe a função da BubR1 associada à promoção de ligações estáveis entre microtúbulos e cinetocoros, sem interferir com a sua função no SAC. Este trabalho abriu assim expectativas futuras quanto à descoberta de um inibidor da BubR1. Nesse sentido, o composto E5 será objeto de mais estudos que visam melhorar a sua atividade e especificidade.

4.2 Cdc20 como potencial alvo terapêutico

A proteína Cdc20 tem uma função fundamental na saída da mitose. Quando esta proteína não está presente, o complexo APC/C não é ativado, impedindo assim a degradação da Ciclina B1 e da Securina e promovendo uma paragem durante a mitose. A hipótese de que a Cdc20 é um bom alvo terapêutico no cenário do cancro já tinha sido proposta por vários autores [110, 111, 125]. Este trabalho confirma essa hipótese nas linhas celulares de glioblastoma. Adicionalmente, visto que o taxol é um agente antimitótico que exerce a sua função interferindo com os microtúbulos e ativando o SAC, foi proposta a hipótese de que a depleção da Cdc20 sensibiliza as células cancerígenas ao taxol.

Foi reportado que a depleção da proteína Cdc20 apenas induzia uma paragem na mitose caso fosse depletada 98% [128]. Se a depleção silenciava cerca de 90% da Cdc20, a mitose parava e apenas atrasava. Neste trabalho, a depleção da proteína Cdc20 foi confirmada pelo *western blotting* que mostrou o silenciamento de 95,8% e 98,08%, nas linhas celulares U251 e U373, respetivamente. No entanto, ao contrário do que se esperava, não houve uma paragem muito pronunciada da mitose em nenhuma das linhas celulares. Apesar de ter havido um aumento significativo do índice mitótico em ambas as linhas celulares, a percentagem de células mitóticas continuou muito baixa em comparação com o controlo positivo (nocodazole). Deste modo, estes resultados sugerem que após a transfeção com siCdc20 podem ter ficado níveis parciais de Cdc20 suficientes para ativar o complexo APC/C ou que pode existir um mecanismo alternativo que promova a saída da mitose. Não obstante, esta depleção teve um impacto significativo na viabilidade celular e na capacidade clonogénica de ambas as linhas celulares, o que sugere que as células que prosseguem com a mitose ou cessam o seu crescimento e entram num estado senescente ou morrem. De facto, nos estudos realizados até à data focando a depleção da Cdc20 por siRNA reportam a supressão do crescimento celular e a morte celular durante a paragem da mitose [110, 111]. Contudo, ao contrário deste trabalho, nesses estudos observou-se uma paragem visivelmente significativa da mitose pelo que o nível de depleção da proteína pode ter sido mais elevado. No presente trabalho, também a capacidade migratória das células foi averiguada após a depleção da proteína Cdc20 revelando que esta parece ser afetada principalmente na linha celular U373. No entanto, estes são resultados preliminares que necessitam de confirmação. O conjunto dos resultados corrobora a hipótese de que a saída da mitose mediada pela proteína Cdc20 é um bom alvo terapêutico, embora os mecanismos subjacentes à diminuição da viabilidade celular e da capacidade clonogénica ainda não sejam claros. A adição de taxol a diferentes concentrações às células transfetadas teve um impacto ainda maior na viabilidade celular e na capacidade clonogénica, em ambas as linhas celulares. Este impacto foi mais pronunciado com a adição de taxol 5 nM, nas duas linhas celulares. Adicionalmente, este tratamento de combinação com taxol a 5 nM e a 10 nM também interferiu com a capacidade migratória das células, principalmente na linha celular U373. Mais uma vez tratam-se de resultados preliminares que carecem de confirmação. Assim sendo, o conjunto destes resultados confirma a hipótese de que a depleção da proteína Cdc20 sensibiliza as linhas celulares de glioblastoma U251 e U373 ao taxol. O estudo do efeito da transfeção com siCdc20 seguida da adição de taxol já tinha sido realizado numa linha

celular de cancro pancreático por Taniguchi *et al.* [125]. Contudo, este apenas se focou em determinar o IC₅₀ do taxol em células transfetadas e não transfetadas. Não obstante, os resultados obtidos no presente trabalho seguem a tendência observada no trabalho de Tanaguchi, fortalecendo a hipótese de que a Cdc20 é um bom alvo terapêutico para potenciar o efeito do taxol.

