



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LILIAN AREAL MARQUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MONASTROL EM  
LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE  
ADENOCARCINOMA DE MAMA (MCF-7) E EPITÉLIO  
MAMÁRIO (HB4a)**

---

Londrina  
2015

LILIAN AREAL MARQUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MONASTROL EM  
LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE  
ADENOCARCINOMA DE MAMA (MCF-7) E EPITÉLIO  
MAMÁRIO (HB4a)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2015

M357a Marques, Lilian Areal.

Avaliação dos efeitos do monastrol em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e epitélio mamário (HB4a) / Lilian Areal Marques. – Londrina, 2015.

72 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Teses. 2. Mamas – Câncer – Teses. 3. Ciclo celular – Teses. 4. Genética – Expressão – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agronômico do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.385.5

LILIAN AREAL MARQUES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MONASTROL EM LINHAGENS  
CELULARES HUMANAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA  
(MCF-7) E EPITÉLIO MAMÁRIO (HB4a)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Regina Lepri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucia Giuliano Caetano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de março de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse e ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

A Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Genética e Biologia Molecular por me disponibilizar essa oportunidade.

Agradeço ao meu orientador Mário Sérgio Mantovani por todo conhecimento e paciência por ele dedicado.

Agradeço a todos do laboratório por tantos ensinamentos e momentos de alegria dentro e fora do laboratório.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, tornando esta caminhada mais leve e agradável.

E por último e não menos importante, agradeço de forma grata e grandiosa a minha família e em especial aos meus pais pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

MARQUES, Lilian Areal. **Avaliação dos efeitos do monastrol em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e epitélio mamário (HB4a)**. 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres de todo mundo e a que representa as maiores taxas de mortalidade nesse grupo. A maioria das drogas antineoplásicas atuais não apresentam seletividade e, portanto, afetam tanto as células tumorais quanto as saudáveis. Dessa forma, a busca por novas drogas anticâncer é de grande interesse. O monastrol é uma molécula sintética que atua como inibidor alostérico da cinesina mitótica Eg5. Estudos mostram que esta cinesina está superexpressa em células tumorais quando comparadas com células normais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito antiproliferativo do monastrol em célula humana tumoral de adenocarcinoma mamário (MCF-7) e não tumoral de epitélio de mama (HB4a). As células MCF-7 e HB4a foram expostas ao monastrol nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  para a análise de citotoxicidade (ensaio MTT) e proliferação celular (*Real-time Cell Analyzer*); e nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{M}$  para os demais testes. Foram avaliadas por citometria de fluxo a dinâmica do ciclo celular (Iodeto de propídeo) e indução de apoptose (Anexina V), além da obtenção de índice mitótico e apoptótico por análise morfológica com coloração de Hoechst 33342. Os níveis de mRNA de genes do ciclo celular (*TP53*, *EG5*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDC25C*, *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CDKN1C*), sinalizador de danos (*GADD45A*) e apoptose (*BAX*, *BAK*, *BCL2* e *BCLXL*) foram verificados por RT-qPCR. No ensaio de citotoxicidade, o monastrol reduziu a viabilidade em relação ao controle apenas na linhagem tumoral MCF-7 a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Na avaliação da proliferação celular em tempo real também houve uma queda na proliferação das células MCF-7, enquanto as células HB4a não apresentaram alterações na cinética de crescimento. A análise da apoptose mostrou que o monastrol não induz morte celular por apoptose em nenhuma das linhagens celulares. Já na análise do ciclo celular, a exposição das células MCF-7 ao monastrol (50  $\mu\text{M}$ ) levou ao aumento da população G1 e G2/M com concomitante diminuição de S, enquanto na linhagem celular HB4a houve aumento de G2/M e diminuição de G1. Ambas células apresentaram aumento dos níveis de índice mitótico. A análise da expressão gênica demonstrou que o monastrol aumentou em 5 vezes os níveis de RNAm do gene *CDKN1A* nas células MCF-7 e reduziu em 2 vezes os níveis de RNAm de *CDKN1C* na linhagem HB4a. Estes resultados sugerem que o monastrol possui maior citotoxicidade sobre as células tumorais MCF-7, quando comparados com as células não tumorais HB4a., tornando-o um possível quimioterápico anticâncer.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade. Ciclo celular. Seletividade. Cinesina Eg5. Expressão gênica.

MARQUES, Lilian Areal. **Evaluation of the effects of monastrol in human cell lines of breast adenocarcinoma (MCF-7) and mammary epithelium (HB4a)**. 2015. 72p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## ABSTRACT

Breast cancer is the cancer that affects more women around the world and that is the highest mortality rates in this group. Most current anticancer drugs do not exhibit selectivity, and therefore affect both the tumor cells and healthy ones. Thus, the search for new anticancer drugs is of great interest. The monastrol is a synthetic molecule that acts as an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. Studies show that this kinesin is overexpressed in tumor cells when compared to normal cells. Thus, the objective of this study was to investigate the antiproliferative effect of monastrol in human tumor cell breast adenocarcinoma (MCF-7) and non-tumor breast epithelium (HB4a). MCF-7 and HB4a cells were exposed to monastrol in concentrations of 5, 25, 50, 75 and 100  $\mu\text{M}$  for the cytotoxicity assay (MTT assay) and cell proliferation (Real-Time Cell Analyzer); and at concentrations of 25 and 50  $\mu\text{M}$  for the other tests. In flow cytometry are assessed dynamics of the cell cycle (propidium iodide) and induction of apoptosis (Annexin V), as well as for morphological analysis obtaining mitotic and apoptotic index by staining with Hoechst 33342. The mRNA levels of cell cycle gene (*P53*, *EG5*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDC25C*, *CDKN1A*, *CDKN1B* and *CDKN1C*), the damage indicator (*GADD45A*) and apoptosis (*BAX*, *BAK*, *BCL2* and *BCLXL*) were verified by RT-qPCR. In the cytotoxicity assay, monastrol reduced viability only in MCF-7 tumor, compared to the control, from the concentration of 50  $\mu\text{M}$ . In real-time cell analyzer was also a decrease in the proliferation of MCF-7 cells, while the HB4a curve showed no change in growth kinetics. Monastrol does not induce cell death by apoptosis in any of the cell lines. In the analysis of the cell cycle, monastrol (50  $\mu\text{M}$ ) increased the population of MCF-7 cells in G1 and G2 / M with a concomitant decrease in S, whereas the cell line HB4a an increase of the G2 / M population and decrease of the G1. Both cells showed increases in mitotic index levels. The gene expression analysis showed that monastrol increased 5 fold the levels of mRNA *CDKN1A* gene in MCF-7 cells and reduced the mRNA levels *CDKN1C* in lineage HB4a by 2-fold. These results suggest that monastrol has higher cytotoxicity on MCF-7 tumor cells compared to non-tumor cells HB4a., making it possible anticancer chemotherapy.

**Keywords:** Cytotoxicity. Cell cycle. Selectivity. Kinesin Eg5. Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

### FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- Figura 1** - Fotomicrografia de luz da cultura celular das linhagens MCF-7 (A) e HB4a (B). Aumento real de 460 vezes. .... 12
- Figura 2** - Ciclo celular. O ciclo celular tem no centro de sua regulação as CDKs que são ativadas pelas ciclinas ou então inativadas pelos seus inibidores, as CKI. Fosforilações e desfosforilações em sítios específicos também são responsáveis por regular esse complexo ..... 14
- Figura 3** - Parada em G2/M do ciclo celular induzida por p53 e suas proteínas alvo em resposta a estresse celular. GADD45 bloqueia Cdk1 (cdc2) e não permite a ligação com ciclina B. 14-3-3 $\sigma$  sequestra Cdk1 e Cdc25C para o citoplasma, impedindo assim a ativação na fase G2. p53 ainda pode inibir diretamente Cdk1 e ciclina B ..... 15
- Figura 4** - Estrutura química do composto Monastrol..... 23

### ARTIGO

- Título: Monastrol causa parada diferencial do ciclo celular nas linhagens HB4a e MCF-7 sem induzir apoptose ..... 36
- Figura 1** - Citotoxicidade nas células MCF-7 e HB4a após exposição ao monastrol. Valores de absorbância obtidos pelo ensaio de MTT a partir do tratamento de células MCF-7 e HB4a com monastrol 0 (controle), 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M por 24 (A) e 48 horas (B). Os pontos representam valores médios de absorbância  $\pm$  desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*\*\*) $p < 0,001$ ). ..... 47
- Figura 2** - Cinética de crescimento celular em tempo real das células MCF-7. Curvas de índice celular da linhagem MCF-7 obtidas pelo sistema xCELLigence-RTCA mostrando a cinética de crescimento celular após exposição ao tratamento com monastrol. O Índice celular (IC) foi mensurado a cada 30 min e os pontos representam valores médios de absorbância obtidos em triplicatas..... 48

- Figura 3** - Cinética de crescimento celular em tempo real das células HB4a. Curvas de índice celular da linhagem HB4a obtidas pelo sistema xCELLigence-RTCA mostrando a cinética de crescimento celular após exposição ao tratamento com monastrol. O Índice celular (IC) foi mensurado a cada 30 minutos e os pontos representam valores médios de absorbância obtidos em triplicatas..... 49
- Figura 4** - Análise da distribuição do ciclo celular das células MCF-7 por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$  na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 24 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. B) Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$  na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 48 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*  $p < 0,05$ ); (\*\* $p < 0,01$ ); (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. .... 51
- Figura 5** - Análise da distribuição do ciclo celular das células HB4a por citometria de fluxo (PI). A) Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$  na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 24 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. B) Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$  na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 48 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*  $p < 0,05$ ); (\*\* $p < 0,01$ ); (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. .... 52
- Figura 6** - Monastrol leva ao aumento do índice mitótico de células MCF-7. Aspecto morfológico e índice mitótico por coloração com Hoechst 33342 das células MCF-7 tratadas por 24 e 48 horas com monastrol. Acima: valores médios do índice mitótico obtido em célula MCF-7 tratadas com monastrol. A- C) Células expostas por 24 horas ao monastrol 25 (B e B1) e 50  $\mu\text{M}$  (C-C1). D – E) Células expostas por 48 horas ao monastrol 25 (E e E1) e 50  $\mu\text{M}$  (F e F1). Controle: (A e D). As setas indicam células em divisão. Luz normal: A- F. Fluorescência: A1-F1. Aumento real de

460x. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*\* $p < 0,01$ ); (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. .... 54

**Figura 7** - Monastrol leva ao aumento do índice mitótico de células HB4a. Aspecto morfológico e índice mitótico por coloração com Hoechst 33342 das células HB4a tratadas por 24 e 48 horas com monastrol. Acima: valores médios do índice mitótico obtido em células HB4a tratadas com monastrol. A- C) Células expostas por 24 horas ao monastrol 25 (B e B1) e 50  $\mu\text{M}$  (C-C1). D – E) Células expostas por 48 horas ao monastrol 25 (E e E1) e 50  $\mu\text{M}$  (F e F1). Controle: (A e D). As setas indicam células em divisão. Cabeça de seta: Célula multinucleada. Luz normal: A- F. Fluorescência: A1-F1. Aumento real de 460x. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independente. Diferença estatística: (\*\* $p < 0,01$ ); (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett. .... 55

**Figura 8** - Células MCF-7 não são encaminhadas a apoptose. Células MCF-7 expostas a 25 e 50  $\mu\text{M}$  de monastrol por 24 horas, coradas com anexina-V/PE e 7AAD para obtenção da porcentagem de células apoptóticas por citometria de fluxo. A) Quantificação de células viáveis (AV-/7AAD -), em apoptose inicial (AV+/7AAD -) e em apoptose tardia/necrose (AV+/7AAD + e AV-/7AAD +) após 24 horas de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . B) População de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Os dados representam valores médios de três experimentos independentes  $p < 0,05$ . .... 56

**Figura 9** - Células HB4a não são encaminhadas a apoptose. Células HB4a expostas a 25 e 50  $\mu\text{M}$  de monastrol por 24 horas, coradas com anexina-V/FITC e PI para obtenção da porcentagem de células apoptóticas por citometria de fluxo. A) Quantificação de células viáveis (AV-/PI-), em apoptose inicial (AV+/PI-) e em apoptose tardia/necrose (AV+/PI+ e AV-/PI+) após 24 horas de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . B) População de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Os dados representam valores médios de três experimentos independentes  $p < 0,05$  ..... 57

- Figura 10** - Expressão relativa de genes relacionados ao ciclo celular. Níveis dos transcritos de EG5, TP53, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CCNA2, CCNB1, CCND1, CCNE1, CDC25A e CDC25C obtidos por RT-qPCR após 24 h de tratamento com monastrol 50  $\mu$ M. Os dados são apresentados como a média da expressão relativa de três experimentos independentes com duplicata mecânica. Razão e análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009 com de expressão  $\geq 2$  ou  $\leq -2$ . (\*) significativo com  $p \leq 0,05$ . ..... 58
- Figura 11** - Expressão relativa dos genes relacionados a dano no DNA (GADD45A) e apoptose (BAX, BAK, BCL-2 e BCL-XL) obtidas por RT-qPCR após 24 h de tratamento com monastrol 50  $\mu$ M. Os dados são apresentados como a média da expressão relativa de três experimentos independentes com duplicata mecânica. Razão e análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009 com crivo de expressão  $\geq 2$  ou  $\leq -2$ . (\*) significativo com  $p \leq 0,05$ ... ..... 59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Relação de <i>primers</i> utilizados na análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.....	45
---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	10
<b>2</b>	<b>Fundamentação teórica</b> .....	11
2.1	Ciclo celular .....	12
2.2	TP53 .....	14
2.3	Morte Celular .....	16
2.3.1	Apoptose.....	16
2.3.2	Catástrofe mitótica .....	17
2.3.3	Senescência .....	18
2.4	Mitose e Terapia do Câncer.....	19
2.4.1	Limitações a terapias anticâncer.....	20
2.4.2	Cinesinas mitóticas – Eg5 .....	21
2.5	Monastrol.....	22
<b>3</b>	<b>Objetivos</b> .....	26
3.1	Objetivos gerais .....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
	<b>Referências</b> .....	27
<b>4</b>	<b>Artigo</b> .....	36
<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	39
<b>2</b>	<b>Material e métodos</b> .....	40
2.1	<i>Cultura celular</i> .....	40
2.2	<i>Agentes químicos</i> .....	40
2.3	<i>Ensaio de citotoxicidade (MTT)</i> .....	41
2.4	<i>Análise da proliferação celular em tempo real pelo sistema xCELLigence</i> .....	41
2.5	<i>Análise de ciclo celular por citometria de fluxo</i> .....	42
2.6	<i>Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo (anexinaV)</i> .....	42
2.7	<i>Avaliação da indução de apoptose in situ e Índice mitótico</i> .....	43

2.8	<i>Análise da expressão gênica por RT-qPCR</i> .....	44
2.9	<i>Análise estatística</i> .....	46
<b>3</b>	<b>Resultados</b> .....	46
3.1	<i>Monastrol induz citotoxicidade na linhagem MCF-7</i> .....	46
3.2	<i>MCF-7 e HB4a apresentam padrões distintos de resposta na análise da cinética celular em tempo real (RTCA)</i> .....	47
3.3	<i>Monastrol causa parada no ciclo celular e aumento do índice mitótico</i> .....	49
3.4	<i>Monastrol não induz apoptose após aprisionamento no ciclo celular</i> .....	56
3.5	<i>Monastrol leva a indução de expressão de CDKN1A em células MCF-7 e redução de CDKN1C em HB4a</i> .....	57
<b>4</b>	<b>Discussão</b> .....	59
	<b>Referências</b> .....	64
<b>5</b>	<b>Considerações finais</b> .....	68
	<b>Apêndices</b> .....	69

## 1. Introdução

O câncer é uma doença genética resultante do acúmulo de mutações que levam a uma série de alterações celulares, as quais têm como consequência a proliferação celular desordenada e resistência ao mecanismo de apoptose. Atualmente, com o crescente número de casos de câncer no mundo, existe um grande interesse pela busca de novos medicamentos para o tratamento dessa doença.

A maioria das drogas antineoplásicas atuais não apresentam seletividade e, portanto, afetam tanto as células tumorais quanto as saudáveis. A ausência de seletividade dos agentes antineoplásicos e o mecanismo de resistência das células tumorais à apoptose são fatores que podem impedir o sucesso da quimioterapia. Sendo assim, é grande a busca por novas moléculas que atuem de modo seletivo contra células tumorais, a fim de minimizar os efeitos adversos da quimioterapia convencional e de tornar o tratamento mais eficaz.

O monastrol é uma diidropirimidinona sintética de baixo peso molecular, célula-permeável, e estudos demonstram a potencialidade dessa molécula em interferir na formação do fuso mitótico e na progressão do ciclo celular. Este composto atua como inibidor alostérico da cinesina mitótica Eg5, e, portanto, com função exclusiva na mitose. Estudos mostram que esta cinesina está superexpressa em células tumorais quando comparada com células normais o que a torna um bom alvo para agentes quimioterápicos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do monastrol em linhagens mamárias, assim como verificar seletividade contra células tumorais. Os dados obtidos poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação dessa molécula.

## 2. Fundamentação teórica

Nas últimas décadas o câncer se tornou um problema de saúde mundial e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2030, haverá 21,4 milhões de casos incidentes, 13,2 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com essa doença. O câncer de mama é a neoplasia mais comum entre as mulheres e é causa de morte que mais acomete esse grupo quando se trata de neoplasias. As estimativas do Instituto Nacional do Câncer é que em 2014 e 2015 haja 57 mil novos casos de câncer de mama por ano, sendo o terceiro mais incidente na população (INCA, 2014).

O câncer tem como característica a perda da homeostase celular, onde há um desbalanço entre proliferação e morte celular. É uma doença multifatorial na qual tanto os fatores intrínsecos do organismo como os extrínsecos possuem grande importância. Entre os fatores intrínsecos, duas características que conhecidamente possibilitam a promoção e progressão tumoral são a instabilidade genômica, que leva a mutações e rearranjos cromossômicos, e o estado inflamatório das lesões pré-malignas e malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

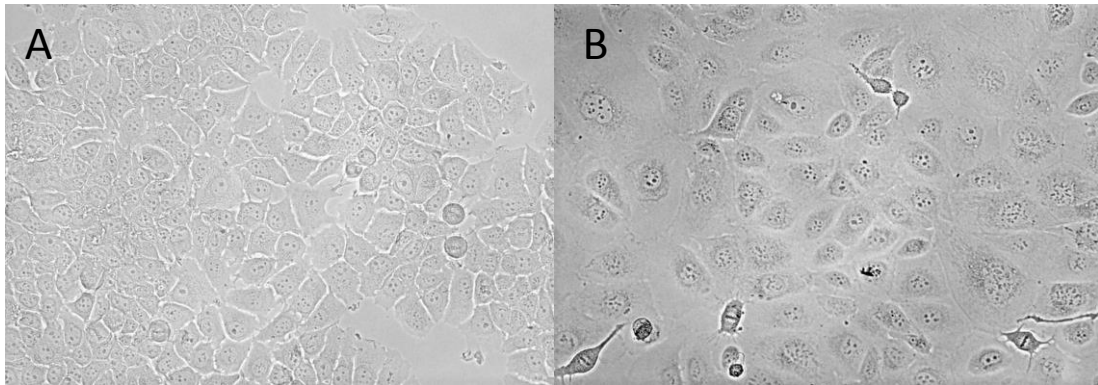
A tumorigênese é um processo multipasso que envolve diversas alterações genéticas que irão transformar células normais em células tumorais, assim como manter o crescimento tumoral e a capacidade de disseminação. As seis alterações funcionais necessárias para estes processos são: manter sinalização de proliferação, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e invasão de tecidos vizinhos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Atualmente, duas novas características estão sendo consideradas cruciais para fenótipos de câncer: a capacidade de reprogramar o metabolismo celular, a fim de suportar de forma mais eficaz a proliferação neoplásica, e a fuga do sistema imunológico (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O câncer é a consequência direta da perda de controle da proliferação celular devido a danos nos mecanismos de regulação do ciclo celular e no reparo dos danos no DNA. Apesar da enorme variabilidade nas características de células tumorais, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos (OKADA; MAK, 2004).

Neste contexto estudos *in vitro* que utilizam linhagens de mama para avaliação de novos compostos têm sido uma importante ferramenta. A linhagem MCF-7 (Figura 1A) foi isolada pela primeira vez em 1970 e desde então é muito utilizada para estudos de câncer de mama *in vitro*, já que esta retém características do tecido epitelial mamário, como a presença de receptores de estrogênio e progesterona em sua superfície e pelo fato de ser responsiva ao fator

de necrose tumoral  $\alpha$  (LEVENSON; JORDAN, 1997; SOULE, et al., 1973). Apesar de ser uma linhagem tumoral, o gene *TP53* não está mutado (LACROIX; TOILLON; LECLERCQ, 2006).

A linhagem permanente HB4a (Figura 1B) foi imortalizada a partir de células normais do lúmen mamário (STAMPS, et al., 1994). E assim como a linhagem MCF-7, esta mantém similaridades com o tecido normal de mama como, por exemplo, a presença de receptores de superfície. Git e colaboradores (2008) demonstraram que o padrão de expressão de RNAm dessas células é similar com aquele encontrado no tecido de mama.



**Figura 1.** Fotomicrografia de luz da cultura celular das linhagens MCF-7 (A) e HB4a (B). Aumento real de 460 vezes.

## 2.1 Ciclo celular

O ciclo celular é uma série de eventos sequenciais e lineares altamente regulados, onde um passo tem de ser finalizado antes que o próximo seja iniciado. Ele é composto de quatro fases: G1, S, G2, M (Figura 2). Na fase S ocorre a replicação do DNA e na fase M, a divisão celular. A fase G1 é sensível aos sinais mitogênicos e ocorre após a mitose e antes da fase S. Já a fase G2 ocorre depois da fase S e nesta etapa ocorre a preparação para a divisão celular. Além destas fases, há a fase G0, fase quiescente, onde as células permanecem quando não existe a necessidade de novas divisões mitóticas, seja por alta densidade celular ou por privação de sinalização para divisão (JOHNSON; WALKER, 1999; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

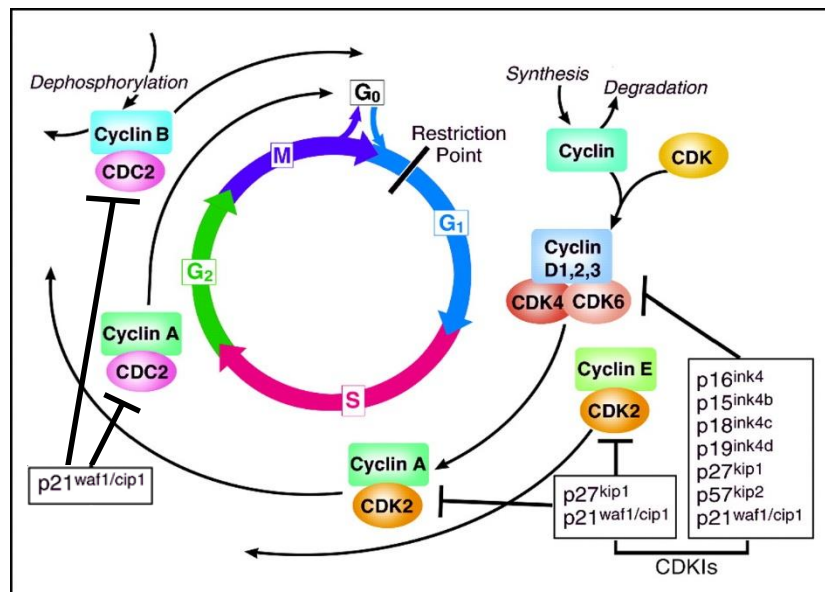
O ciclo celular é continuamente regulado por diversas vias, mas as quinases dependentes de ciclinas (Cdks) e suas unidades reguladoras, as ciclinas, possuem um papel fundamental neste processo. Cada complexo de Cdk/ciclina atua em etapas diferentes do ciclo. Há três Cdks (Cdks 2, 4 e 6) que agem na interfase e uma na mitose (Cdk1, também conhecida como Cdc2)

que se complexam com dez ciclinas de quatro grupos (A, B, D e E) (MALUMBRES; BARBACID, 2005;2009).

Em condições fisiológicas em resposta a sinais mitogênicos há o aumento da expressão de ciclinas D, as quais irão se associar com as Cdk4 e Cdk6, que irão ser encaminhadas ao núcleo. Este complexo ativo então irá fosforilar as proteínas membros da família retinoblastoma (Rb). A hiperfosforilação de Rb causa a dissociação desta proteína de fatores de transcrição como os membros da família E2F, permitindo assim a transcrição de genes que irão atuar na fase S (COBRINIK, 2005; PLANAS-SILVA; WEINBERG, 1997). Com a progressão da fase G1, ocorre um aumento da expressão das ciclinas E, que se liga à Cdk2 a qual irá fosforilar outros sítios da Rb e da histona H1, auxiliando na condensação da cromatina. Durante a fase S ocorre a degradação da ciclina E, assegurando assim que a origem de replicação não continue ativa. Os níveis de ciclina A aumentam, e esta irá se complexar com a Cdk2 permitindo a replicação do DNA. A ciclina A também é responsável por regular negativamente E2F. Ao final da fase S, forma-se o complexo ciclina A-Cdk1 e há a passagem para a fase G2. As alterações morfológicas necessárias para que a célula passe de G2 à mitose são guiadas pela Cdk1/ciclina A e B. Posteriormente Cdk1 liga-se a ciclina B e direciona a célula através da mitose (Figura 2) (JOHNSON; WALKER, 1999; MALUMBRES; BARBACID, 2005; NIGG, 2001).

O complexo ciclina/Cdk é regulado concomitantemente por outros mecanismos. Um deles trata da ligação de proteínas inibitórias de Cdk, as CKIs. Estas são divididas em duas famílias, a família INK que compreende as proteínas p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> e p19<sup>INK4d</sup> e a família CIP/KIP com as proteínas p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>Kip2</sup>. A família INK se liga exclusivamente as Cdk4 e 6 e impede a associação da ciclina D, já a família CIP/KIP possui ação mais ampla e influencia, de maneira direta ou indireta, os complexos Cdk/ciclinas D, E, A e B (ABBAS; DUTTA, 2009; CAZZALINI, et al., 2010; NICULESCU, et al., 1998; SHERR; ROBERTS, 1999), bloqueando a progressão no ciclo celular (Figura 2). Outro mecanismo envolvido refere-se à fosforilação do resíduo de treonina das CDKs, realizado pela Cdk7/Ciclina H, também chamada de CAK (*CDK-activating kinase*). Esta fosforilação altera a conformação da Cdk e permite a interação com a ciclina. Já outras fosforilações, como da tirosina ou treonina adjacente, mediadas pelas quinases WEE1 e MYT1, irá inativar o complexo. A posterior desfosforilação destes resíduos por fosfatases Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B e Cdc25C) permite a entrada no ciclo celular (MORGAN, 1997). Alterações nestes reguladores, como por exemplo, aumento de expressão das ciclinas, ativação anormal das Cdk (HARTWELL; KASTAN, 1994) ou supressão dos inibidores de Cdk, podem levar a uma

proliferação exacerbada acompanhada de instabilidade genômica e cromossômica e então iniciar um processo tumoral (MALUMBRES; BARBACID, 2001;2005;2009).



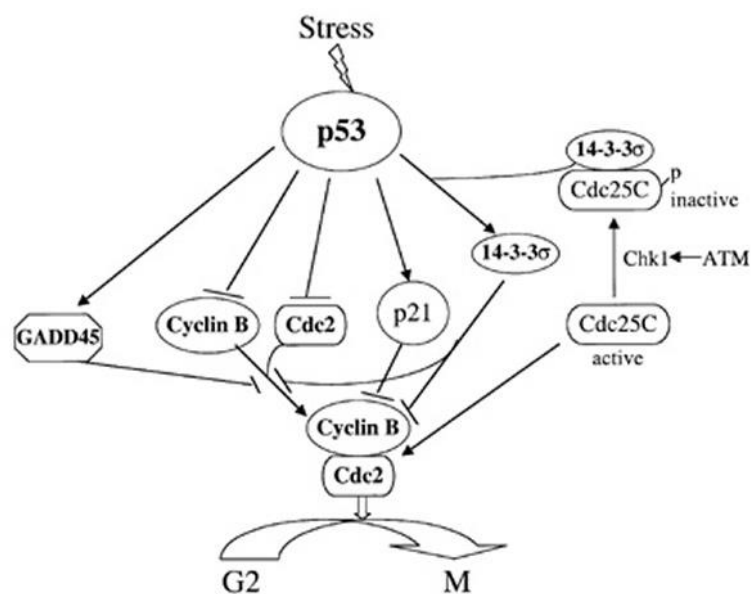
**Figura 2.** Ciclo celular. O ciclo celular tem no centro de sua regulação as CDKs que são ativadas pelas ciclinas ou então inativadas pelos seus inibidores, as CKI. Fosforilações e desfosforilações em sítios específicos também regulam esse complexo. Fonte: SCHWARTZ; SHAH (2005) (com modificações)

Para garantir que a cópia do genoma gerada em S seja segregada igualmente e fielmente às células filhas, as células possuem os pontos de checagens (*checkpoints*), que são sistemas elaborados para reconhecer e reparar os erros ao DNA. Três *checkpoints* são descritos: o *checkpoint* de dano do DNA, que está apto a bloquear o ciclo celular nas fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e mitose (M); o *checkpoint* de replicação do DNA, que monitora a progressão através da fase S; e o *checkpoint* do fuso mitótico, que monitora a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (ELLEDGE, 1996; HARTWELL; WEINERT, 1989). Se erros ou eventos incompletos do ciclo forem detectados, os *checkpoints* serão ativados e sinais serão enviados para que haja parada na mitose até que o problema seja resolvido ou as células serão encaminhadas a morte celular (KASTAN; BARTEK, 2004; MUSACCHIO; SALMON, 2007).

## 2.2 TP53

Um mediador significativo das respostas celulares aos danos no DNA e outros estresses sofrido pela célula, é o gene *TP53*, que codifica para a proteína p53. Este é considerado o guardião do genoma, e seu fator de transcrição controla genes alvos que influenciam em parada de ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e senescência (ERIKSSON; STIGBRAND, 2010).

A ativação de p53 causa parada no crescimento celular tanto na fase G1 como na fase G2 do ciclo celular afim de prevenir, respectivamente, a replicação de DNA danificado e impedir a segregação cromossômica errônea. Na fase G1 do ciclo celular p53 ativa seu gene alvo *CDKN1A* que terá sua proteína bloqueando os complexos Cdk/Ciclina desta fase (Cdk4-6/ciclina D; Cdk2/ciclina A e E) e inibindo diretamente a atividade de CAK. Já na fase G2, p53 causa a parada no ciclo celular por interagir com diversos genes alvos como *CDKN1A*, *GADD45*, *14-3-3 $\sigma$*  além da ação direta com Cdk1 e ciclina B (Figura 3) (SIONOV, 2000; TAYLOR; STARK, 2001).



**Figura 3** Parada em G2/M do ciclo celular induzida por p53 e suas proteínas alvo em resposta a estresse celular. GADD45 bloqueia Cdk1 (cdc2) e não permite a ligação com ciclina B. 14-3-3 $\sigma$  sequestra Cdk1 e Cdc25C para o citoplasma, impedindo assim a ativação na fase G2. p53 ainda pode inibir diretamente Cdk1 e ciclina B. Fonte: SIONOV (2000)

A família de genes *GADD45* (*Growth Arrest DNA- Damage-inducible*) possui 3 conservadas proteínas (*Gadd45 $\alpha$* , *Gadd45 $\beta$*  e *Gadd45 $\gamma$* ) e está envolvida em respostas a estresses genotóxicos. As respostas celulares ao aumento dos níveis desta proteína dependem da interação desta com outras proteínas intracelulares. Entre as possíveis respostas encontram-se: parada de crescimento, reparo do DNA, sobrevivência, senescência, apoptose e modulação da resposta imune (LIEBERMANN; HOFFMAN, 2008; WANG, et al., 1999; YANG, Z.; SONG; HUANG, 2009). As respostas genotóxicas decorrentes podem ser dependentes ou não de p53 (LIEBERMANN, et al., 2011).

## 2.3 Morte Celular

A morte celular desempenha um importante papel na homeostase celular e diversos tipos são conhecidos, tais como apoptose, necrose, autofagia, catástrofe mitótica, senescência entre outros. Abaixo serão brevemente descritas as morte-celulares conhecidas como apoptose, catástrofe mitótica e senescência.

### 2.3.1 Apoptose

A apoptose é um processo ativo que pode ser disparado por processos fisiológicos, patológicos ou citotóxicos. Como característica possui alterações morfológicas marcantes e coordenadas, que incluem exposição do resíduo de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática, encolhimento e perda de contato com as células vizinhas, formação de vacúolos citoplasmáticos, formação de bolhas na membrana plasmática, condensação da cromatina e fragmentação celular em corpúsculos que serão fagocitados pelas células vizinhas (PLENCHETTE, et al., 2004).

A apoptose pode ser ativada por duas vias, a via intrínseca, ou mitocondrial, e a extrínseca, ou de receptores de morte. A primeira é decorrente de fatores intracelulares, como danos ao DNA, privação de fatores de crescimento entre outros; já a segunda ocorre através da ligação de estímulos aos receptores de morte, como Fas e TRAIL, presentes na membrana plasmática da célula e são responsáveis pela transdução do sinal através de seu domínio intracelular (JIN; EL-DEIRY, 2005).

Na via intrínseca, o processo envolve a permeabilização da membrana externa da mitocôndria e é regulado por proteínas da família Bcl-2. Estas proteínas são divididas em duas classes: proteínas anti apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-B) e pró-apoptóticas (Bax, Bak e subfamília domínio BH3- Noxa, Puma, e etc) (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004).

Ambas vias convergem para a ativação de proteases conhecidas como caspases. Estas são sintetizadas como zimogênios, e necessitam ser clivadas para ser ativadas e então induzir a apoptose. De acordo com sua função elas são separadas em dois grupos: caspases iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) e caspases efetoras (caspases-3, -6 e -7) (YAN; SHI, 2005).

Funcionalmente, o balanço e a interação entre fatores inibidores e ativadores da cascata apoptótica determina a ocorrência da morte celular (LEVINE; SINHA; KROEMER, 2008; WILLIS, et al., 2003).

Em respostas a estresses, a proteína p53 desempenha um papel importante na indução de apoptose regulando membros da família Bcl-2 (ERIKSSON; STIGBRAND, 2010). p53 reprime a transcrição do gene *BCL2* e aumenta a expressão de *BAX*, iniciando a apoptose (HEMANN; LOWE, 2006). Aproximadamente 50% de todos os cânceres têm o gene *TP53* mutado, não havendo, então, parada de ciclo e apoptose mediados por este e as células continuam a se proliferar (GREEN; KROEMER, 2009).

### 2.3.2 Catástrofe mitótica

Catástrofe mitótica (MC) é o termo utilizado para a morte celular que ocorre durante ou como resultado de uma mitose errônea (GALLUZZI, et al., 2007). Geralmente é considerada uma consequência de entrada inapropriada ou prematura na mitose, ou erros durante a mesma, e pode ser induzida por estresses químicos ou físicos (VAKIFAHMETOGLU; OLSSON; ZHIVOTOVSKY, 2008). É um tipo demorado de morte, e pode ocorrer dias após a indução da catástrofe, e essa é a causa mais comum de remissão de câncer sólidos após a radioterapia (ERIKSSON; STIGBRAND, 2010). A MC é o tipo de morte preferencial nos cânceres após tratamento com indutores de danos no DNA, uma vez que, normalmente, nesta condição os *checkpoints* possuem defeitos e as vias de apoptose estão suprimidas (VERHEIJ, 2008).

Há controvérsias se a MC é um tipo de morte celular ou é uma mitose anormal com posterior morte celular por apoptose ou necrose. Muitas vezes ela é classificada como um tipo especial de apoptose (VAKIFAHMETOGLU, et al., 2008), pois compartilha algumas características com essa, como ativação de caspases e permeabilização da membrana externa da mitocôndria (CASTEDO, et al., 2004), porém na MC há primeiro a ativação da caspase com a permeabilização da membrana ocorrendo posteriormente. Outros, porém, a tratam como morte celular não apoptótica (VERHEIJ, 2008). As características morfológicas de ambas também as diferem, enquanto na MC há a formação de uma grande célula com pequenos núcleos com cromossomos individuais não condensados (micronúcleos), na apoptose há um encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de bolhas na membrana (VAKIFAHMETOGLU, et al., 2008).

Alguns mecanismos têm sido propostos para que haja catástrofe mitótica. O primeiro, sugere que a MC é decorrente de danos no DNA e *checkpoints* do ciclo celular defeituosos.

Inativação dos *checkpoints* é frequentemente uma consequência de mutação em p53. Células com essas características entram prematuramente na mitose e ficam retidas no *checkpoint* de G2/M. Este por sua vez pode ser regulado por mecanismos dependentes e independentes de p53. Então células que possuam danos passam pelos *checkpoints* de S e G2 e irão ativar o *checkpoint* do fuso e levar a MC. Outro mecanismo proposto é a perturbação da progressão através da mitose, seja na formação do fuso mitótico ou na divisão propriamente dita. Compostos que atuem perturbando as fibras do fuso, podem causar uma segregação cromossômica anormal e gerar células gigantes micronucleadas e multinucleadas seguidas por catástrofe mitótica. O terceiro mecanismo envolvido é o escape da mitose (*mitotic slippage*) sem que haja a citocinese (ERIKSSON; STIGBRAND, 2010; VAKIFAHMETOGLU, et al., 2008).

O mais aceito é que durante a catástrofe mitótica, células com danos no DNA ou alterações nos componentes do fuso mitótico entram em uma parada transiente de G2 mas progridem para uma mitose prematura. O *checkpoint* do fuso é ativado e a progressão através do ciclo é proibida. Este aprisionamento pode ser permanente e fatal, com ativação de vias da apoptose, com ativação de caspase, em destaque a caspase-2, e subsequente dano mitocondrial. No entanto essas células podem não morrer na metáfase por apoptose, escapar do *checkpoint* mitótico (*mitotic slippage*), falhando na citocinese e entrar na próxima fase G1 com conteúdo de DNA tetraploide (WEAVER; CLEVELAND, 2005). Como resultado serão formadas células poliploides gigantes com morfologia nuclear aberrante, múltiplos núcleos e micronúcleos, característicos de células em MC. Estas células podem sobreviver por dias, mas no fim, elas vão morrer por necrose tardia, apoptose tardia, ou serão induzidas a senescência (RIEDER; MAIATO, 2004; VITALE, et al., 2011).

### 2.3.3 Senescência

O termo senescência, também chamada de senescência acelerada ou senescência prematura (KUILMAN, et al., 2010), é definido com um conjunto de mudanças fenotípicas e de metabolização que incluem a parada no ciclo celular, sem a ocorrência de encurtamento dos telômeros (senescência replicativa) (SUZUKI, et al., 2001). As células senescentes são caracterizadas por uma redução na capacidade proliferativa e alterações de adesão, expressão gênica e morfologia, como achatamento e aumento da área citoplasmática e granulosidade, que levam a parada irreversível do crescimento. Estas células, no entanto, continuam metabolicamente ativas (BLAGOSKLONNY, 2007; BLAGOSKLONNY, et al., 2006;

CAMPISI, 1997). É característico de células em senescência um aumento do aparelho de golgi e dos lisossomos, o com aumento da enzima  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal), sendo este o marcador mais bem aceito para caracterização da senescência (CAMPISI, 2013; DEBACQ-CHAINIAUX, et al., 2009; DIMRI, et al., 1995; ERIKSSON; STIGBRAND, 2010; KUILMAN, et al., 2010).