Futuramente, para validar os resultados da transfeção com siCdc20 e da sua combinação com taxol, poderia ser feito um ensaio de citometria de fluxo que marcasse um (ou mais) componente(s) específico(s) da mitose. Deste modo, além de confirmar a acumulação das células em mitose após o tratamento com siCdc20, sozinho ou em combinação com o taxol, teríamos uma pista sobre o destino das restantes células. Para complementar os ensaios que avaliam a capacidade migratória das células após a depleção da Cdc20 e da posterior adição de taxol deveria ser feito, por exemplo, um ensaio de *Boyden chamber* que consiste em colocar as células tratadas numa câmara com uma membrana porosa e observar a taxa de células que consegue atravessá-la. Adicionalmente, seria interessante acompanhar o ciclo celular destas células através de *live-cell imaging*. Deste modo poderíamos ter acesso ao seu destino: param em mitose? durante quanto tempo? o que acontece após essa paragem? Por fim, seria importante reproduzir estes resultados num modelo animal de cancro para validar os resultados obtidos *in vitro*.

4.3 Spindly como potencial alvo terapêutico

A proteína Spindly foi recentemente caracterizada como sendo necessária à criação de ligações estáveis entre microtúbulos e cinetocoros, e ao recrutamento da proteína dineína para os cinetocoros, após a ligação destes aos microtúbulos, contribuindo para o silenciamento do SAC. Assim sendo, a ausência desta proteína mantém o SAC ativado, resultando na paragem da mitose. Deste modo, propusemos as hipóteses de que a proteína Spindly é um bom alvo terapêutico para ser usado no tratamento do cancro e que a sua depleção sensibiliza as células cancerígenas à ação de um dos agentes antimitóticos mais usados neste cenário, o taxol.

Neste estudo reportamos pela primeira vez a sobre-expressão da proteína Spindly na linha celular NCI-H460. A depleção desta proteína induziu uma paragem significativa na mitose, em concordância com o que foi descrito noutros estudos [30]. Além disso, neste trabalho verificou-se que a depleção desta proteína causou uma diminuição significativa da proliferação celular, corroborando assim a hipótese de que o silenciamento do SAC

mediado pela Spindly é um bom alvo terapêutico. Complementarmente, foi avaliado o efeito de combinação com o taxol a diferentes concentrações. Este tratamento de combinação mostrou ser mais eficiente na diminuição da viabilidade celular comparativamente ao tratamento individual com siSpindly ou com taxol. No entanto, só o tratamento de combinação siSpindly + taxol 10 nM mostrou ser mais eficiente que o tratamento individual com siSpindly. Curiosamente verificou-se que tanto os tratamentos individuais como o tratamento de combinação siSpindly + taxol promoviam a morte celular por apoptose, havendo apenas um ligeiro aumento da população de células mortas após o tratamento de combinação. Embora os resultados sejam preliminares, estes apontam para a apoptose como mecanismo subjacente ao efeito antiproliferativo dos tratamentos individuais e de combinação. O conjunto destes resultados sugere que a depleção da Spindly tem um efeito sinérgico com o taxol, pelo que corrobora a hipótese de que a depleção desta proteína potencia o efeito do taxol.