Células em senescência apresentam alterações em seu transcriptoma incluindo genes envolvidos na proliferação celular e fatores de secreção. A Senescência é dependente da ativação de duas vias de supressão tumoral controladas por p53/p21 e p16/pRB. A primeira é uma resposta rápida e responsável por iniciar a parada do ciclo celular; e a segunda é responsável por manter a prisão de crescimento associada a senescência (CAMPISI, 2013). Os fatores de secreção podem atuar tanto como supressores como promotores tumorais. Entre eles estão presentes as citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e proteases que irão ter efeitos de modo autócrino ou parácrino, fortalecendo a parada de crescimento, permitindo a comunicação com células vizinhas e gerando um microambiente (CAMPISI, 2013).

## 2.4 Mitose e Terapia do Câncer

A mitose é um processo altamente regulado que culmina com a montagem do fuso mitótico e segregação cromossômica nas células-filhas. No câncer, este processo encontra-se desregulado e as células se replicam de forma descontrolada resultando na formação de tumores (HARRISON; HOLEN; LIU, 2009).

O *checkpoint* do fuso mitótico (também chamado de SAC – *Spindle Assembly Checkpoint*) é responsável por monitorar, durante a divisão celular, a correta fixação dos cinetócoros dos cromossomos aos microtúbulos, assim como verificar a tensão gerada por estes nas cromátides irmãs e permitir a progressão do ciclo a fim evitar a segregação cromossômica errônea e aneuploidias. Para o bom funcionamento do *checkpoint* mitótico há a necessidade de várias proteínas integrantes agindo conjuntamente, entre elas Mad1, Mad2, Bub1 e Cdc20. O *checkpoint* do fuso inibe a atividade do Complexo Promotor da Anáfase/ciclossomo (APC/C) até todos cromossomos apresentarem correto alinhamento na placa metafásica, com seus cinetócoros tensionados pelas fibras do fuso bipolares e, portanto, com tensão de ligação adequada. Caso essa condição não ocorra, o Complexo Promotor da Anáfase/ciclossomo (APC/C) não é ativado por Cdc20, ciclina B e securina continuam ativas e a prometáfase é mantida até que as condições sejam satisfatórias, e se não ocorrer, estas células podem ser

encaminhadas à morte celular programada (CHAN, et al., 1999; MAIATO; SAMPAIO; SUNKEL, 2004; MUSACCHIO; HARDWICK, 2002; MUSACCHIO; SALMON, 2007).

#### **2.4.1 Limitações a terapias anticâncer**

Alguns quimioterápicos antineoplásicos têm como princípio impedir a divisão celular e podem ser divididos em três categorias de acordo com o mecanismo de interferência. Estes podem interferir na síntese do DNA, induzir dano no DNA ou inibir a função do fuso mitótico (SCHMIDT; BASTIANS, 2007).

A doxorubicina (DOX) é uma droga antitumoral do grupo das antraciclina utilizada no tratamento de câncer de mama e linfomas. A DOX tem como mecanismos de ação a inibição da enzima Topoisomerase II, inibindo dessa forma a transcrição, síntese e replicação do DNA. Ainda, causa estresse oxidativo devido a geração de radicais livres, e acredita-se que esse seja o causador da cardiotoxicidade conhecida (SIMUNEK, et al., 2009).

Dentre os fármacos utilizados para o tratamento do câncer de mama atualmente estão os que têm como alvo os microtúbulos. Os microtúbulos são estruturas dinâmicas formadas de polímeros filamentosos compostos de heterodímeros  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina. Na mitose, através de sua polimerização, eles formam as fibras do fuso que partem dos centrosomos das células em divisão e se ligam aos cinetócoros dos cromossomos condensados. Agentes que perturbam essa dinâmica, como os alcalóides da vinca e a colchicina, que promovem a despolimerização dos microtúbulos, e taxanos e epotilones, que estabilizam os mesmos (JORDAN; WILSON, 2004), implicam na redução da progressão celular, uma vez que as células não conseguem progredir no ciclo e acabam sendo encaminhadas à apoptose.

Porém, os microtúbulos também são essenciais para as células quando estas não estão em divisão celular, visto que participam de ações fisiológicas como transporte intracelular, movimentação de organelas, vesículas, proteínas e neurotransmissores, desenvolvimento e manutenção da forma celular, entre outros (HARRISON, et al., 2009), e ao perturbar a dinâmica dos mesmos, ocasiona-se diversos efeitos adversos, tais como a neurotoxicidade e neutropenia (HUSZAR, et al., 2009; ROWINSKY, et al., 1993; TUXEN; HANSEN, 1994). Outra limitação encontrada por esses quimioterápicos é a resistência que alguns tumores apresentam decorrente de mutações na  $\beta$ -tubulina (MONZO, et al., 1999) ou alterações nas isoformas da mesma (HASEGAWA, et al., 2003).

Apesar do grande avanço obtido no tratamento do câncer com estes agentes, é necessária a obtenção de novas substâncias que possuam diferentes alvos de ação, a fim de reduzir os efeitos colaterais e, assim, otimizar a quimioterapia e a qualidade de vida dos pacientes.

#### **2.4.2 Cinesinas mitóticas – Eg5**

As cinesinas compreendem uma superfamília de proteínas (KIFs), com mais de 650 membros, baseadas em seu domínio motor de microtúbulos. Elas estão presentes em quase todos organismos. Todas elas possuem um característico domínio globular conservado de 360 resíduos de aminoácidos, onde está presente o núcleo catalítico (WOEHLKE, et al., 1997) que corresponde ao sítio para hidrólise de ATP e sítio para ligação dos microtúbulos (AIZAWA, et al., 1992; HIROKAWA, et al., 1989; WORDEMAN, 2012). Para realizar seu papel, as cinesinas motoras transformam a energia química liberada da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) em energia mecânica para mover-se ao longo dos microtúbulos (MIKI; OKADA; HIROKAWA, 2005; VALE; MILLIGAN, 2000; WORDEMAN, 2012). Elas transportam organelas, proteínas e RNAm para seus destinos enquanto realizam a hidrólise do ATP (HIROKAWA, 1998; HIROKAWA; TAKEMURA, 2005). Essas proteínas também participam na mitose com a formação do fuso bipolar, alinhamento e segregação dos cromossomos (ZHU, et al., 2005).

As KIFs foram classificadas em 14 subfamílias de cinesinas (Cinesina-1 a cinesina-14) levando em consideração a filogenia conservada de seu domínio motor, que, então, determina suas funções características (MIKI, et al., 2005). Dentre as cinesinas motoras relacionadas à mitose, a família de Cinesina-5 se destaca, e em especial a proteína Eg5, também conhecida como KSP, hsEg5, Kif11 e cinesina-5. A Eg5 é uma proteína homotetramérica, com duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas entre si. É requerida no início da mitose, mais precisamente na prometáfase, para separação dos centrossomos e, posteriormente, para a separação dos cromossomos (BLANGY, et al., 1995; ENOS; MORRIS, 1990; FERENZ; GABLE; WADSWORTH, 2010).

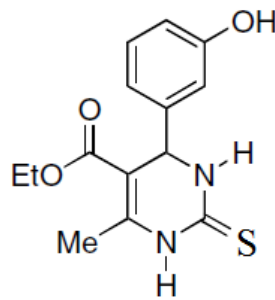
A Eg5 tem sido bastante estudada quanto ao seu potencial para a terapia contra o câncer, isso porque existem relatos de que essa proteína encontra-se superexpressa em tecidos tumorais quando comparadas com tecidos não-tumorais adjacentes, incluindo tumores sólidos de mama, cólon, pulmão, ovário, reto e útero (KOLLER, et al., 2006; LE GUELLEC, et al., 1991; SAKOWICZ, et al., 2004). Carter e colaboradores (2006) relacionam essa superexpressão à alta taxa mitótica observada em células neoplásicas. Portanto, agentes que possuam a Eg5 como

alvo irão inibir apenas aquelas células com maior taxa de proliferação. Outro fato interessante sobre os inibidores de Eg5, é que estes são eficazes em células cancerígenas resistentes aos taxanos (MARCUS, et al., 2005).

A Eg5, assim como as outras cinesinas, possui um domínio motor conservado que catalisa a hidrólise do ATP e gera força mecânica ao longo do microtúbulo (YANG, J. T., et al., 1990). Esta atividade ATPase é essencial para a formação do fuso bipolar na mitose e garante a segregação cromossômica. Quando os microtúbulos antiparalelos se ligam aos domínios motores, há a hidrólise de ATP e é liberada energia suficiente para o deslizamento das fibras em direções as extremidades positivas, impulsionando a separação do centrôssomo (KAPITEIN, et al., 2005). Quando esta proteína é bloqueada não há a formação do fuso bipolar, não há separação dos centrôssomos, não é gerada a tensão necessária nos cinetócoros dos cromossomos condensados e, assim, o *checkpoint* do fuso é ativado (KAPOOR, et al., 2000), há parada de ciclo celular e a célula poderá ser encaminhada à morte.

## 2.5 Monastrol

O Monastrol ( $C_{14}H_{16}N_2O_3S$ ) é uma diidropirimidinona sintética de baixo peso molecular, célula-permeável, de efeito reversível e que interfere na formação do fuso mitótico e na progressão do ciclo celular (Figura 4). Mayer e colaboradores (1999) foram os primeiros a relatar sobre esta molécula. Ao tratar células epiteliais de rins de mamíferos BS-C-1 com este composto, estes autores observaram a parada do ciclo celular em uma configuração de fusos monoastrais rodeados por uma roseta de cromossomos e, assim, denominaram o composto de monastrol. Este composto tem como alvo a cinesina Eg5, proteína motora da família das cinesinas mitóticas, não afetando as células interfásicas e suas funções. O mesmo foi observado por Kapoor e colaboradores (2000). Estes autores observaram que o composto não modifica o número de centrôssomos, mas sim sua separação. O tamanho e organização dos centríolos se mantêm iguais aos de células não tratadas.



**Figura 4** Estrutura química do composto Monastrol Fonte: RUSSOWSKY, et al. (2006)

Estudos posteriores verificaram que o monastrol se liga ao núcleo do domínio motor da cinesina Eg5 e, portanto, não compete com a ligação do ATP e polimerização do microtúbulo na mesma. Ao tratar outros membros da superfamília das cinesinas com monastrol, observaram que apenas a Eg5 humana é inibida. Verificaram também a parada de ciclo em células HeLa tratadas com os enantiômeros S, R e mistura racêmica de Monastrol. O enantiômero S é o mais potente, com IC50 de 25  $\mu\text{M}$ , enquanto que o racemato tem IC50 de 50  $\mu\text{M}$  e o enantiômero R, com IC50 de 100  $\mu\text{M}$  (DEBONIS, et al., 2003; MALIGA; KAPOOR; MITCHISON, 2002).

Em 2006, Maliga e colaboradores demonstraram que o monastrol inibe a atividade motora da cinesina Eg5 através de um mecanismo de inibição alostérica, levando à mudança conformacional que impede a liberação do ADP do complexo ADP-Eg5. Dessa forma, o sítio catalítico da enzima mantém-se ocupado e a hidrólise de uma nova molécula de ATP é impossibilitada (COCHRAN, et al., 2005). Sem a hidrólise de ATP para a geração da energia não há movimentação dos centrossomos em direção aos pólos, o fuso bipolar não é formado e a célula fica retida na fase G2-M do ciclo celular e é encaminhada à morte celular programada.

Estudos *in vitro* mostraram que o monastrol apresenta atividade citostática significativa e atividade citotóxica moderada nas diversas linhagens tumorais testadas: UACC62 - melanoma, MCF-7 - mama, OVCAR03 - ovário, PC0 3- próstata, HT-29 cólon, 786-0 - renal e NCI-ADR - mama expressando fenótipo de resistência a multidrogas. Linhagens celulares de melanomas expostas ao monastrol apresentaram corpos apoptóticos e formação de bolhas características na membrana celular, típicas do processo de apoptose tardia (RUSSOWSKY, et al., 2006).

É relatado que o monastrol leva as células à apoptose através da despolarização da membrana mitocondrial e da ativação das caspases 8 e 3 com variável sensibilidade em diferentes linhagens celulares (LEIZERMAN, et al., 2004). Esses autores verificaram que as

células de carcinoma gástrico (AGS) tratadas com monastrol apresentam despolarização da membrana acompanhada da ativação das caspases 8 e 3 e clivagem de PARP-1. Já em carcinoma de cólon (HT-29), apesar de haver a apoptose este efeito é pouco observado, indicando que outra via de apoptose deve estar ativada.

Chin e Herbst (2006) mostraram que um *checkpoint* funcional é necessário para a parada da mitose induzida pelo monastrol. Na ausência desse *checkpoint*, as células não conseguem desencadear a apoptose dentro da fase mitótica em resposta ao tratamento medicamentoso. No entanto, foi observada a morte celular em tempos posteriores. Estas observações sugerem que a ativação do mecanismo de apoptose não é eliminada na ausência de um *checkpoint* do fuso funcional, mas é apenas retardada. Em células HeLa com *checkpoint* comprometido, o monastrol induziu apoptose após a saída mitótica na fase G1 seguinte, mostrando que a inibição de Eg5 pode levar à ativação de caspases e encaminhar à apoptose na ausência de componentes críticos do *checkpoint*, tais como BubR1 ou Mad2.

No entanto, estudos relatam que há uma variação intralinhagem (células de mesma linhagem possuem destinos diferentes) e interlinhagem (células de diferentes linhagens possuem respostas diferentes quando tratadas com o mesmo composto) quando se trata de inibidores de Eg5. Onze linhagens celulares (OVCAR-5, RPE, HeLa, MDAmb4355, A459, Pc3, MCF-7, H460, U2OS, HCT116 e HT29) com *doubling times* similares apresentam parada mitótica em torno de 24 horas após adição de um inibidor de Eg5, porém a resposta apoptótica variou entre as linhagens e mostrou ter relação com a viabilidade celular. (SHI; ORTH; MITCHISON, 2008). Neste contexto, vários perfis podem ser encontrados: algumas células são encaminhadas a apoptose, durante a mitose ou depois que essa acaba, sendo imediato ou tardio (catástrofe mitótica); outras “escapam” do *checkpoint* do fuso e retornam para a intérfase com característica tetraploide podendo ficar em um estado quiescente (G0), outras em estado senescente e outras ainda entram novamente na mitose fazendo endoreplicação (RIEDER; MAIATO, 2004). A variação intralinhagem não tem relação com a codificação genética, uma vez que células irmãs apresentam destinos diferentes, nem com o tempo de duração da parada na mitose ou com o status do checkpoint, uma vez que tanto células com checkpoint funcional ou ausente, podem ser encaminhadas a apoptose. A resposta final parece ser decorrente do equilíbrio entre a capacidade celular em ativar a maquinaria apoptótica e os níveis de degradação de ciclina B (GASCOIGNE; TAYLOR, 2008; TAO, et al., 2007; TAO, et al., 2005; WEAVER; CLEVELAND, 2005).

Diferentes linhagens de câncer foram expostas ao monastrol e o resultado foi uma grande variabilidade de IC50. A linhagem de mama (MCF-7) apresentou IC50 de 153,9  $\mu\text{M}$ ;

cólon (Colo-205 e HT-29) obtiveram IC50 de 181,3  $\mu\text{M}$  e  $> 684,1 \mu\text{M}$ , respectivamente; pele (A431) 181,3  $\mu\text{M}$  e pulmão (A549) IC50 igual a 403,6  $\mu\text{M}$  (KAMAL, et al., 2011). Isto indica que há diferentes níveis de sensibilidade ao composto de estudo.

Vários estudos vêm sendo realizados para determinar o papel de Eg5 no sistema nervoso, assim como o que sua inibição com o uso de monastrol poderia vir a ocasionar. Estudo utilizando células do sistema nervoso verificaram que a Eg5 também se expressa em cérebros em desenvolvimento e neurônios terminalmente diferenciados (FALNIKAR; TOLE; BAAS, 2011; FERHAT, et al., 1998; LIN, et al., 2011; SAKOWICZ, et al., 2004), o que poderia então gerar neuropatias quando utilizar-se do monastrol. No entanto os dados observados sugerem que o monastrol não causa a neurotoxicidade conhecida pelos outros quimioterápicos já em uso, pelo contrário ele parece exercer papel benéfico nos neurônios injuriados (HAQUE, et al., 2004; LIN, et al., 2011). Outro trabalho encontrou que em neurônios maduros o monastrol pode levar a pequenos efeitos deletérios, porém, estes são bem mais leves e lentos que aqueles causados pelos quimioterápicos convencionais (YOON, et al., 2005).

Nos últimos anos o monastrol vem sendo utilizado para um novo fim, o de atividade antileishmania. Macrófagos infectados com as formas amastigotas de *Leishmania donovani*, quando tratadas com monastrol, apresentam inibição de proliferação e parada de crescimento em G0/G1 do ciclo celular, sem levar a apoptose. O monastrol não teve efeito sob os macrófagos, uma vez que o IC50 para formas amastigotas é de 10  $\mu\text{M}$  e para os macrófagos de 85  $\mu\text{M}$  (KAUR, et al., 2013; KAUR; SUNDAR; SINGH, 2010).

Assim, drogas que possuem as cinesinas mitóticas Eg5 como alvos têm se mostrado de grande valia para pesquisas de tratamento de doenças, como o câncer. Dessa maneira, estudos que esclareçam os mecanismos de ação do monastrol em linhagens tumorais e não tumorais são de grande interesse.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do monastrol sobre a viabilidade celular, cinética de proliferação, indução de apoptose e alteração na dinâmica do ciclo celular em linhagens celulares de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e não tumoral de epitélio de mama (HB4a) a fim de verificar se há efeito seletivo deste composto.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico do monastrol por ensaio de MTT em tempos de 24 e 48 horas;
- Verificar o efeito do monastrol por 96 horas na cinética de proliferação celular em tempo real pelo sistema xCELLigence;
- Verificar a capacidade de indução de apoptose por citometria de fluxo (anexinaV) e análise morfológica por Hoechst 33342 em 24 horas de tratamento;
- Avaliar a influência do monastrol em alterar a dinâmica do ciclo celular por marcação com Iodeto de Propídeo em citometria de fluxo e análise morfológica por Hoechst 33342 em 24 e 48 horas de tratamento;
- Identificar transcritos dos genes relacionados ao ciclo celular (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCND*, *CCNE1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDC25A* e *CDC25C*, *EG5* e *TP53*), indução de danos ao DNA (*GADD45A*) e a apoptose (*BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* e *BAK*) que estejam diferencialmente expressos após tratamento com o monastrol.

## Referências

- ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400-14, 2009.
- AIZAWA, H. et al. Kinesin family in murine central nervous system. **J Cell Biol**, v. 119, n. 5, p. 1287-96, 1992.
- BLAGOSKLONNY, M. V. Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. **Cell Cycle**, v. 6, n. 1, p. 70-4, 2007.
- BLAGOSKLONNY, M. V. et al. Cytostatic activity of paclitaxel in coronary artery smooth muscle cells is mediated through transient mitotic arrest followed by permanent post-mitotic arrest: comparison with cancer cells. **Cell Cycle**, v. 5, n. 14, p. 1574-9, 2006.
- BLANGY, A. et al. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1159-69, 1995.
- CAMPISI, J. The biology of replicative senescence. **Eur J Cancer**, v. 33, n. 5, p. 703-9, 1997.
- CAMPISI, J. Aging, cellular senescence, and cancer. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 685-705, 2013.
- CARTER, B. Z. et al. Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: overcoming imatinib resistance. **Cell Cycle**, v. 5, n. 19, p. 2223-9, 2006.
- CASTEDO, M. et al. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. **Oncogene**, v. 23, n. 25, p. 4362-70, 2004.
- CAZZALINI, O. et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. **Mutat Res**, v. 704, n. 1-3, p. 12-20, 2010.
- CHAN, G. K. et al. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. **J Cell Biol**, v. 146, n. 5, p. 941-54, 1999.
- CHIN, G. M.; HERBST, R. Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 10, p. 2580-91, 2006.

COBRINIK, D. Pocket proteins and cell cycle control. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2796-809, 2005.

COCHRAN, J. C. et al. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **J Biol Chem**, v. 280, n. 13, p. 12658-67, 2005.

DEBACQ-CHAINIAUX, F. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nat Protoc**, v. 4, n. 12, p. 1798-806, 2009.

DEBONIS, S. et al. Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 338-49, 2003.

DIMRI, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 20, p. 9363-7, 1995.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, n. 5293, p. 1664-72, 1996.

ENOS, A. P.; MORRIS, N. R. Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. **Cell**, v. 60, n. 6, p. 1019-27, 1990.

ERIKSSON, D.; STIGBRAND, T. Radiation-induced cell death mechanisms. **Tumour Biol**, v. 31, n. 4, p. 363-72, 2010.

FALNIKAR, A.; TOLE, S.; BAAS, P. W. Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. **Mol Biol Cell**, v. 22, n. 9, p. 1561-74, 2011.

FERENZ, N. P.; GABLE, A.; WADSWORTH, P. Mitotic functions of kinesin-5. **Semin Cell Dev Biol**, v. 21, n. 3, p. 255-9, 2010.

FERHAT, L. et al. Expression of the mitotic motor protein Eg5 in postmitotic neurons: implications for neuronal development. **J Neurosci**, v. 18, n. 19, p. 7822-35, 1998.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 7, p. 1237-43, 2007.

GASCOIGNE, K. E.; TAYLOR, S. S. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 111-22, 2008.

GIT, A. et al. PMC42, a breast progenitor cancer cell line, has normal-like mRNA and microRNA transcriptomes. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 3, p. R54, 2008.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1127-30, 2009.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, 2011.

HAQUE, S. A. et al. Monastrol, a prototype anti-cancer drug that inhibits a mitotic kinesin, induces rapid bursts of axonal outgrowth from cultured postmitotic neurons. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 58, n. 1, p. 10-6, 2004.

HARRISON, M. R.; HOLEN, K. D.; LIU, G. Beyond taxanes: a review of novel agents that target mitotic tubulin and microtubules, kinases, and kinesins. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 7, n. 1, p. 54-64, 2009.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell-Cycle Control and Cancer. **Science**, v. 266, n. 5192, p. 1821-1828, 1994.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-34, 1989.

HASEGAWA, S. et al. Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 8, p. 2992-7, 2003.

HEMANN, M. T.; LOWE, S. W. The p53-Bcl-2 connection. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 8, p. 1256-9, 2006.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 519-26, 1998.

HIROKAWA, N. et al. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 867-78, 1989.

HIROKAWA, N.; TAKEMURA, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 3, p. 201-14, 2005.

HUSZAR, D. et al. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 197-208, 2009.

INCA, I. N. D. C. J. A. G. D. S. **Estimativa 2014: Incidência do Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. 2014

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther**, v. 4, n. 2, p. 139-63, 2005.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 295-312, 1999.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253-65, 2004.

KAMAL, A. et al. Synthesis and biological evaluation of conformationally flexible as well as restricted dimers of monastrol and related dihydropyrimidones. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 8, p. 3274-81, 2011.

KAPITEIN, L. C. et al. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. **Nature**, v. 435, n. 7038, p. 114-8, 2005.

KAPOOR, T. M. et al. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. **J Cell Biol**, v. 150, n. 5, p. 975-88, 2000.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316-23, 2004.

KAUR, J. et al. A member of the Ras oncogene family, RAPIA, mediates antileishmanial activity of monastrol. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 5, p. 1071-80, 2013.

KAUR, J.; SUNDAR, S.; SINGH, N. Molecular docking, structure-activity relationship and biological evaluation of the anticancer drug monastrol as a pteridine reductase inhibitor in a clinical isolate of *Leishmania donovani*. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1742-8, 2010.

KOLLER, E. et al. Use of a chemically modified antisense oligonucleotide library to identify and validate Eg5 (kinesin-like 1) as a target for antineoplastic drug development. **Cancer Res**, v. 66, n. 4, p. 2059-66, 2006.

KUILMAN, T. et al. The essence of senescence. **Genes Dev**, v. 24, n. 22, p. 2463-79, 2010.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocr Relat Cancer**, v. 13, n. 2, p. 293-325, 2006.

LE GUELLEC, R. et al. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 6, p. 3395-8, 1991.

LEIZERMAN, I. et al. Differential effects of monastrol in two human cell lines. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 16, p. 2060-70, 2004.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Res**, v. 57, n. 15, p. 3071-8, 1997.

LEVINE, B.; SINHA, S.; KROEMER, G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 600-6, 2008.

LIEBERMANN, D. A.; HOFFMAN, B. Gadd45 in stress signaling. **J Mol Signal**, v. 3, p. 15, 2008.

LIEBERMANN, D. A. et al. Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. **Crit Rev Oncog**, v. 16, n. 1-2, p. 129-40, 2011.

LIN, S. et al. Inhibition of Kinesin-5, a microtubule-based motor protein, as a strategy for enhancing regeneration of adult axons. **Traffic**, v. 12, n. 3, p. 269-86, 2011.

MAIATO, H.; SAMPAIO, P.; SUNKEL, C. E. Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. **Int Rev Cytol**, v. 241, p. 53-153, 2004.

MALIGA, Z.; KAPOOR, T. M.; MITCHISON, T. J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Chem Biol**, v. 9, n. 9, p. 989-96, 2002.

MALIGA, Z.; MITCHISON, T. J. Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol. **BMC Chem Biol**, v. 6, p. 2, 2006.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 1, n. 3, p. 222-31, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 11, p. 630-41, 2005.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-66, 2009.

MARCUS, A. I. et al. Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 12, p. 11569-77, 2005.

MAYER, T. U. et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971-4, 1999.

MIKI, H.; OKADA, Y.; HIROKAWA, N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 9, p. 467-76, 2005.

MONZO, M. et al. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 6, p. 1786-93, 1999.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 13, p. 261-91, 1997.

MUSACCHIO, A.; HARDWICK, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 10, p. 731-41, 2002.

MUSACCHIO, A.; SALMON, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 5, p. 379-93, 2007.

NICULESCU, A. B., 3RD et al. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 1, p. 629-43, 1998.

NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 83-94, 2004.

PLANAS-SILVA, M. D.; WEINBERG, R. A. The restriction point and control of cell proliferation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 768-72, 1997.

PLENCHETTE, S. et al. Analyzing markers of apoptosis in vitro. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 313-31, 2004.

RIEDER, C. L.; MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Dev Cell**, v. 7, n. 5, p. 637-51, 2004.

ROWINSKY, E. K. et al. Neurotoxicity of Taxol. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 15, p. 107-15, 1993.

RUSSOWSKY, D. et al. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. **Bioorg Chem**, v. 34, n. 4, p. 173-82, 2006.

SAKOWICZ, R. et al. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 3276-80, 2004.

SCHMIDT, M.; BASTIANS, H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. **Drug Resist Updat**, v. 10, n. 4-5, p. 162-81, 2007.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 36, p. 9408-21, 2005.

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

SHI, J.; ORTH, J. D.; MITCHISON, T. Cell type variation in responses to antimitotic drugs that target microtubules and kinesin-5. **Cancer Res**, v. 68, n. 9, p. 3269-76, 2008.

SIMUNEK, T. et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 154-71, 2009.

SIONOV, R. V. H., I.L.; HAUPT, Y. **The Regulation of p53 Growth Suppression**. Madame Curie Bioscience Database [Internet]: Landes Bioscience, Austin (TX) 2000.

SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 51, n. 5, p. 1409-16, 1973.

STAMPS, A. C. et al. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int J Cancer**, v. 57, n. 6, p. 865-74, 1994.

SUZUKI, K. et al. Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. **Radiat Res**, v. 155, n. 1 Pt 2, p. 248-253, 2001.

TAO, W. et al. An inhibitor of the kinesin spindle protein activates the intrinsic apoptotic pathway independently of p53 and de novo protein synthesis. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 2, p. 689-98, 2007.

TAO, W. et al. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. **Cancer Cell**, v. 8, n. 1, p. 49-59, 2005.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803-15, 2001.

TUXEN, M. K.; HANSEN, S. W. Neurotoxicity secondary to antineoplastic drugs. **Cancer Treat Rev**, v. 20, n. 2, p. 191-214, 1994.

VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 7, p. 1153-62, 2008.

VALE, R. D.; MILLIGAN, R. A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 88-95, 2000.

VERHEIJ, M. Clinical biomarkers and imaging for radiotherapy-induced cell death. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, n. 3, p. 471-80, 2008.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, v. 36, n. 3, p. 131-49, 2003.

VITALE, I. et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 385-92, 2011.

WANG, X. W. et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 3706-11, 1999.

WEAVER, B. A.; CLEVELAND, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 2005.

WILLIS, S. et al. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 20, p. 4053-6, 2003.

WOEHLKE, G. et al. Microtubule interaction site of the kinesin motor. **Cell**, v. 90, n. 2, p. 207-16, 1997.

WORDEMAN, L. The Kinesin Superfamily. In: KAVALLARIS, M. (Ed.). **Cytoskeleton and Human Disease**, 2012.

YAN, N.; SHI, Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 35-56, 2005.

YANG, J. T. et al. Evidence that the head of kinesin is sufficient for force generation and motility in vitro. **Science**, v. 249, n. 4964, p. 42-7, 1990.

YANG, Z.; SONG, L.; HUANG, C. Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 8, p. 915-30, 2009.

YOON, S. Y. et al. Monastrol, a selective inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, induces a distinctive growth profile of dendrites and axons in primary cortical neuron cultures. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 60, n. 4, p. 181-90, 2005.

ZHU, C. et al. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 7, p. 3187-99, 2005.

## 4 Artigo

**Monastrol causa parada diferencial do ciclo celular nas linhagens HB4a e MCF-7 sem induzir apoptose**

**Artigo a ser submetido ao periódico *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***

**Monastrol causa parada diferencial do ciclo celular nas linhagens HB4a e MCF-7 sem induzir apoptose**

Marques, LA<sup>1</sup>; Semprebon, SC<sup>1</sup>; Niwa, AM<sup>1</sup>; D'Epiro GFR<sup>1</sup>; Sartori D<sup>1</sup>; Fátima, Angelo<sup>2</sup>; Mantovani, MS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

Lilian Areal Marques

Laboratório de Genética Toxicológica

Departamento de Biologia Geral – CCB

Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

P.O. Box 10.011, Londrina, Paraná, Brasil.

CEP: 86.057-970

e-mail: lilian.areal.marques@gmail.com

Phone: 55 43 3371-4977

## RESUMO

A maioria das drogas antineoplásicas não apresentam seletividade e, portanto, afetam tanto as células tumorais quanto as saudáveis. Este trabalho investigou o efeito antiproliferativo do monastrol em células humanas de adenocarcinoma mamário (MCF-7, linhagem tumoral) e epitelial mamário (HB4a, linhagem não tumoral). No ensaio de citotoxicidade (MTT), o monastrol reduziu a viabilidade celular em relação ao controle a partir da concentração de 50  $\mu$ M apenas na linhagem tumoral MCF-7. Na avaliação da cinética em *Real-time Cell Analyzer* também houve queda na proliferação de MCF-7, enquanto que na HB4a não houve alteração. O monastrol não foi capaz de induzir morte celular por apoptose em nenhuma das linhagens estudadas. Já na análise do ciclo celular, a exposição das células MCF-7 ao monastrol (50  $\mu$ M) levou ao aumento da população G1 e G2/M, com diminuição de S. Na linhagem HB4a houve aumento de G2/M e diminuição de G1. Monastrol levou ao aumento do índice mitótico em ambas linhagens. A análise da expressão gênica (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDC25A*, *CDC25C*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *TP53*, *EG5*, *GADD45A*, *BAX*, *BAK*, *BCL2* e *BCL-XL*) por RT-qPCR demonstrou que o monastrol aumentou em 5 vezes os níveis de RNAm do gene *CDKN1A* nas células MCF-7 e reduziu em 2 vezes os níveis de RNAm de *CDKN1C* na linhagem HB4a. Portanto, o monastrol induz parada de ciclo celular nas células MCF-7 sem acarretar em morte celular por apoptose. Estes efeitos também foram observados na linhagem HB4a, porém de forma mais branda. Estes resultados sugerem que o monastrol possui maior citotoxicidade sobre as células tumorais MCF-7, quando comparados com as células não tumorais HB4a, tornando-o um possível quimioterápico anticâncer.

Palavras chave: Monastrol; MCF-7; HB4a; Ciclo celular

## 1 Introdução

O câncer é uma doença genética resultante do acúmulo de mutações que levam a uma série de alterações celulares entre elas a manutenção da sinalização de proliferação, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e invasão de tecidos vizinhos [1]. Nas últimas décadas o câncer se tornou um problema de saúde mundial, sendo câncer de mama, exceto o de pele não melanoma, o mais comum entre as mulheres e o que gera maior mortalidade nesse grupo.

Por muitos anos tem se utilizado drogas antimitóticas para quimioterapia anticâncer que possuem como alvo os microtúbulos. Estes são estruturas dinâmicas formadas de polímeros filamentosos compostos de heterodímeros  $\alpha$ -tubulina e  $\beta$ -tubulina que através da sua polimerização formam as fibras do fuso. Agentes que os possuem como alvo, como os alcalóides da vinca, taxanos e epotilones, implicam na redução da progressão celular e apoptose [2]. Porém, os microtúbulos também são essenciais para as células interfásicas, visto que participam de ações fisiológicas como transporte de organelas, vesículas, proteínas e neurotransmissores, além de auxiliar na manutenção da morfologia celular, entre outros [3]. Compostos que interferem na dinâmica dos microtúbulos ocasionam diversos efeitos adversos, tais como a neutropenia e neurotoxicidade [4-6]. Apesar do grande avanço obtido no tratamento do câncer com estes agentes, é necessária a obtenção de novas substâncias que possuam diferentes alvos de ação a fim de reduzir os efeitos colaterais e, assim, otimizar a quimioterapia e a qualidade de vida dos pacientes.

O monastrol é uma diidropirimidinona sintética de baixo peso molecular, célula-permeável, e estudos demonstram a potencialidade dessa molécula em interferir na formação do fuso mitótico e na progressão do ciclo celular [7, 8]. O monastrol foi relatado como inibidor alostérico da cinesina mitótica Eg5[9, 10], proteína esta requerida no início da mitose para separação dos centrossomos e formação do fuso mitótico bipolar [11-13]. Estudos relatam que essa proteína se encontra superexpressa em tecidos tumorais quando comparadas com tecidos não-tumorais adjacentes, incluindo tumores sólidos de mama, cólon, pulmão, ovário, reto e útero [14-16]. Carter e colaboradores [17] relacionam essa superexpressão à alta taxa mitótica observada em células neoplásicas.

Estudos demonstram que o monastrol não causa neurotoxicidade conhecida pelos outros quimioterápicos em uso, pelo contrário parece exercer papel benéfico nos neurônios injuriados [18, 19]. Outro estudo encontrou que em neurônios maduros o monastrol pode levar a pequenos

efeitos deletérios, porém, estes são bem mais leves e lentos que aqueles causados pelos quimioterápicos convencionais [20].

O mecanismo molecular e o papel do monastrol comparando células tumorais e não tumorais necessita de maiores esclarecimentos, portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do monastrol em linhagens de mama de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e não tumoral de epitélio de mama (HB4a), assim como verificar a possibilidade de seletividade contra células tumorais, buscando a comparação da atividade citotóxica e a capacidade desta molécula em interferir no ciclo celular e induzir morte celular nas linhagens celulares utilizadas.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Cultura celular

Para este trabalho foram utilizadas as linhagens celulares de adenocarcinoma mamário MCF-7 e a linhagem não tumoral de mama HB4a, ambas livres de micoplasma. A linhagem tumoral MCF-7 foi obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro e a linhagem HB4a foi gentilmente doada pela Professora Silvia R. Rogatto do Hospital do Câncer A. C. Camargo (São Paulo, SP). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco) e 1% penicilina/estreptomicina (Gibco), a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa. A linhagem HB4a foi suplementada com insulina (Gibco) e hidrocortisona (Pharma Nostra), ambas em concentração final de 5 µg/mL. Nestas condições o ciclo celular para ambas as linhagens é de aproximadamente 24 horas.

### 2.2 Agentes químicos

O monastrol foi sintetizado de acordo com procedimento desenvolvido por Russowsky et al. [21] e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ângelo de Fátima da Universidade Federal de Minas Gerais. Para sua diluição utilizou-se o solvente dimetilsulfóxido (DMSO - Acros Organics), e durante os ensaios sua porcentagem não ultrapassou 0,5% em cultura.

Para o ensaio de citotoxicidade (MTT) e ensaio de proliferação celular em tempo real (RTCA) foi utilizado como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina (Adriblastina<sup>®</sup>) na concentração de 1 µM, diluído em meio de cultura. Para os ensaios de indução de apoptose por citometria de fluxo e avaliação de apoptose *in situ* foi utilizada a camptotecina (Acros

Organics) 3  $\mu\text{M}$ . Na análise de ciclo celular por citometria de fluxo, e índice mitótico foi utilizada a Solução de demecolcina (Sigma-Aldrich) 26,9 nM.

### 2.3 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) descrito por Mosmann [22], com algumas modificações. As células foram semeadas ( $5 \times 10^3$  células/poço) em placa de cultura de 96 poços e deixadas por 24 horas para estabilização. Após esse período, as células foram tratadas com o monastrol por 24 e 48 h. Após o término de cada período, o composto foi removido e adicionou-se a solução de MTT (0,5mg/mL) e as placas foram incubadas por 4 h. Após decorrido o tempo, a solução de MTT foi removida, os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e as placas lidas em espectrofotômetro (TP Reader, Thermo Plate) a 540 nm. Os tratamentos com o monastrol foram realizados nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ .

O ensaio foi realizado em três experimentos independentes em triplicatas. A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada pela fórmula ( $\text{Absorbância tratado} - \text{Absorbância branco} / \text{Absorbância Controle} - \text{Absorbância Branco}$ )  $\times 100$ . Como controle positivo foi utilizado a Doxorrubicina.

### 2.4 Análise da proliferação celular em tempo real pelo sistema xCELLigence

O sistema xCELLigence de análise celular em tempo-real (RTCA) (Roche Applied Science, Alemanha) foi utilizado para monitorar a dinâmica da proliferação celular. O sistema permite, sem utilizar marcação, monitorar em tempo real a dinâmica dos eventos celulares em intervalos definidos utilizando a impedância como medida. As medições de impedância elétrica são realizadas através de microeletrodos de ouro na parte inferior das E-placas e são mostradas através do valor de índice celular (IC) gerada pelo *software*. O IC fornece informação quantitativa sobre o status biológico da célula como, por exemplo, número, viabilidade e morfologia celular. Assim, uma mudança no estado celular, como a morfologia celular, a adesão celular ou a viabilidade celular pode conduzir a uma mudança na IC, e portanto quanto maior o número e tamanho das células, maior será a impedância. A cinética de viabilidade celular fornece informação temporal de quando a droga de interesse induz seu efeito e permite escolher com mais precisão o tempo de tratamento para os demais testes de ponto final [23, 24].