Pela primeira vez, este trabalho descreveu o efeito antiproliferativo da depleção da proteína Spindly numa linha celular tumoral, neste caso na linha NCI-H460 do cancro do pulmão. Adicionalmente, verificou-se que a sua depleção acoplada ao uso de taxol revelou ser uma estratégia potencialmente plausível contra a proliferação tumoral. Seria por isso importante confirmar o mecanismo que leva à inibição da proliferação. Para isso poderia ser feita uma análise do perfil do ciclo celular das células tratadas e complementar com os ensaios necessários para validar os resultados obtidos. Adicionalmente, a progressão destas células pela mitose poderia ser acompanhada através de *live-cell imaging* para se conhecer o destino das células tratadas após a retenção na mitose. Uma vez que ainda não foi muito explorado o potencial terapêutico da proteína Spindly, seria importante reproduzir estes ensaios não só noutras linhas de cancro do pulmão para validar os resultados obtidos neste trabalho, mas também noutras linhas celulares cancerígenas. O último passo seria a reprodução destes resultados num modelo animal de cancro para validar a depleção da Spindly, sozinha ou em combinação com o taxol, como potencial alvo terapêutico no tratamento do cancro.

5. Conclusão

Este trabalho teve 3 objetivos, sendo cada um deles suportado pelo SAC como estratégia para inibir a proliferação de linhas celulares tumorais.

No primeiro objetivo propôs-se encontrar um composto inibidor da proteína BubR1, com atividade antiproliferativa. Os resultados obtidos do composto E5 apontam para um inibidor desta proteína capaz de interferir com a viabilidade celular, tendo-se por isso cumprido o primeiro objetivo.

No segundo objetivo propôs-se depletar a proteína Cdc20 como meio para enaltecer o efeito antiproliferativo do taxol. Além de se ter confirmado a Cdc20 como bom alvo terapêutico, verificou-se que a sua depleção sensibiliza as células de glioblastoma à ação do taxol. Embora este trabalho beneficiasse de ensaios complementares, a hipótese de que a depleção da Cdc20 sensibiliza células cancerígenas ao taxol foi confirmada, pelo que o objetivo foi cumprido.

No terceiro e último objetivo propôs-se depletar a proteína Spindly para avaliar o seu potencial terapêutico, sozinha ou em combinação com o taxol. A depleção desta proteína mostrou ter efeito antiproliferativo em células de cancro do pulmão, revelando ser uma estratégia antiproliferativa promissora. Adicionalmente, a combinação desta depleção com o taxol mostrou ter um efeito antiproliferativo superior, confirmando a hipótese de que a depleção da proteína Spindly sensibiliza células cancerígenas à ação do taxol.

6. Bibliografia

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
2. Diaz-Cano SJ. Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(2):1951-2011.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
4. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*. 2000;12(6):547-54.
5. Di Fiore R, D'Anneo A, Tesoriere G, Vento R. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(8):1676-87.
6. Meek DW. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *The Biochemical journal*. 2015;469(3):325-46.
7. Batson J, Astin JW, Nobes CD. Regulation of contact inhibition of locomotion by Eph-ephrin signalling. *Journal of microscopy*. 2013;251(3):232-41.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Rafi M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York, USA: Garland science, Taylor & Francis Group; 2008 November 16, 2007. 1392 p.
9. Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, Qi X, et al. The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*. 2015;42(7):343-53.
10. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):641-8.
11. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *International journal of oncology*. 2012;41(5):1561-9.
12. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86(3):353-64.
13. Dimova I, Popivanov G, Djonov V. Angiogenesis in cancer - general pathways and their therapeutic implications. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2014;19(1):15-21.
14. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*. 2010;70(14):5649-69.
15. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
16. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
17. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(3):220-8.
18. Rajagopalan H, Lengauer C. Aneuploidy and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):338-41.
19. Cheeseman IM, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):33-46.
20. Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*. 2005;30(11):630-41.
21. Blagosklonny MV, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell cycle*. 2002;1(2):103-10.