O experimento foi delineado e realizado em três repetições. Foi adicionado 50 µL de meio de cultura (10% FBS) aos poços da E-placa de 96 poços para leitura de *background*. Então as células foram semeadas a sua concentração ótima obtida pelo experimento da titulação (6250 células/poço na linhagem MCF-7 e 3125 células/poço nas células HB4a). Aguardou-se 30 minutos para sedimentação celular e a placa foi acondicionada na estação interna a estufa. Após 24 horas de estabilização as células receberam os tratamentos (5, 25, 50, 75 e 100 µM de monastrol e 1 µM de doxorubicina) e ficaram expostas a estes por até 96 horas. A impedância foi monitorada a cada 30 minutos.

### 2.5 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

A distribuição do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo a partir da marcação do núcleo celular com iodeto de propídeo (PI). Foram semeadas  $1,25 \times 10^5$  células/poço em microplacas de 6 poços. Após a estabilização das células (24h), foram feitos os tratamentos: controle, camptotecina (3 µM) e demecolcine (26,9 nM) e monastrol nas concentrações de 25 e 50 µM. Ao final dos tratamentos (24 e 48h) as células foram desprendidas da placa utilizando Accutase (StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent, Life technologies), centrifugadas (2.000 rpm por 5 min) e ressuspensas em PBS gelado. As amostras foram tratadas com RNase (Life technologies) (0,1 mg/mL) por 30 min a 37°C, em seguida, receberam a solução hipotônica do fluorocromo (HFS) (50µg/mL iodeto de propídeo, 0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100). As amostras permaneceram no gelo e protegidas da luz por 30 min [25]. Após este período, a porcentagem de células em G0/G1, S e G2/M foram estimadas pela fluorescência do iodeto de propídeo por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen™). Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e foram realizados três experimentos independentes.

### 2.6 Análise de indução de apoptose por citometria de fluxo (anexinaV)

A análise de apoptose foi realizada utilizando o Kit *Annexin V-PE Apoptosis Detection* (BD Pharmingen) e o Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* (BD Pharmingen), no citômetro Accuri C6 (BD Pharmingen™). Para a linhagem HB4a foi utilizado a metodologia de anexina-V conjugada com o fluorocromo FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) e o Iodeto de propídeo (PI) como marcador de permeabilidade celular. E para as células MCF-7 foi utilizada a anexina-V conjugada com o fluorocromo PE (*Phycoerythrin*) e o 7 aminoactinomicina D (7-AAD) como corante de permeabilização.

Para esta análise  $1,25 \times 10^5$  células HB4a e MCF-7/poço foram semeadas em microplacas de 6 poços. Após 24h de estabilização, foram realizados os tratamentos: controle, camptotecina ( $3 \mu\text{M}$ ) e monastrol em concentração de 25 e  $50 \mu\text{M}$  por 24 horas. Ao final do tratamento, o meio foi removido, as células lavadas com PBS gelado e soltas por solução enzimática Accutase (StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent, Life technologies). A suspensão celular foi centrifugada (1000 rpm, 5 min) e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em tampão do próprio fabricante e marcadas com os fluorocromos Anexina-V-FITC e o iodeto de propídeo (BD Pharmingen™ 1:100)/ anexina-V - PE e 7-*aminoactinomycin D* (7-AAD) (BD Pharmingen™ 1:100) à temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Dez mil eventos foram analisados citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Pharmingen™) utilizando o BD Accuri C6 software. Os experimentos foram realizados em três repetição biológica.

As células negativas para ambos fluorocromos foram classificadas como “vivas”; as coradas somente com a anexina V como “apoptose inicial”; aquelas coradas com ambos fluorocromos (anexina V e PI/7-AAD) assim como aquelas que apenas se corarem com PI/7-AAD serão classificadas como “apoptose tardia/necrose”.

### 2.7 Avaliação da indução de apoptose *in situ* e Índice mitótico

A fim de verificar o índice mitótico e avaliação de apoptose *in situ* foi feita análise morfológica das células após coloração com o fluorocromo Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Em placa de 6 poços, foram semeadas  $1,25 \times 10^5$  células MCF-7 e HB4a e incubadas por 24 horas para estabilização. Após este período, as células foram tratadas com de monastrol (25 e  $50 \mu\text{M}$ ), camptotecina ( $3 \mu\text{M}$ ) e demecolcine (26,9 nM) e incubadas por 24 e 48 horas. Ao final de cada tempo de tratamento, foram expostas ao Hoechst 33342 ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  no escuro. Para visualização e análise foi utilizado o microscópio invertido de fluorescência FLoid® Cell Imaging Station (Life technologies) em aumento de 460X (filtro azul, 390/40 nm excitação e 446/33 nm de emissão). Foram consideradas células viáveis aquelas com núcleos ovais e com fluorescência baixa e apoptóticas com condensação da cromatina e presença de corpos apoptóticos com alta fluorescência [26, 27]. Além disso, foram consideradas células na fase-M (de prófase a telófase) [28]. Foram analisadas 500 células por tratamento e os valores expressos como porcentagem do número total de células analisadas. Foram realizadas três repetições biológicas.

## 2.8 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Em placas de cultura de 6 poços, foram semeadas  $1,25 \times 10^5$  células MCF-7 e HB4a/poço e incubadas para estabilização por 24 horas. Para este ensaio foi escolhido apenas a concentração de 50  $\mu$ M de monastrol por 24 horas de tratamento para ambas as células. O RNA total foi isolado através do mini kit RNeasy (Qiagen), de acordo com recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose (1%), a concentração e a pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) foram verificadas no Nanodrop® 2000 (ThermoScientific).

Para a síntese do cDNA utilizou-se 40 unidades de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e 500 ng de RNA total, com o primer oligo(dT), de acordo com o protocolo da enzima.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas através do sistema de detecção em tempo real CFX96 TOUCH™ (Biorad). A detecção da amplificação foi avaliada através da fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green (SsoAdvanced™ SYBR Green supermix - - BIORAD) ao se ligar à dupla fita de DNA. As condições da PCR foram as seguintes: 50°C por 2 minutos; 95°C por 2 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 15 segundos; 72°C por 30 segundos; A análise da curva de *melting* foi realizada no final da reação pelo aumento da temperatura de 55°C a 95°C em intervalos de 0.5°C a cada 5 segundos. Os dados foram normalizados utilizando o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (*GAPDH*). Foram analisados os níveis de expressão de RNAm dos genes envolvidos no ciclo celular: ciclinas A2(*CCNA2*), ciclina B1 (*CCNB1*), ciclina D1 (*CCND1*) e ciclina E1 (*CCNE1*); dos inibidores de CDK p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>Kip2</sup> codificados pelos genes *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, respectivamente; e das fosfatases Cdc25a e Cdc25c codificada pelo gene *CDC25A* e *CDC25C*, respectivamente. Além disso analisou-se os níveis de RNAm do supressor tumoral *TP53* e do gene da cinesina alvo do monastrol (*EG5*). *GADD45A*, gene sinalizador de danos ao DNA, pró apoptóticos (*BAK* e *BAX*) e antiapoptóticos (*BCL-2* e *BCL-XL*) também tiveram seus níveis investigados.

O ensaio foi realizado em três repetições biológicas com duplicata. As sequências dos *primers* podem ser observadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Relação de *primers* utilizados na análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
<i>CCNA2 - F</i>	5' GAC CCT GCA TTT GGC TGT G 3'	[29]
<i>CCNA2 - R</i>	5' ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG 3'	
<i>CCNB1 - F</i>	5' AGA GCA TCT AAG ATT GGA GAG 3'	Sigma*
<i>CCNB1 - R</i>	5' CCA TGT CAT AGT CCA ACA TAG 3'	
<i>CCND1 - F</i>	5' GCC TCT AAG ATG AAG GAG AC 3'	Sigma*
<i>CCND1 - R</i>	5' CCA TTT GCA GCA GCT C 3'	
<i>CCNE1 - F</i>	5' GAC TTA CAT GAA GTG CTA CTG 3'	Sigma*
<i>CCNE1 - R</i>	5' GAC GAG AAA TGA TAC AAG GC 3'	
<i>CDKN1A - F</i>	5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 3'	Sigma*
<i>CDKN1A - R</i>	5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'	
<i>CDKN1B - F</i>	5' AAC CGA CGA TTC TTC TAC TC 3'	Sigma*
<i>CDKN1B - R</i>	5' TGT TTA CGT TTG ACG TCT TC 3'	
<i>CDKN1C - F</i>	5' CAA GTC TGT TAA AAT GGT TCC 3'	Sigma*
<i>CDKN1C - R</i>	5' TTT TTG CAG CAT TTT TCG G 3'	
<i>CDC25A - F</i>	5' CCT CAA ATG AAA GAG ATA GCA G	Sigma*
<i>CDC25A - R</i>	5' TTC TTC AGA TTC TCT CCA TCG 3'	
<i>CDC25C - F</i>	5' CTA ATG AAA TGT AGC CCA GC 3'	Sigma*
<i>CDC25C - R</i>	5' CAT TGC ATC TCT CTT TCT ATG G 3'	
<i>TP53 - F</i>	5' TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT 3'	[30]
<i>TP53 - R</i>	5' GAC AGG CAC AAA CAC GCA C 3'	
<i>EG5 - F</i>	5' CAG GTG GTG GTG AGA TGC 3'	**presente estudo
<i>EG5 - R</i>	5' TGG ACA AAC AAC ACT TCG GT 3'	
<i>GADD45A - F</i>	5' TCA GCG CAC GAT CAC TGT C 3'	**presente estudo
<i>GADD45A - R</i>	5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'	
<i>BAX - F</i>	5' TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT GGG 3'	[31]
<i>BAX - R</i>	5' TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT 3'	
<i>BAK - F</i>	5' CAA GAT TGC CAC CAG CCT GTT TGA 3'	**presente estudo
<i>BAK - R</i>	5' ATG CAG TGA TGC AGC ATG AAG TCG 3'	
<i>BCL2 - F</i>	5' GAT TGT GGC CTT CTT TGA G 3'	Sigma*
<i>BCL2 - R</i>	5' GTT CCA CAA AGG CAT CC 3'	
<i>BCLXL - F</i>	5' TGG GCT CAC TCT TCA GTC GGA AAT 3'	[32]
<i>BCLXL - R</i>	5' ATG TAG TGG TTC TCC TGG TGG CAA 3'	
<i>GAPDH - F</i>	5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3'	[33] com modificações
<i>GAPDH - R</i>	5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'	

\*Primers obtidos da Sigma-Aldrich (KiCqStart® SYBR® Green Primers - Predesigned primers for gene expression analysis - <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/>).

\*\*Sequências dos primers construídos para o presente estudo através do programa disponível no site do fornecedor ([www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/)).

## 2.9 Análise estatística

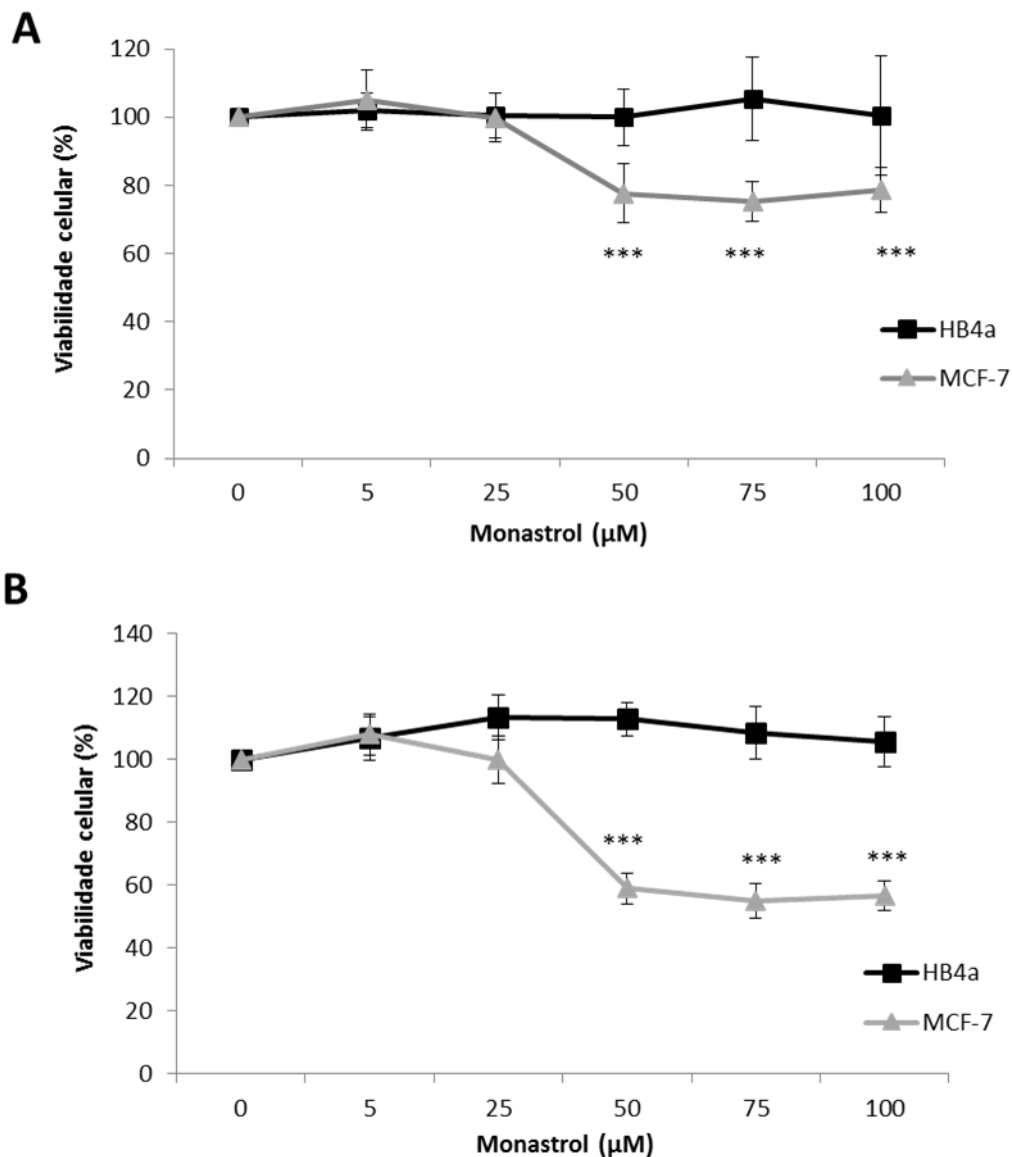
Os dados obtidos na avaliação da citotoxicidade, avaliação da indução de apoptose *in situ*, índice mitótico, análises de apoptose e ciclo celular por citometria de fluxo foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett, com  $\alpha = 0,05$  (GraphPad Prism<sup>®</sup>5 software).

A análise da expressão gênica determinada pela qRT-PCR foi feita pelo método de quantificação relativa, utilizando o *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como gene normalizador. Foi utilizado o software REST<sup>®</sup> (*Relative Expression Software Tool* [34]) e assumido significativos apenas os valores estatisticamente diferentes pelo REST e que tivessem sua expressão aumentada ou diminuída a partir de duas vezes.

## 3 Resultados

### 3.1 Monastrol induz citotoxicidade na linhagem MCF-7

Os efeitos citotóxicos do monastrol nas células HB4a e MCF-7 foram determinados pelo ensaio de citotoxicidade (MTT) nas concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  por 24 e 48 horas. Apenas a linhagem de adenocarcinoma mamário (MCF-7) apresentou citotoxicidade quando exposta ao monastrol. As células MCF-7 tiveram sua viabilidade reduzida significativamente em torno de 25% quando tratadas com monastrol por 24 horas nas concentrações de 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  (viabilidade celular (%) de  $74,5 \pm 8,8$ ;  $76,5 \pm 6$ ; e  $77,8 \pm 9,7$ , respectivamente) (Figura 1A). Já em 48 horas de exposição, a viabilidade celular foi reduzida significativamente em torno de 40% nas mesmas concentrações alteradas no período anterior (viabilidade celular (%) de  $60,3 \pm 5,1$ ;  $55,3 \pm 5,5$ ; e  $57,3 \pm 4,2$ , respectivamente) (Figura 1B). A linhagem HB4a não apresentou citotoxicidade significativa em nenhuma das concentrações testadas (Figura 1).

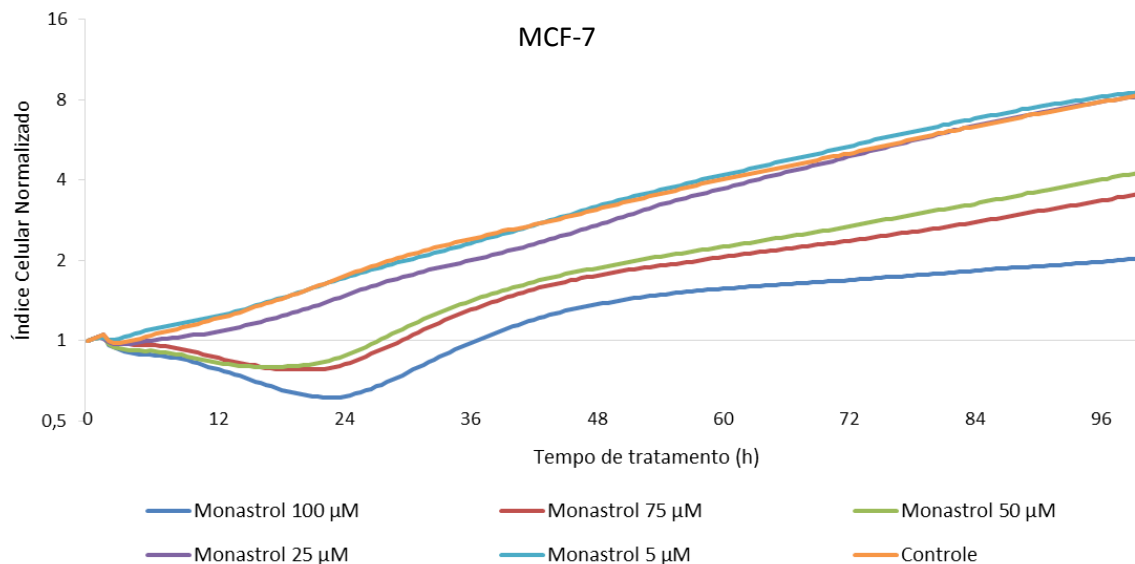


**Figura 1** Citotoxicidade nas células MCF-7 e HB4a após exposição ao monastrol. Valores de absorbância obtidos pelo ensaio de MTT a partir do tratamento de células MCF-7 e HB4a com monastrol 0 (controle), 5, 25, 50, 75 e 100 μM por 24 (A) e 48 horas (B). Os pontos representam valores médios de absorbância  $\pm$  desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*\*\*) $p < 0,001$ .

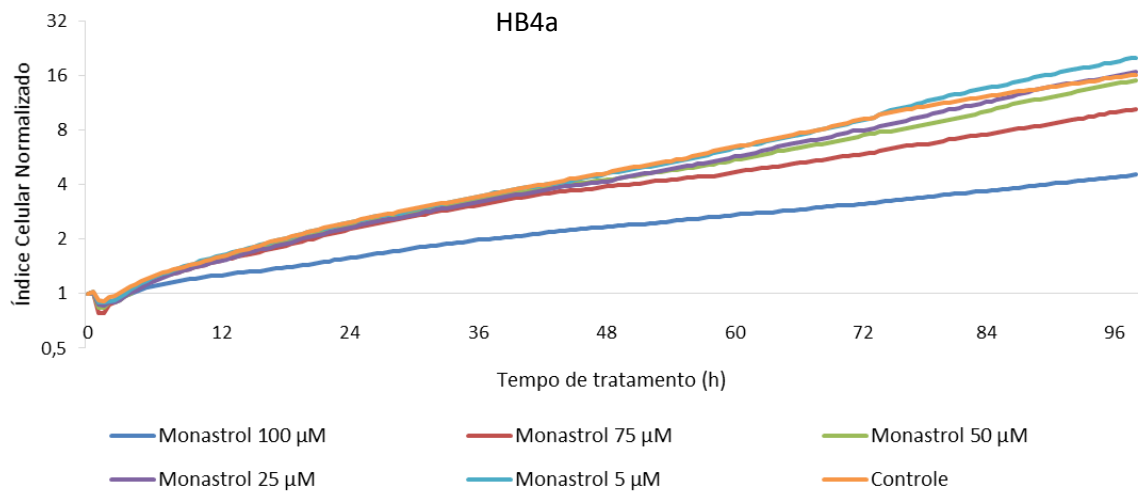
### 3.2 MCF-7 e HB4a apresentam padrões distintos de resposta na análise da cinética celular em tempo real (RTCA)

Na busca de um padrão da cinética de proliferação celular destas linhagens por longos períodos, de modo contínuo, quando expostas ao monastrol foi feito o ensaio *Xcelligence-RTCA*. Ao analisar o comportamento das linhagens testadas no ensaio do RTCA frente ao

tratamento com monastrol observaram-se dois padrões distintos. A curva de índice celular obtida da linhagem MCF-7 quando expostas ao monastrol nas concentrações mais elevadas (50 a 100  $\mu\text{M}$ ) apresentaram uma queda inicial no IC após o tratamento, com máximo declínio em torno de 24 horas com posterior recuperação durante o tempo subsequente com reestabelecimento da cinética de proliferação quando expostas ao monastrol (50 e 75  $\mu\text{M}$ ), apesar de não retornarem ao IC do controle. Células MCF-7 expostas a 100  $\mu\text{M}$  não voltaram a ter um crescimento exponencial como nas demais concentrações (Figura 2). Na linhagem HB4a apenas a concentração mais elevada de monastrol (100  $\mu\text{M}$ ) apresentou uma queda linear no IC constante durante o tempo de tratamento (Figura 3). Após 48 horas de exposição ao monastrol 75  $\mu\text{M}$  os valores de IC destas células iniciaram o afastamento do IC do controle.



**Figura 2.** Cinética de crescimento celular em tempo real das células MCF-7. Curvas de índice celular da linhagem MCF-7 obtidas pelo sistema xCELLigence-RTCA mostrando a cinética de crescimento celular após exposição ao tratamento com monastrol. O Índice celular (IC) foi mensurado a cada 30 min e os pontos representam valores médios de absorbância obtidos em triplicatas.



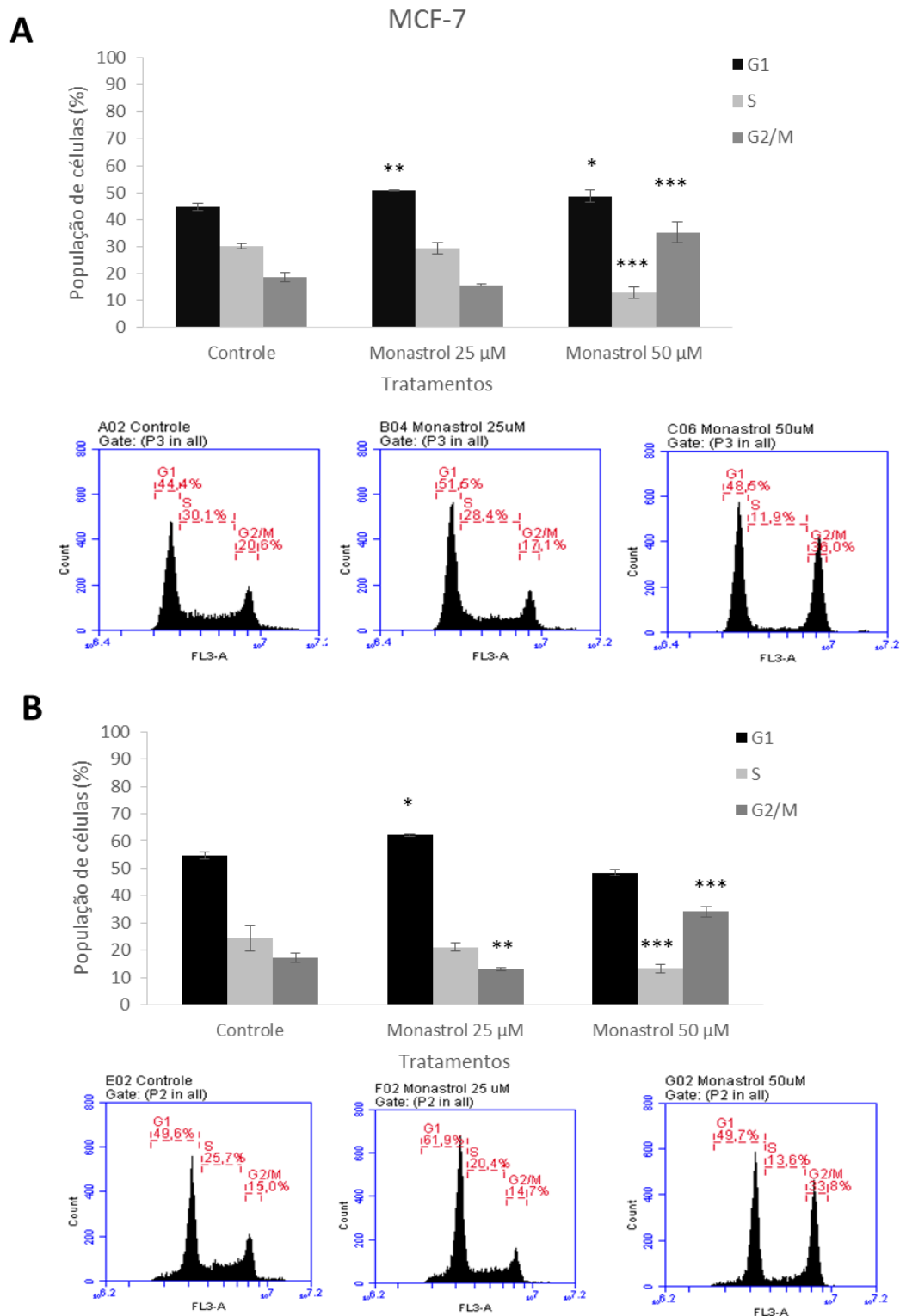
**Figura 3.** Cinética de crescimento celular em tempo real das células HB4a. Curvas de índice celular da linhagem HB4a obtidas pelo sistema xCELLigence-RTCA mostrando a cinética de crescimento celular após exposição ao tratamento com monastrol. O Índice celular (IC) foi mensurado a cada 30 minutos e os pontos representam valores médios de absorbância obtidos em triplicatas.

Então, a partir destes resultados foram selecionadas as concentrações de 25 e 50 µM de monastrol para os demais testes.

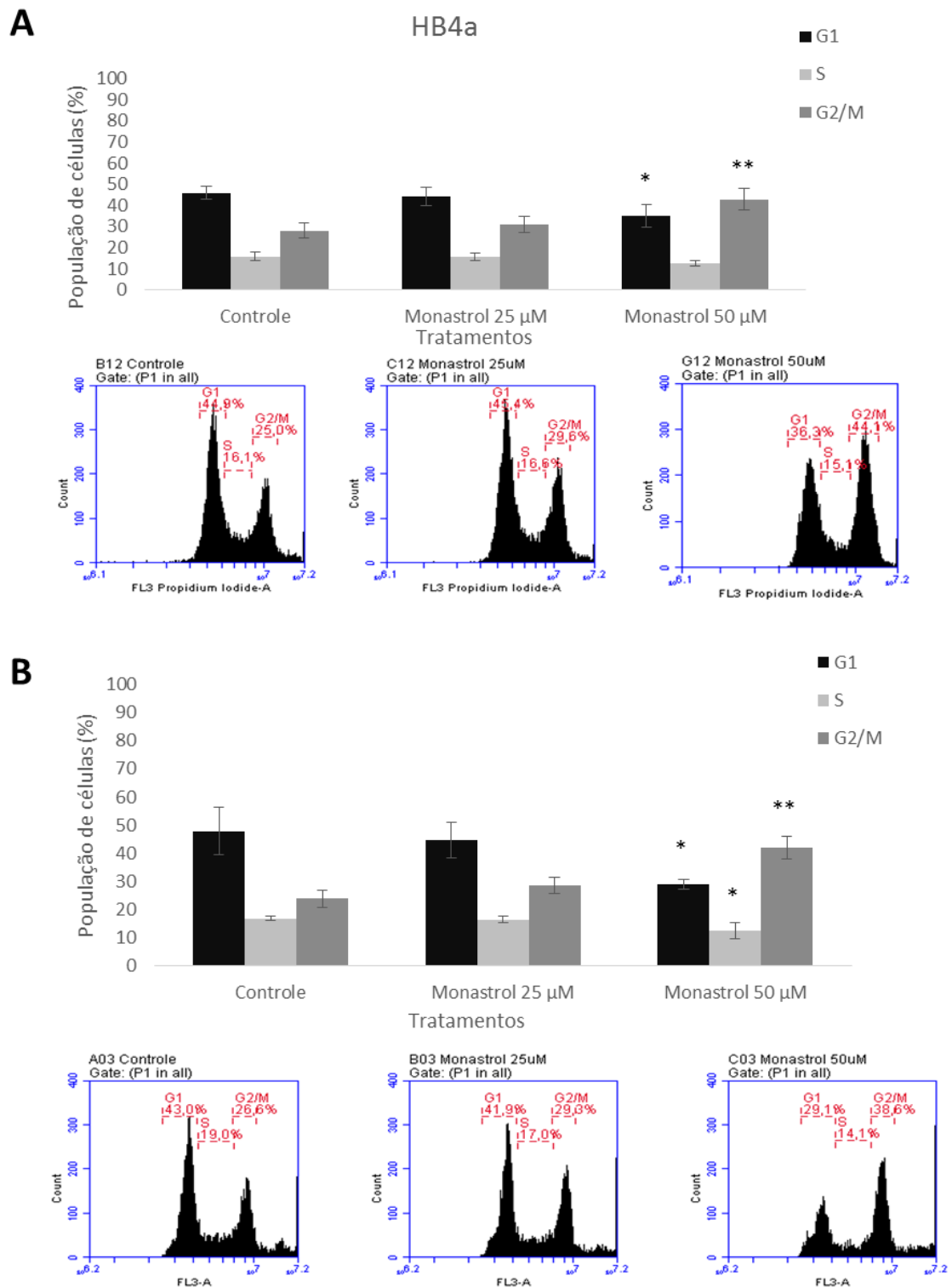
### 3.3 Monastrol causa parada no ciclo celular e aumento do índice mitótico

Os resultados obtidos na análise do ciclo celular por marcação com iodeto de propídeo indicam que a linhagem MCF-7 na concentração de 50 µM de monastrol apresentou diferenças mais bruscas na distribuição das fases em ambos tempos de exposição. Em 24 horas, houve, de forma significativa, um discreto aumento da frequência (%) de células na fase G1 ( $48,7 \pm 2,4$ ), acentuada queda da frequência da fase S ( $13,0 \pm 2$ ) seguido de acentuado aumento na fase G2/M ( $35,2 \pm 3,8$ ); no controle os valores encontrados foram de  $44,7 \pm 1,4$ ,  $30,3 \pm 1,4$  e  $18,7 \pm 1,8$ , respectivamente. Células expostas a 25 µM de monastrol apresentaram significativo aumento apenas na fase G1 do ciclo ( $50,8 \pm 0,3$ ) (Figura 4A). Em 48 horas de exposição ao monastrol a população celular apresentou similar padrão de comportamento, com diminuição significativa da população de células em S ( $13,5 \pm 1,9$ ) e aumento significativo em G2/M ( $34,2 \pm 1,3$ ) quando tratadas com 50 µM de monastrol e comparadas com o controle (G1  $54,7,5 \pm 4,71$ ; S  $24,3 \pm 1,8$  e G2/M  $17,2 \pm 0,8$ ). Em 25 µM do monastrol, houve aumento significativo da fase G1 ( $62,07 \pm 1,6$ ) e diminuição significativo de G2/M ( $13,2 \pm 0,8$ ) (Figura 4B).

Já na linhagem HB4a em 24 horas, apenas na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , houve aumento significativo da população G2/M ( $28,1 \pm 3,7$  no controle para  $42,7 \pm 5,1$  no tratado) e queda significativa na frequência de G1 (no controle  $45,8 \pm 3$  para  $35,2 \pm 5,3$ ) (Figura 5A). Em 48 horas de exposição todas fases do ciclo foram alteradas significativamente quando expostas apenas a monastrol 50  $\mu\text{M}$  (G1  $28,9 \pm 1,8$ ; S  $12,4 \pm 2,9$ ; G2/M  $41,9 \pm 4$ ) (Controle:  $47,8 \pm 8,5$ ;  $16,8 \pm 0,8$ ;  $23,8 \pm 3,1$ , respectivamente) (Figura 5B).

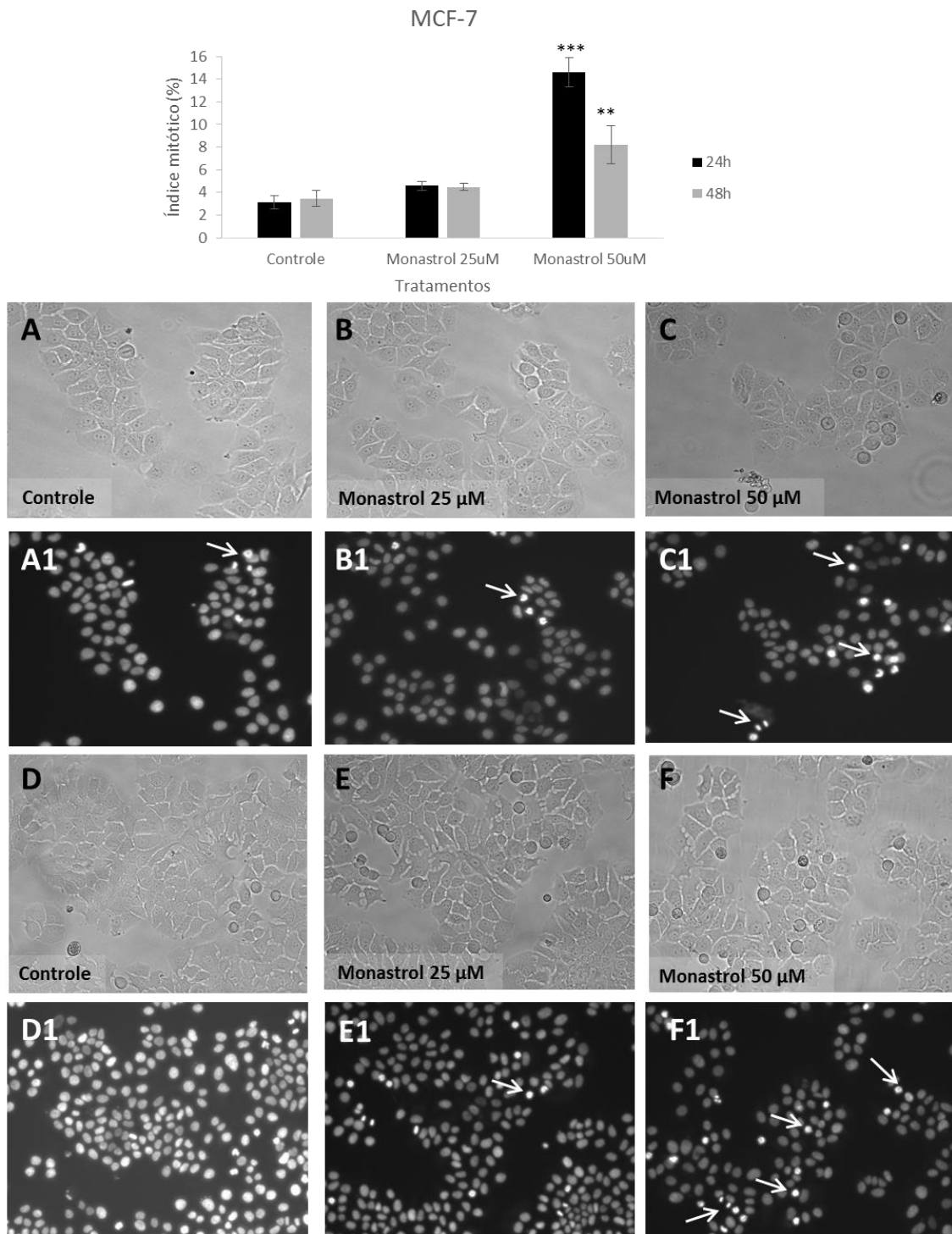


**Figura 4** Análise da distribuição do ciclo celular das células MCF-7 por citometria de fluxo (PI). **A)** Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50 µM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 24 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. **B)** Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50 µM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 48 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\* p<0,05); (\*\*p<0,01); (\*\*\*) p<0,001) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett.

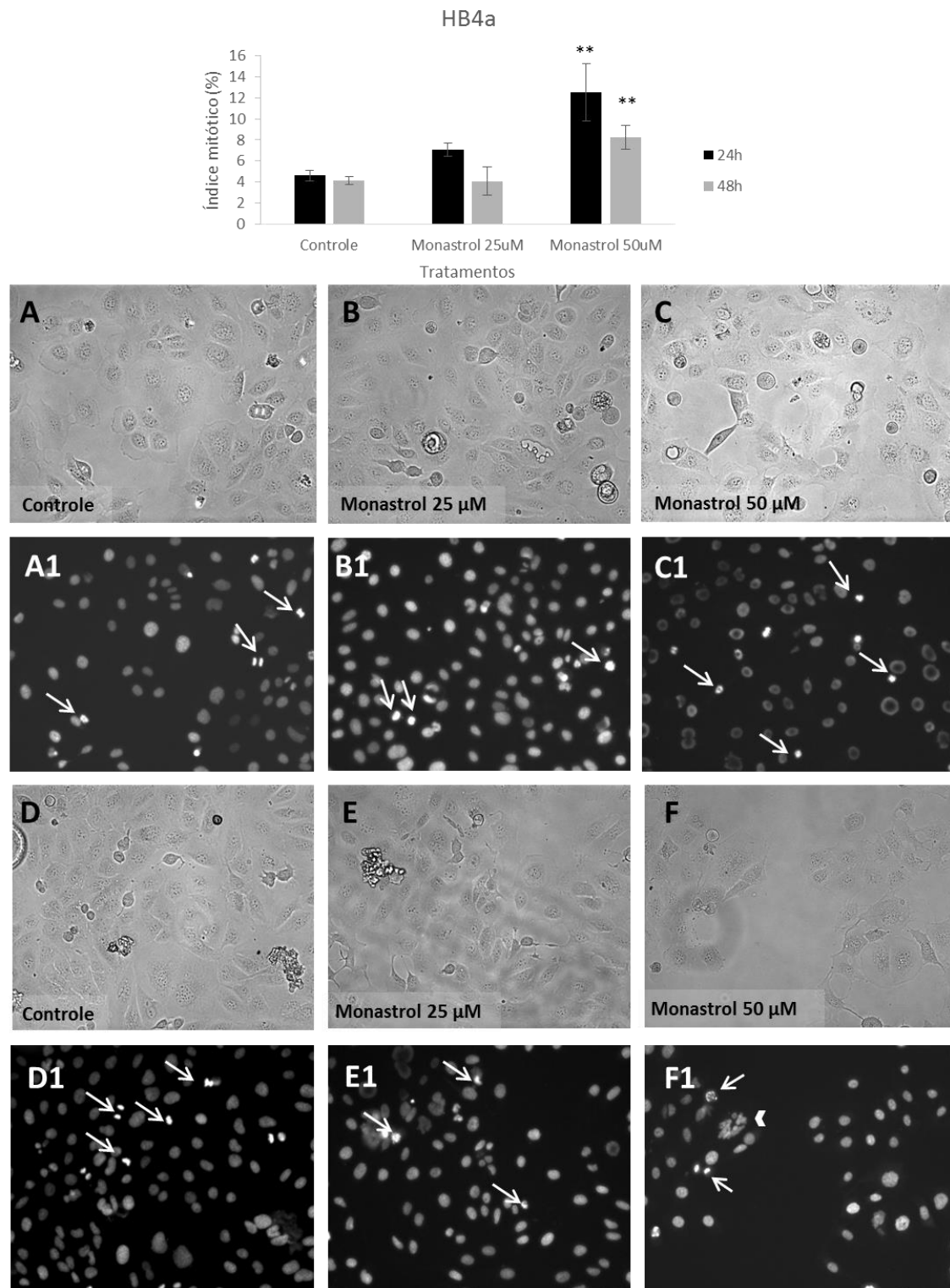


**Figura 5** Análise da distribuição do ciclo celular das células HB4a por citometria de fluxo (PI). **A**) Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50 µM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 24 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. **B**) Efeitos dos tratamentos com monastrol 25 e 50 µM na distribuição do ciclo celular (G1, S, G2/M) após 48 horas de tratamento e histogramas obtidos pelo software Accuri C6. Os dados são apresentados como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\* p<0,05); (\*\*p<0,01); (\*\*\*) p<0,001) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett.