22. Labib K, De Piccoli G. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011;366(1584):3554-61.
23. Kuntz K, O'Connell MJ. The G(2) DNA damage checkpoint: could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer? *Cancer biology & therapy*. 2009;8(15):1433-9.
24. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Current biology : CB*. 2012;22(22):R966-80.
25. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(5):349-60.
26. 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;154(5):925-36.
27. De Antoni A, Pearson CG, Cimini D, Canman JC, Sala V, Nezi L, et al. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Current biology : CB*. 2005;15(3):214-25.
28. Izawa D, Pines J. The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature*. 2014;517(7536):631-4.
29. Suijkerbuijk SJ, Vleugel M, Teixeira A, Kops GJ. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Developmental cell*. 2012;23(4):745-55.
30. Barisic M, Geley S. Spindly switch controls anaphase: spindly and RZZ functions in chromosome attachment and mitotic checkpoint control. *Cell cycle*. 2011;10(3):449-56.
31. Howell BJ, McEwen BF, Canman JC, Hoffman DB, Farrar EM, Rieder CL, et al. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *The Journal of cell biology*. 2001;155(7):1159-72.
32. Silva PM, Reis RM, Bolanos-Garcia VM, Florindo C, Tavares AA, Bousbaa H. Dynein-dependent transport of spindle assembly checkpoint proteins off kinetochores toward spindle poles. *FEBS letters*. 2014;588(17):3265-73.
33. 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;177(6):1005-15.
34. Tang Z, Shu H, Oncel D, Chen S, Yu H. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Molecular cell*. 2004;16(3):387-97.
35. Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, et al. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell*. 2001;106(1):83-93.
36. Lampson MA, Cheeseman IM. Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends in cell biology*. 2011;21(3):133-40.
37. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(5):379-93.
38. Ciferri C, Musacchio A, Petrovic A. The Ndc80 complex: hub of kinetochore activity. *FEBS letters*. 2007;581(15):2862-9.
39. Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(10):773-85.
40. Duesberg P, Li R, Sachs R, Fabarius A, Upender MB, Hehlmann R. Cancer drug resistance: the central role of the karyotype. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2007;10(1-2):51-8.

41. Kops GJ, Foltz DR, Cleveland DW. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(23):8699-704.
42. 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;44(5):391-400.
43. Wada N, Yoshida A, Miyagi Y, Yamamoto T, Nakayama H, Suganuma N, et al. Overexpression of the mitotic spindle assembly checkpoint genes hBUB1, hBUBR1 and hMAD2 in thyroid carcinomas with aggressive nature. *Anticancer research*. 2008;28(1a):139-44.
44. 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;62(1):13-7.
45. Ryan SD, Britigan EM, Zasadil LM, Witte K, Audhya A, Roopra A, et al. Up-regulation of the mitotic checkpoint component Mad1 causes chromosomal instability and resistance to microtubule poisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(33):E2205-14.
46. Bie L, Zhao G, Cheng P, Rondeau G, Porwollik S, Ju Y, et al. The accuracy of survival time prediction for patients with glioma is improved by measuring mitotic spindle checkpoint gene expression. *PloS one*. 2011;6(10):e25631.
47. Hernando E, Nahle Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*. 2004;430(7001):797-802.
48. Yu L, Guo WC, Zhao SH, Tang J, Chen JL. Mitotic arrest defective protein 2 expression abnormality and its clinicopathologic significance in human osteosarcoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2010;118(3):222-9.
49. Kato T, Daigo Y, Aragaki M, Ishikawa K, Sato M, Kondo S, et al. Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2011;74(1):124-31.
50. Zhang SH, Xu AM, Chen XF, Li DH, Sun MP, Wang YJ. Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Human pathology*. 2008;39(12):1827-34.
51. Abal M, Obrador-Hevia A, Janssen KP, Casadome L, Menendez M, Carpentier S, et al. APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2448-58.
52. 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;33(5):517-23.
53. Espinosa AM, Alfaro A, Roman-Basaure E, Guardado-Estrada M, Palma I, Serralde C, et al. Mitosis is a source of potential markers for screening and survival and therapeutic targets in cervical cancer. *PloS one*. 2013;8(2):e55975.
54. 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.
55. Ding ZY, Wu HR, Zhang JM, Huang GR, Ji DD. Expression characteristics of CDC20 in gastric cancer and its correlation with poor prognosis. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(2):722-7.