A fim de distinguir as células que estavam na fase G2 daquelas que estavam na fase M do ciclo celular e confirmar a interrupção do ciclo na fase mitótica, foi realizado a análise do índice mitótico através de coloração com Hoechst 33342. Aquelas células com formato arredondado e com seu material genético fortemente corado, devido à condensação da cromatina, foram consideradas como células na fase M (prófase-telófase). Células MCF-7 apresentaram aumento significativo do índice mitótico de 4,7 e 2,4 vezes em relação ao controle quando expostas a 50  $\mu$ M de monastrol em 24 e 48 horas, respectivamente. (Figura 6). As células HB4a tratadas com a mesma concentração do composto apresentaram um aumento significativo de 2,7 e 2 vezes em relação ao controle em 24 e 48 horas de exposição, respectivamente. Na linhagem HB4a foram encontradas, principalmente após 48 horas de tratamento, células multinucleadas e presença de micronúcleos (Figura 7-F1). Em baixa concentração de monastrol (25  $\mu$ M) não foram encontradas alterações significativas em relação ao controle para ambas as linhagens celulares testadas (Figura 6 e 7).



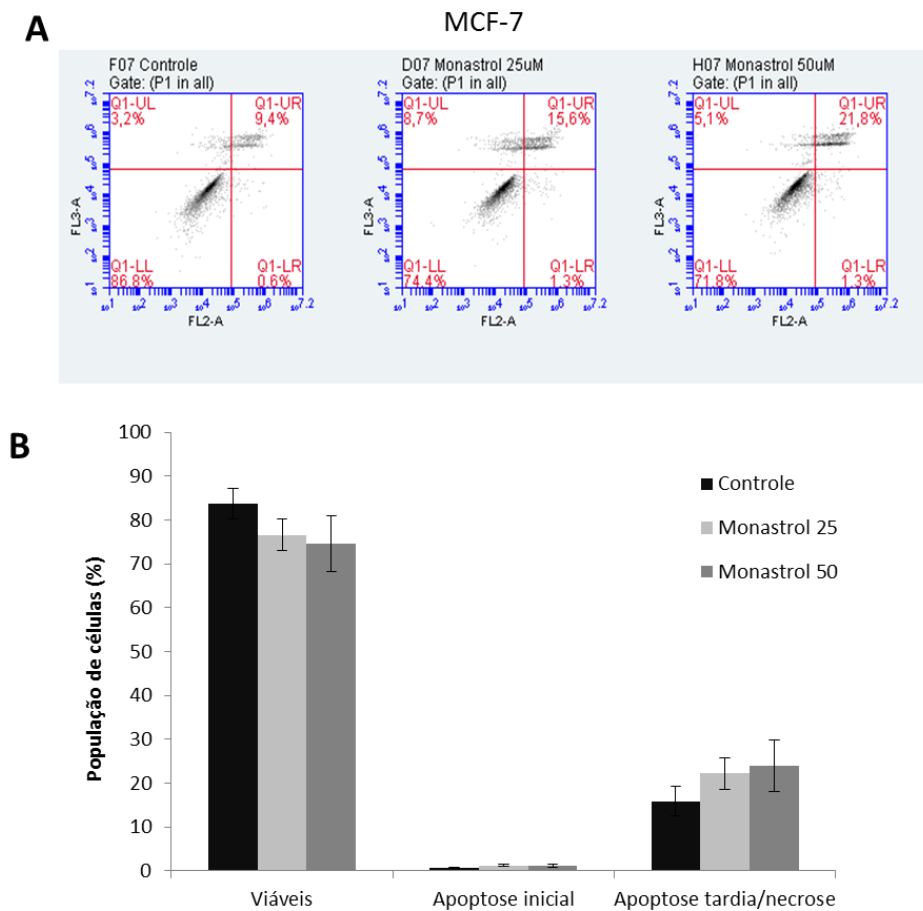
**Figura 6.** Monastrol leva ao aumento do índice mitótico de células MCF-7. Aspecto morfológico e índice mitótico por coloração com Hoechst 33342 das células MCF-7 tratadas por 24 e 48 horas com monastrol. Acima: valores médios do índice mitótico obtido em célula MCF-7 tratadas com monastrol. **A- C** Células expostas por 24 horas ao monastrol 25 (B e B1) e 50 µM (C-C1). **D – E** Células expostas por 48 horas ao monastrol 25 (E e E1) e 50 µM (F e F1). Controle: (A e D). As setas indicam células em divisão. Luz normal: A- F. Fluorescência: A1-F1. Aumento real de 460x. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*\* $p < 0,01$ ); (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett.



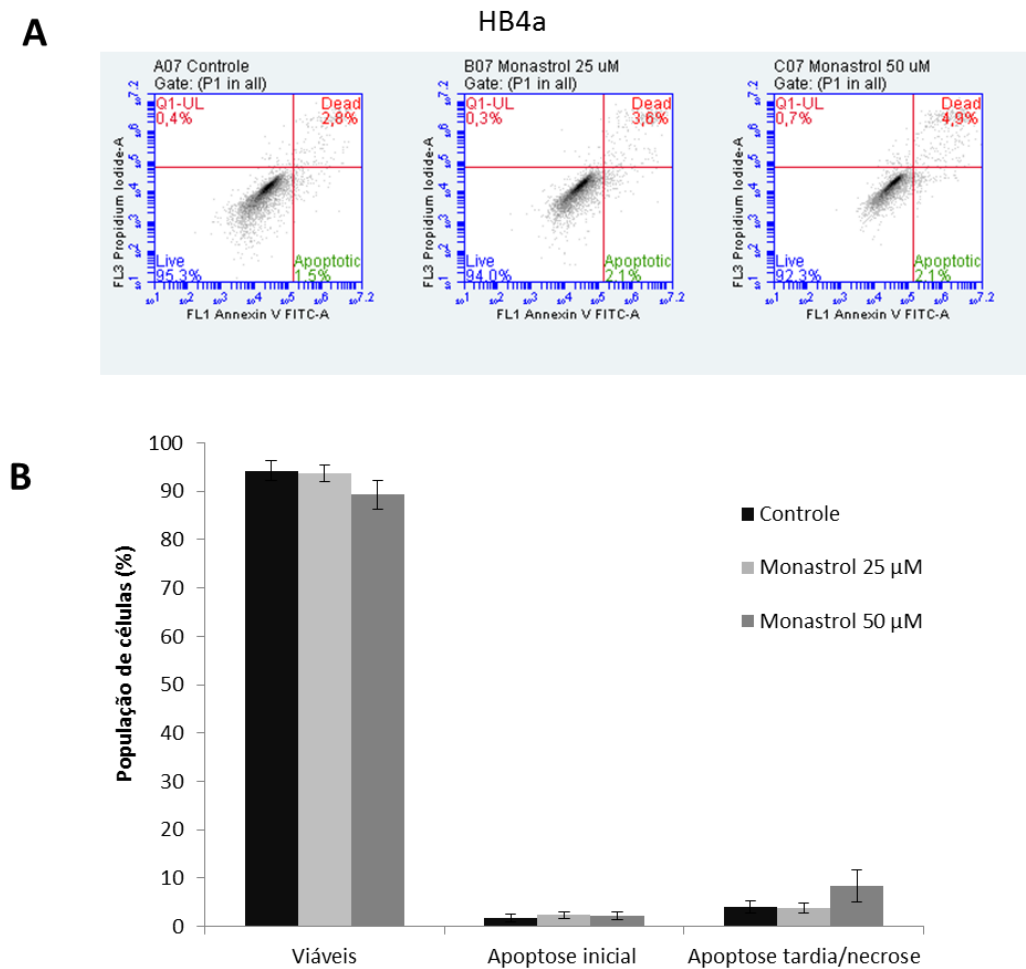
**Figura 5.** Monastrol leva ao aumento do índice mitótico de células HB4a. Aspecto morfológico e índice mitótico por coloração com Hoechst 33342 das células HB4a tratadas por 24 e 48 horas com monastrol. Acima: valores médios do índice mitótico obtido em células HB4a tratadas com monastrol. **A- C)** Células expostas por 24 horas ao monastrol 25 (B e B1) e 50  $\mu$ M (C-C1). **D – E)** Células expostas por 48 horas ao monastrol 25 (E e E1) e 50  $\mu$ M (F e F1). Controle: (A e D). As setas indicam células em divisão. Cabeça de seta: Célula multinucleada. Luz normal: A- F. Fluorescência: A1-F1. Aumento real de 460x. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística: (\*\* $p < 0,01$ ); (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle por ANOVA seguida de Dunnett.

### 3.4 Monastrol não induz apoptose após aprisionamento no ciclo celular

A fim de investigar o mecanismo que leva à redução da viabilidade celular e alterações na cinética de crescimento celular, foi realizada a análise da indução de apoptose. Na análise por anexina V em citômetro de fluxo não se observou apoptose em nenhuma das linhagens e condições testadas (Figuras 8 e 9). Na análise morfológica por Hoechst 33342, assim como da população subG1 do ciclo celular, expostas ao monastrol por até 48 horas também não apresentaram aumento de células apoptóticas.



**Figura 8.** Células MCF-7 não são encaminhadas a apoptose. Células MCF-7 expostas a 25 e 50  $\mu$ M de monastrol por 24 horas, coradas com anexina-V/PE e 7AAD para obtenção da porcentagem de células apoptóticas por citometria de fluxo. **A)** Quantificação de células viáveis (AV-/7AAD -), em apoptose inicial (AV+/7AAD -) e em apoptose tardia/necrose (AV+/7AAD + e AV-/7AAD +) após 24 horas de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu$ M. **B)** População de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu$ M. Os dados representam valores médios de três experimentos independentes  $p < 0.05$

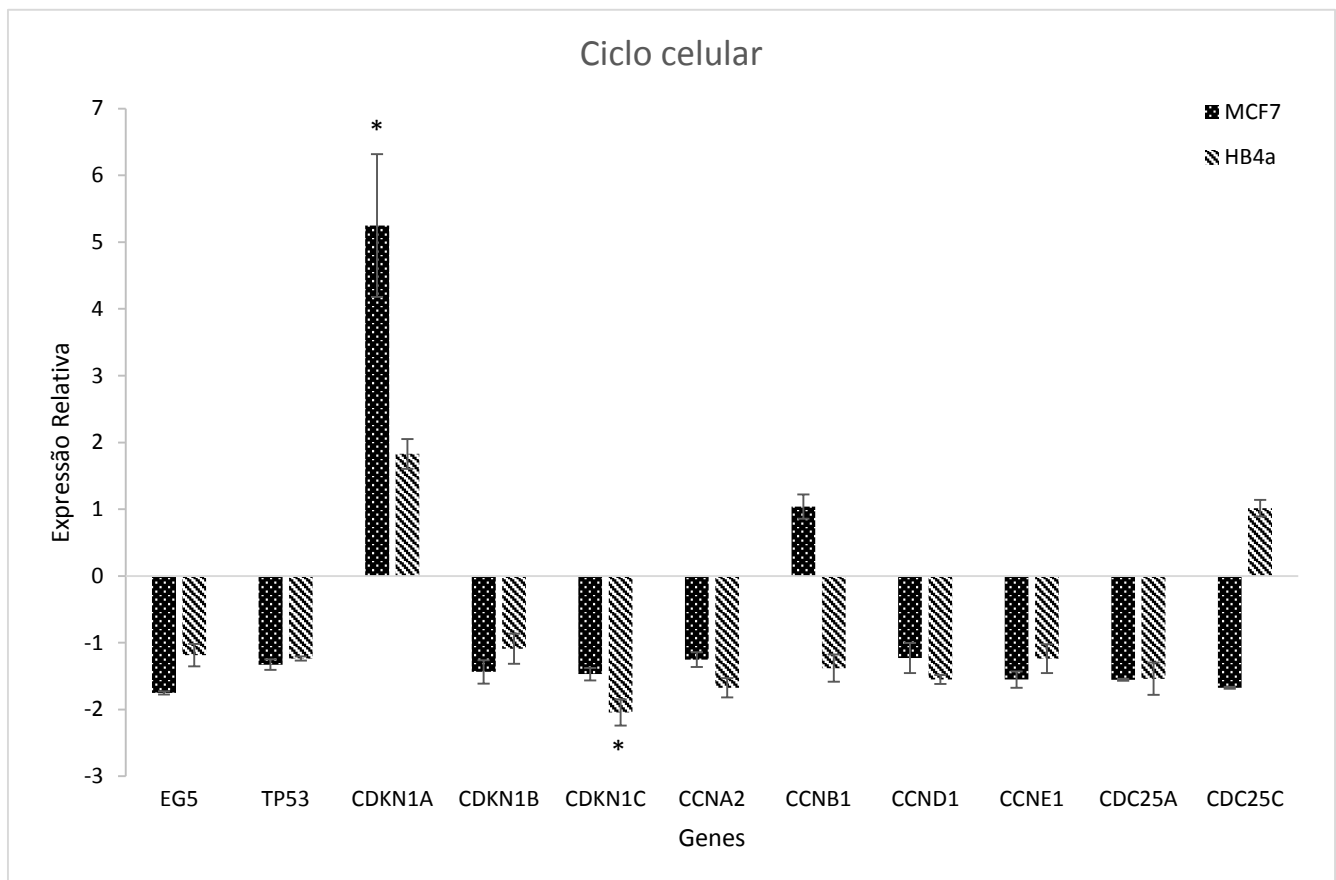


**Figura 9.** Células HB4a não são encaminhadas a apoptose. Células HB4a expostas a 25 e 50  $\mu\text{M}$  de monastrol por 24 horas, coradas com anexina-V/FITC e PI para obtenção da porcentagem de células apoptóticas por citometria de fluxo. **A)** Quantificação de células viáveis (AV-/PI-), em apoptose inicial (AV+/PI-) e em apoptose tardia/necrose (AV+/PI+ e AV-/PI+) após 24 horas de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . **B)** População de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Os dados representam valores médios de três experimentos independentes  $p < 0.05$

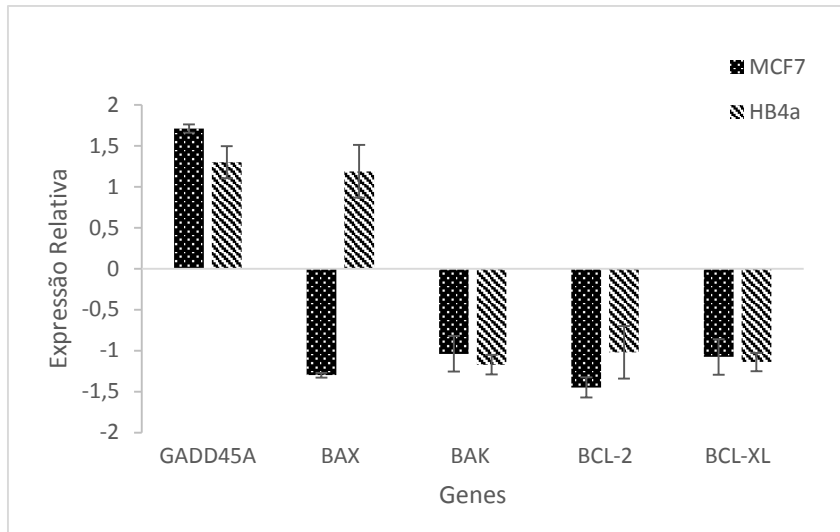
### 3.5 Monastrol leva a indução de expressão de CDKN1A em células MCF-7 e redução de CDKN1C em HB4a

Uma vez observada a parada de ciclo celular sem detecção de apoptose, foi investigado quais genes são regulados nesse mecanismo. Para isso foram analisados os níveis de expressão de RNAm dos genes envolvidos no ciclo celular (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCND*, *CCNE1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDC25A* e *CDC25C*, *EG5* e *TP53*), indução de danos ao DNA (*GADD45A*) e a apoptose (*BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* e *BAK*).

As figuras 10 e 11 mostram os valores de expressão relativa dos genes alvo normalizados com o gene de referência *GAPDH*. As células MCF-7 apresentaram indução significativa de expressão de mais de cinco (5) vezes nos níveis de RNAm do inibidor de CDK *CDKN1A*. As células HB4a tiveram o nível de expressão do inibidor de CDK *CDKN1C* reprimido significativamente em duas (2) vezes. Os demais transcritos dos genes analisados relacionados ao ciclo celular, dano ao DNA e apoptose não apresentaram alterações significativas em relação ao controle.



**Figura 6.** Expressão relativa de genes relacionados ao ciclo celular. Níveis dos transcritos de EG5, TP53, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CCNA2, CCNB1, CCND1, CCNE1, CDC25A e CDC25C obtidos por RT-qPCR após 24 h de tratamento com monastrol 50  $\mu$ M. Os dados são apresentados como a média da expressão relativa de três experimentos independentes com duplicata mecânica. Razão e análise estatística foram calculadas pelo *software* REST 2009 com de expressão  $\geq 2$  ou  $\leq -2$ . (\*) significativo com  $p \leq 0,05$ .



**Figura 7.** Expressão relativa dos genes relacionados a dano no DNA (GADD45A) e apoptose (BAX, BAK, BCL-2 e BCL-XL) obtidas por RT-qPCR após 24 h de tratamento com monastrol 50  $\mu$ M. Os dados são apresentados como a média da expressão relativa de três experimentos independentes com duplicata mecânica. Razão e análise estatística foram calculadas pelo *software* REST 2009 com crivo de expressão  $\geq 2$  ou  $\leq -2$ . (\*) significativo com  $p \leq 0,05$ .

#### 4 Discussão

A busca por novos quimioterápicos que de forma seletiva atuem sobre as células tumorais podem contribuir para minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia contra o câncer. Neste contexto estão os compostos inibidores da cinesina mitótica Eg5. O monastrol é um inibidor desta cinesina, e neste estudo confrontamos a ação deste composto nas linhagens de mama tumoral, MCF-7, e não tumoral, HB4a. Foi identificado que o monastrol possui atividade citotóxica apenas sobre a linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7, com aumento de expressão do gene *CDKN1A* e parada de ciclo celular em G2/M e G1. Os efeitos observados na linhagem não tumoral foram mais suaves com parada do ciclo celular apenas em G2/M e supressão de *CDKN1C*.