56. Marucci G, Morandi L, Magrini E, Farnedi A, Franceschi E, Miglio R, et al. Gene expression profiling in glioblastoma and immunohistochemical evaluation of IGFBP-2 and CDC20. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2008;453(6):599-609.
57. Moura IM, Delgado ML, Silva PM, Lopes CA, do Amaral JB, Monteiro LS, et al. High CDC20 expression is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2014;43(3):225-31.
58. 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.
59. Mondal G, Sengupta S, Panda CK, Gollin SM, Saunders WS, Roychoudhury S. Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis*. 2007;28(1):81-92.
60. Araki K, Nozaki K, Ueba T, Tatsuka M, Hashimoto N. High expression of Aurora-B/Aurora and Ipll-like midbody-associated protein (AIM-1) in astrocytomas. *Journal of neuro-oncology*. 2004;67(1-2):53-64.
61. Kurai M, Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Kashima H, et al. Expression of Aurora kinases A and B in normal, hyperplastic, and malignant human endometrium: Aurora B as a predictor for poor prognosis in endometrial carcinoma. *Human pathology*. 2005;36(12):1281-8.
62. Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, et al. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *The Prostate*. 2006;66(3):326-33.
63. Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, et al. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;450(3):297-302.
64. Ling Y, Zhang X, Bai Y, Li P, Wei C, Song T, et al. Overexpression of Mps1 in colon cancer cells attenuates the spindle assembly checkpoint and increases aneuploidy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;450(4):1690-5.
65. Zhang Z, Zhang G, Kong C. High expression of polo-like kinase 1 is associated with the metastasis and recurrence in urothelial carcinoma of bladder. *Urologic oncology*. 2013;31(7):1222-30.
66. Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer science*. 2003;94(2):148-52.
67. Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, Wang XC, Shen XM, Zhang Y, et al. Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(3):578-88.
68. Weichert W, Ullrich A, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Niesporek S, et al. Expression patterns of polo-like kinase 1 in human gastric cancer. *Cancer science*. 2006;97(4):271-6.
69. Cheng MW, Wang BC, Weng ZQ, Zhu XW. Clinicopathological significance of Polo-like kinase 1 (PLK1) expression in human malignant glioma. *Acta histochemica*. 2012;114(5):503-9.
70. Pellegrino R, Calvisi DF, Ladu S, Ehemann V, Staniscia T, Evert M, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of polo-like kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;51(3):857-68.

71. Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *Journal of cutaneous pathology*. 2002;29(6):354-8.
72. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Expression of polo-like kinase in ovarian cancer is associated with histological grade and clinical stage. *Cancer letters*. 2001;164(1):41-9.
73. Ito Y, Nakamura Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, et al. Polo-like kinase 1 expression in medullary carcinoma of the thyroid: its relationship with clinicopathological features. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2005;72(4):186-90.
74. Mo QQ, Chen PB, Jin X, Chen Q, Tang L, Wang BB, et al. Inhibition of Hec1 expression enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to paclitaxel. *Acta pharmacologica Sinica*. 2013;34(4):541-8.
75. Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE, et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *The Journal of pathology*. 2003;200(1):16-22.
76. 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. *Oncol Rep*. 2006;15(4):933-8.
77. 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;29(12):2241-8.
78. Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, et al. Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(2):405-10.
79. Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, et al. Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2007;174(1):42-7.
80. Burum-Auensen E, DeAngelis PM, Schjolberg AR, Roislien J, Mjaland O, Clausen OP. Reduced level of the spindle checkpoint protein BUB1B is associated with aneuploidy in colorectal cancers. *Cell proliferation*. 2008;41(4):645-59.
81. Tanaka K, Mohri Y, Ohi M, Yokoe T, Koike Y, Morimoto Y, et al. Mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and BubR1, in oesophageal squamous cancer cells and their association with 5-fluorouracil and cisplatin-based radiochemotherapy. *Clinical oncology*. 2008;20(8):639-46.
82. 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;62(11):1003-8.
83. Scintu M, Vitale R, Prencipe M, Gallo AP, Bonghi L, Valori VM, et al. Genomic instability and increased expression of BUB1B and MAD2L1 genes in ductal breast carcinoma. *Cancer letters*. 2007;254(2):298-307.
84. Schnerch D, Schmidts A, Follo M, Udi J, Felthaus J, Pfeifer D, et al. BubR1 is frequently repressed in acute myeloid leukemia and its re-expression sensitizes cells to antimetabolic therapy. *Haematologica*. 2013;98(12):1886-95.
85. 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;109(2):257-67.
86. Rizzardi C, Torelli L, Barresi E, Schneider M, Canzonieri V, Biasotto M, et al. BUBR1 expression in oral squamous cell carcinoma and its relationship to tumor stage and survival. *Head & neck*. 2011;33(5):727-33.
87. Lee J, Lee CG, Lee KW, Lee CW. Cross-talk between BubR1 expression and the commitment to differentiate in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Experimental & molecular medicine*. 2009;41(12):873-9.
88. Gladhaug IP, Westgaard A, Schjolberg AR, Burum-Auensen E, Pomianowska E, Clausen OP. Spindle proteins in resected pancreatic head adenocarcinomas: BubR1 is an independent prognostic factor in pancreatobiliary-type tumours. *Histopathology*. 2010;56(3):345-55.
89. Cirak Y, Sarsik B, Cakar B, Sen S, Simsir A, Uslu R. Predictive and prognostic values of Tau and BubR1 protein in prostate cancer and their relationship to the Gleason score. *Medical oncology*. 2013;30(2):526.
90. Haruki N, Saito H, Harano T, Nomoto S, Takahashi T, Osada H, et al. Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1 and BUB3 in human lung cancers. *Cancer letters*. 2001;162(2):201-5.
91. Pinto M, Soares MJ, Cerveira N, Henrique R, Ribeiro FR, Oliveira J, et al. Expression changes of the MAD mitotic checkpoint gene family in renal cell carcinomas characterized by numerical chromosome changes. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;450(4):379-85.
92. de Voer RM, Geurts van Kessel A, Weren RD, Ligtenberg MJ, Smeets D, Fu L, et al. Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2013;145(3):544-7.
93. Ko YH, Roh JH, Son YI, Chung MK, Jang JY, Byun H, et al. Expression of mitotic checkpoint proteins BUB1B and MAD2L1 in salivary duct carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2010;39(4):349-55.
94. Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer. *PloS one*. 2011;6(4):e18135.
95. Li J, Gao JZ, Du JL, Huang ZX, Wei LX. Increased CDC20 expression is associated with development and progression of hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*. 2014;45(4):1547-55.
96. Uzdensky A, Demyanenko S, Bibov M, Sharifulina S, Kit O, Przhedetski Y, et al. Expression of proteins involved in epigenetic regulation in human cutaneous melanoma and peritumoral skin. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(8):8225-33.
97. Smith SL, Bowers NL, Betticher DC, Gautschi O, Ratschiller D, Hoban PR, et al. Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability. *British journal of cancer*. 2005;93(6):719-29.
98. Chieffi P, Troncone G, Caleo A, Libertini S, Linardopoulos S, Tramontano D, et al. Aurora B expression in normal testis and seminomas. *The Journal of endocrinology*. 2004;181(2):263-70.
99. Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V, et al. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(2):928-35.

100. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer letters*. 2001;169(1):41-9.
101. Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Takezaki Y, Tasaka T, Togitani K, et al. A novel treatment strategy targeting polo-like kinase 1 in hematological malignancies. *Leukemia*. 2009;23(9):1564-76.
102. Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, Grobholz R, Kaufmann M, Stutte HJ, et al. Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Pathology, research and practice*. 2000;196(11):753-9.
103. Gray PJ, Jr., Bearss DJ, Han H, Nagle R, Tsao MS, Dean N, et al. Identification of human polo-like kinase 1 as a potential therapeutic target in pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2004;3(5):641-6.
104. Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, et al. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 1997;14(5):543-9.
105. Musio A, Montagna C, Zambroni D, Indino E, Barbieri O, Citti L, et al. Inhibition of BUB1 results in genomic instability and anchorage-independent growth of normal human fibroblasts. *Cancer research*. 2003;63(11):2855-63.
106. Chen H, Lee J, Kljavin NM, Haley B, Daemen A, Johnson L, et al. Requirement for BUB1B/BUBR1 in tumor progression of lung adenocarcinoma. *Genes & cancer*. 2015;6(3-4):106-18.
107. Daniel J, Coulter J, Woo JH, Wilsbach K, Gabrielson E. High levels of the Mps1 checkpoint protein are protective of aneuploidy in breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(13):5384-9.
108. Wu G, Qiu XL, Zhou L, Zhu J, Chamberlin R, Lau J, et al. Small molecule targeting the Hec1/Nek2 mitotic pathway suppresses tumor cell growth in culture and in animal. *Cancer research*. 2008;68(20):8393-9.
109. Kawata E, Ashihara E, Kimura S, Takenaka K, Sato K, Tanaka R, et al. Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(9):2904-12.
110. Huang HC, Shi J, Orth JD, Mitchison TJ. Evidence that mitotic exit is a better cancer therapeutic target than spindle assembly. *Cancer cell*. 2009;16(4):347-58.
111. Kidokoro T, Tanikawa C, Furukawa Y, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. CDC20, a potential cancer therapeutic target, is negatively regulated by p53. *Oncogene*. 2008;27(11):1562-71.
112. Li Y, Zhou W, Wei L, Jin J, Tang K, Li C, et al. The effect of Aurora kinases on cell proliferation, cell cycle regulation and metastasis in renal cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2012;41(6):2139-49.
113. Zhou J, Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents*. 2005;5(1):65-71.
114. Hadfield JA, Ducki S, Hirst N, McGown AT. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Progress in cell cycle research*. 2003;5:309-25.
115. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *The Journal of biological chemistry*. 1981;256(20):10435-41.
116. Jordan MA, Thrower D, Wilson L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer research*. 1991;51(8):2212-22.
117. Yamada HY, Gorbsky GJ. Spindle checkpoint function and cellular sensitivity to antimetabolic drugs. *Molecular cancer therapeutics*. 2006;5(12):2963-9.
118. Moudi M, Go R, Yien CY, Nazre M. Vinca alkaloids. *International journal of preventive medicine*. 2013;4(11):1231-5.

119. Rowinsky EK. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual review of medicine*. 1997;48:353-74.
120. Kunjachan S, Rychlik B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(13-14):1852-65.
121. The top 10 causes of death: World Health Organization; 2012 [updated 201421/03/2015]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>.
122. Risco de Morrer 2012. In: Instituto Nacional de Estatística IP, Direção-Geral de Saúde, editor. 2014. p. 1-181.
123. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. 2015;20(7):13384-421.
124. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-82.
125. Taniguchi K, Momiyama N, Ueda M, Matsuyama R, Mori R, Fujii Y, et al. Targeting of CDC20 via small interfering RNA causes enhancement of the cytotoxicity of chemoradiation. *Anticancer research*. 2008;28(3a):1559-63.
126. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*. 2014;25(18):2677-81.
127. Chan YW, Fava LL, Uldschmid A, Schmitz MH, Gerlich DW, Nigg EA, et al. Mitotic control of kinetochore-associated dynein and spindle orientation by human Spindly. *The Journal of cell biology*. 2009;185(5):859-74.
128. Wolthuis R, Clay-Farrace L, van Zon W, Yekezare M, Koop L, Ogink J, et al. Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Molecular cell*. 2008;30(3):290-302.