Na literatura o monastrol tem sido descrito como um agente citotóxico para as células MCF-7 em concentrações que variam de 85  $\mu$ M a 154  $\mu$ M após 48 horas de exposição [21, 35]. A análise de citotoxicidade em nosso trabalho, avaliado pela metabolização do MTT, demonstrou que apenas a linhagem tumoral MCF-7 apresentou diminuição de viabilidade celular frente ao monastrol, mostrando seletividade, uma vez que não apresentou efeito na linhagem não tumoral HB4a. Podemos observar que os efeitos observados em nosso trabalho foram encontrados em concentrações mais baixas (monastrol 50 a 100  $\mu$ M) e em tempos anteriores àqueles da literatura.

Abassi e colaboradores [36] ao investigarem mais de 2000 pequenos compostos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) através do RTCA concluíram que moléculas com mecanismos de ação semelhantes apresentavam um perfil de resposta tempo dependente baseado em valores de impedância semelhante. Compostos que interferem com o fuso mitótico, como nocardazole, paclitaxel, colchicina e monastrol, apresentaram padrão característico de queda inicial do índice celular com posterior recuperação do IC e consequente normalização da curva, similar ao encontrado no presente estudo para a linhagem MCF-7. Estes pesquisadores observaram que células de carcinoma de pulmão (A549) expostas ao monastrol apresentaram perfil de curva semelhante, e, relacionaram a queda do índice celular às mudanças morfológicas decorrentes do aprisionamento das células na mitose, que são caracterizadas por arredondamento e descolamento temporário das células. Já a posterior recuperação acredita-se estar correlacionada com células que escapam do aprisionamento mitótico e células que falharam na citocinese [36]. Já as células HB4a expostas ao monastrol apresentaram um padrão de curva diferente daqueles encontrados para agentes inibidores de ciclo celular caracterizados por Abassi e colaboradores [36]. Por todo tempo de tratamento, estas células mantiveram um crescimento exponencial, semelhantes as células controle, expostas ao monastrol 5 a 75  $\mu\text{M}$ , e apenas a concentração de 100  $\mu\text{M}$  alterou a cinética do crescimento dessas células desde tempos iniciais (<12h), e o monastrol 75  $\mu\text{M}$  a partir de 48h de exposição.

Estudos demonstraram que o monastrol impede a formação do fuso mitótico bipolar com retenção em G2/M através da ativação do *checkpoint* do fuso por ligar-se a cinesina Eg5 [7, 8, 10, 18, 37-40]. Nossos resultados mostram que o monastrol alterou o perfil de distribuição normal das células MCF-7 no ciclo celular, com um drástico aumento na população G2/M e elevação do índice mitótico sugerindo que o bloqueio seja na fase M (mitose) do ciclo. Porém, em 48h de exposição, índices mitóticos menores foram observados sem a diminuição de células com conteúdo DNA 4n, o que pode indicar que parte das células retidas em M em 24h de exposição saíram da mitose sem dividir seu material genético, provavelmente por *slippage* mitótico, formando uma população de células com conteúdo de DNA 4n retidas na fase G1 subsequente do ciclo, mecanismo conhecido como adaptação [41, 42]. Nas células HB4a este efeito também é encontrado, porém em menores proporções. O bloqueio da divisão mitótica pode ser decorrente da inibição da proteína Eg5 pelo monastrol [7, 8]. As células MCF-7 expostas ao monastrol em baixa dose (25  $\mu\text{M}$ ) apresentaram um padrão de distribuição no ciclo celular com aumento apenas da população G1 e ausência de alteração dos valores do índice mitótico para os tempos de exposição testados. Provavelmente, isto ocorra devido à fraca inibição que o monastrol causa nessas concentrações mais baixas, possibilitando que a divisão

mitótica se conclua com posterior ativação do *checkpoint* e aprisionamento das células na fase G1.

Em todos parâmetros testados para indução de apoptose é possível verificar que monastrol não foi capaz de encaminhar as linhagens HB4a e MCF7 à apoptose. Costa-Rosa [43] ao utilizar as células MCF-7 expostas ao monastrol (100  $\mu$ M) também verificou aumento de população G2/M sem indução de morte celular programada. Resultados similares foram encontrados em células A549 [40]. Outros estudos, no entanto, encontraram apoptose em células de adenocarcinoma de estômago (AGS) e coloretal (HT-29)[38], carcinoma de cervix (HeLa)[10], além de células de melanoma (UACC62)[21] expostas ao monastrol.

O ciclo celular tem no centro de sua regulação as CDKs e estas, entre outros modos de regulação, podem ser ativadas pelas ciclinas ou então inativadas pelos seus inibidores, as CKIs. Os resultados do presente estudo não mostraram alterações de expressão gênica dos ativadores de CDK (ciclinas), porém observaram-se alterações nos inibidores da família Cip/Kip. Esta família é constituída pelas proteínas p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>Kip2</sup>, que são codificadas pelos genes *CDKN1A*, *CDKN1B* e *CDKN1C*, respectivamente, e são conhecidos por serem inibidores globais do ciclo celular, visto que são capazes de regular negativamente, de maneira direta ou indireta, os complexos de ciclinas A, B, D, e E e suas CDKs associadas [44, 45] e causar aprisionamento no ciclo celular. Estas proteínas além de regularem o ciclo celular, também estão envolvidas na transcrição, apoptose, diferenciação e migração [46]. Ao contrário do gene *TP53*, estudos indicam que os inibidores de CDK da família Cip/Kip raramente estão mutados nos cânceres [47, 48].

Na literatura há relatos que a resposta celular ao *slippage* mitótico é decorrente do equilíbrio entre a capacidade celular em ativar a maquinaria apoptótica e os níveis de degradação de ciclina B [49, 50]. Apesar de possuir o padrão de curva no RTCA de células que apresentam escape da mitose, *checkpoint* do fuso ativo, demonstrado pela parada no ciclo na fase G2/M e aprisionamentos na mitose, ao analisar os níveis de mRNA das ciclinas A2, E1, D1 e, principalmente, B1 não observamos alterações nos níveis de RNAm destes genes. Porém esta regulação pode ocorrer a nível de tradução ou pós-tradução, uma vez que estudos sugerem que há a necessidade da degradação de ciclina B para que haja escape da mitose [49, 50].

Estudos demonstram que o monastrol é capaz de levar as células a catástrofe mitótica [51-53] e em nosso estudo as células HB4a expostas ao monastrol 50  $\mu$ M apresentaram células gigantes multinucleadas e micronucleadas, morfologia características desse processo como descrito por Roninson e colaboradores [54].

Em nosso estudo observamos tendência a diminuição, porém não de forma significativa, dos níveis de RNAm de *EG5* quando exposto ao monastrol, no entanto há relatos de que na ausência de atividade de Eg5, outra cinesina a Kif15, pode ter sua expressão aumentada a fim de suprir as funções exercidas pela Eg5 [55], o que pode contribuir para o escape da prisão em G2/M e para a progressão do ciclo celular.

A superexpressão de p57<sup>Kip2</sup> está relacionada com parada na fase de G1 do ciclo celular por inibição do complexo de CDK/ciclina [56, 57]. Este gene é candidato a supressor tumoral, e sua baixa regulação ou ausência pode influenciar a tumorigênese de mama [58, 59]. No presente estudo, as células HB4a tiveram seus níveis de expressão de *CDKN1C* reduzidos quando expostas ao monastrol. Essa regulação negativa pode estar correlacionada à diminuição da população G1 observada. Já o aumento da população G2/M pode ser decorrente da ação do monastrol e da ativação do *checkpoint* do fuso.

A expressão do gene *CDKN1A* que codifica para a proteína p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup> é alvo transcricional da proteína supressora tumoral p53 e por essa é controlada. Estresses sofridos pela célula, como danos no DNA, podem aumentar os níveis de p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup> [60]. Essa proteína, assim como os demais membros da família, é um inibidor de CDKs e, por isso, pode atuar inibindo a progressão do ciclo celular em suas diferentes fases [44]. Células que sobrevivem à parada em G2/M e que possuem níveis elevados de p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup> podem ficar retidas em G1, serem encaminhadas à morte celular, prosseguirem no ciclo fazendo endoreplicação ou, ainda, se tornarem senescentes. É relatado que altas expressões de p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup> podem suprimir o crescimento de células de carcinoma mamário [61] e sua ausência é um indicador de pior prognóstico para o câncer [62].

No presente estudo, ao analisar os níveis do transcrito do gene sinalizador de dano *GADD45A* (*Growth Arrest DNA-Damage-inducible, alpha*) [63-65] e níveis do gene *CDKN1A* nas células de adenocarcinoma de mama expostas ao monastrol 50  $\mu$ M pudemos verificar que houve uma tendência ao aumento de expressão (1,7 vezes) do sinalizador de dano, apesar de não significativo, e altos níveis de expressão (5x) do gene codificador de p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup>. A regulação positiva de *CDKN1A* é correlacionada com inibição do ciclo celular nas fases G1[44] e G2/M[66, 67], corroborando com os dados observados em nosso estudo. Esses resultados também podem estar relacionados ao processo de senescência prematura, uma vez que altos níveis de p21<sup>Cip/Waf1/Sdi1</sup> também são característicos deste processo [68] acompanhado de aumento de tamanho e granulosidade celular [69] observados no presente estudo (dados não apresentados). Porém, mais testes devem ser realizados para que se possa confirmar esse perfil.

Portanto, o efeito citotóxico observado nas células MCF-7 está relacionado ao aprisionamento na fase M do ciclo celular com características de *slippage* mitótico. Ainda, nestas células o monastrol causa uma acentuada regulação positiva dos níveis de RNAm de *CDKN1A*, um gene que codifica para um regulador negativo da progressão do ciclo celular enquanto nas células não tumorais (HB4a) houve uma regulação negativa dos níveis de RNAm de outro regulador negativo do ciclo celular, o gene *CDKN1C*. Em baixas doses do monastrol, apenas a linhagem de adenocarcinoma mamário apresentou resultado significativo com o aprisionamento na fase G1 do ciclo, provavelmente decorrente da ativação do *checkpoint* de G1. Já para as células não-tumorais HB4a, o monastrol se mostrou menos eficaz, não foi observado efeitos citotóxicos e alterações na cinética de crescimento. Para estas células também foi encontrado parada na fase M do ciclo, porém em menores proporções que àquelas encontradas na MCF-7. Não foi encontrado indícios de apoptose em nossos ensaios, porém há sinais de que as células HB4a e MCF-7 possam estar sendo encaminhadas a catástrofe mitótica e senescência, porém mais testes devem ser realizados para confirmação. Dessa forma, os resultados encontrados indicam que o monastrol exerce atividade antiproliferativa diferencial entre as células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e epitélio mamário HB4a, com maior potencialidade para as células tumorais tornando-o bom candidato à quimioterapia anticâncer.

## Referências

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (2000) 57-70.
- [2] M.A. Jordan, L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nature reviews. Cancer*, 4 (2004) 253-265.
- [3] M.R. Harrison, K.D. Holen, G. Liu, Beyond taxanes: a review of novel agents that target mitotic tubulin and microtubules, kinases, and kinesins, *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*, 7 (2009) 54-64.
- [4] D. Huszar, M.E. Theoclitou, J. Skolnik, R. Herbst, Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy, *Cancer metastasis reviews*, 28 (2009) 197-208.
- [5] E.K. Rowinsky, V. Chaudhry, D.R. Cornblath, R.C. Donehower, Neurotoxicity of Taxol, *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (1993) 107-115.
- [6] M.K. Tuxen, S.W. Hansen, Neurotoxicity secondary to antineoplastic drugs, *Cancer treatment reviews*, 20 (1994) 191-214.
- [7] T.U. Mayer, T.M. Kapoor, S.J. Haggarty, R.W. King, S.L. Schreiber, T.J. Mitchison, Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen, *Science*, 286 (1999) 971-974.
- [8] T.M. Kapoor, T.U. Mayer, M.L. Coughlin, T.J. Mitchison, Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5, *The Journal of cell biology*, 150 (2000) 975-988.
- [9] Z. Maliga, T.J. Mitchison, Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol, *BMC chemical biology*, 6 (2006) 2.
- [10] G.M. Chin, R. Herbst, Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint, *Molecular cancer therapeutics*, 5 (2006) 2580-2591.
- [11] A. Blangy, H.A. Lane, P. d'Herin, M. Harper, M. Kress, E.A. Nigg, Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo, *Cell*, 83 (1995) 1159-1169.
- [12] A.P. Enos, N.R. Morris, Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*, *Cell*, 60 (1990) 1019-1027.
- [13] N.P. Ferenz, A. Gable, P. Wadsworth, Mitotic functions of kinesin-5, *Seminars in cell & developmental biology*, 21 (2010) 255-259.
- [14] E. Koller, S. Propp, H. Zhang, C. Zhao, X. Xiao, M. Chang, S.A. Hirsch, P.J. Shepard, S. Koo, C. Murphy, R.I. Glazer, N.M. Dean, Use of a chemically modified antisense oligonucleotide library to identify and validate Eg5 (kinesin-like 1) as a target for antineoplastic drug development, *Cancer research*, 66 (2006) 2059-2066.
- [15] R. Le Guellec, J. Paris, A. Couturier, C. Roghi, M. Philippe, Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein, *Molecular and cellular biology*, 11 (1991) 3395-3398.
- [16] R. Sakowicz, J.T. Finer, C. Beraud, A. Crompton, E. Lewis, A. Fritsch, Y. Lee, J. Mak, R. Moody, R. Turincio, J.C. Chabala, P. Gonzales, S. Roth, S. Weitman, K.W. Wood, Antitumor activity of a kinesin inhibitor, *Cancer research*, 64 (2004) 3276-3280.
- [17] B.Z. Carter, D.H. Mak, Y. Shi, W.D. Schober, R.Y. Wang, M. Konopleva, E. Koller, N.M. Dean, M. Andreeff, Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: overcoming imatinib resistance, *Cell cycle*, 5 (2006) 2223-2229.
- [18] S.A. Haque, T.P. Hasaka, A.D. Brooks, P.V. Lobanov, P.W. Baas, Monastrol, a prototype anti-cancer drug that inhibits a mitotic kinesin, induces rapid bursts of axonal outgrowth from cultured postmitotic neurons, *Cell motility and the cytoskeleton*, 58 (2004) 10-16.

- [19] S. Lin, M. Liu, Y.J. Son, B. Timothy Himes, D.M. Snow, W. Yu, P.W. Baas, Inhibition of Kinesin-5, a microtubule-based motor protein, as a strategy for enhancing regeneration of adult axons, *Traffic*, 12 (2011) 269-286.
- [20] S.Y. Yoon, J.E. Choi, J.W. Huh, O. Hwang, H.S. Lee, H.N. Hong, D. Kim, Monastrol, a selective inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, induces a distinctive growth profile of dendrites and axons in primary cortical neuron cultures, *Cell motility and the cytoskeleton*, 60 (2005) 181-190.
- [21] D. Russowsky, R.F. Canto, S.A. Sanches, M.G. D'Oca, A. de Fatima, R.A. Pilli, L.K. Kohn, M.A. Antonio, J.E. de Carvalho, Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues, *Bioorganic chemistry*, 34 (2006) 173-182.
- [22] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1983) 55-63.
- [23] F.A. Atienzar, K. Tilmant, H.H. Gerets, G. Toussaint, S. Speeckaert, E. Hanon, O. Depelchin, S. Dhalluin, The use of real-time cell analyzer technology in drug discovery: defining optimal cell culture conditions and assay reproducibility with different adherent cellular models, *Journal of biomolecular screening*, 16 (2011) 575-587.
- [24] J.M. Atienza, J. Zhu, X. Wang, X. Xu, Y. Abassi, Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays, *Journal of biomolecular screening*, 10 (2005) 795-805.
- [25] A.L. Savio, G.N. da Silva, E.A. de Camargo, D.M. Salvadori, Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil), *Mutation research. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 762 (2014) 40-46.
- [26] S.C. Brauns, P. Milne, R. Naude, M. Van de Venter, Selected cyclic dipeptides inhibit cancer cell growth and induce apoptosis in HT-29 colon cancer cells, *Anticancer research*, 24 (2004) 1713-1719.
- [27] M. Chen, B. Li, X. Zhao, H. Zuo, X. He, Z. Li, X. Liu, L. Chen, Effect of diallyl trisulfide derivatives on the induction of apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells, *Molecular and cellular biochemistry*, 363 (2012) 75-84.
- [28] J.M. Holy, Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells, *Mutation research*, 518 (2002) 71-84.
- [29] W.T. Hsieh, K.Y. Huang, H.Y. Lin, J.G. Chung, *Physalis angulata* induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 44 (2006) 974-983.
- [30] D. Javelaud, F. Besancon, Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 37949-37954.
- [31] M.S. Tsuboy, J.C. Marcarini, A.O. de Souza, N.A. de Paula, D.J. Dorta, M.S. Mantovani, L.R. Ribeiro, Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis, *Journal of medicinal food*, 17 (2014) 218-225.
- [32] N.A. de Paula, A.M. Niwa, D.C. Vesenick, C. Panis, R. Cecchini, A. de Fatima, L.R. Ribeiro, M.S. Mantovani, Evaluation of the effects of nicorandil and its molecular precursor (without radical NO) on proliferation and apoptosis of 786-cell, *Cytotechnology*, 65 (2013) 839-850.
- [33] S. Sugaya, H. Nakanishi, H. Tanzawa, K. Sugita, K. Kita, N. Suzuki, Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells, *Mutation research*, 578 (2005) 327-332.

- [34] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic acids research*, 30 (2002) e36.
- [35] A. Kamal, M. Shaheer Malik, S. Bajee, S. Azeeda, S. Faazil, S. Ramakrishna, V.G. Naidu, M.V. Vishnuwardhan, Synthesis and biological evaluation of conformationally flexible as well as restricted dimers of monastrol and related dihydropyrimidones, *European journal of medicinal chemistry*, 46 (2011) 3274-3281.
- [36] Y.A. Abassi, B. Xi, W. Zhang, P. Ye, S.L. Kirstein, M.R. Gaylord, S.C. Feinstein, X. Wang, X. Xu, Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects, *Chemistry & biology*, 16 (2009) 712-723.
- [37] Z. Maliga, T.M. Kapoor, T.J. Mitchison, Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, *Chemistry & biology*, 9 (2002) 989-996.
- [38] I. Leizerman, R. Avunie-Masala, M. Elkabets, A. Fich, L. Gheber, Differential effects of monastrol in two human cell lines, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61 (2004) 2060-2070.
- [39] S. DeBonis, J.P. Simorre, I. Crevel, L. Lebeau, D.A. Skoufias, A. Blangy, C. Ebel, P. Gans, R. Cross, D.D. Hackney, R.H. Wade, F. Kozielski, Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5, *Biochemistry*, 42 (2003) 338-349.
- [40] U. Vijapurkar, W. Wang, R. Herbst, Potentiation of kinesin spindle protein inhibitor-induced cell death by modulation of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways, *Cancer research*, 67 (2007) 237-245.
- [41] B.A. Weaver, D.W. Cleveland, Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death, *Cancer cell*, 8 (2005) 7-12.
- [42] C.L. Rieder, H. Maiato, Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint, *Developmental cell*, 7 (2004) 637-651.
- [43] M.d. Costa-Rosa, Interferindo na progressão do ciclo celular para avaliar possíveis alterações de ploidia em células tumorais de mam humana, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- [44] C.J. Sherr, J.M. Roberts, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes & development*, 13 (1999) 1501-1512.
- [45] O. Cazzalini, A.I. Scovassi, M. Savio, L.A. Stivala, E. Prosperi, Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response, *Mutation research*, 704 (2010) 12-20.
- [46] A. Besson, S.F. Dowdy, J.M. Roberts, CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond, *Developmental cell*, 14 (2008) 159-169.
- [47] A.L. Gartel, A.L. Tyner, Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene, *Experimental cell research*, 246 (1999) 280-289.
- [48] M.H. Lee, H.Y. Yang, Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 58 (2001) 1907-1922.
- [49] D.A. Brito, C.L. Rieder, Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint, *Current biology : CB*, 16 (2006) 1194-1200.
- [50] K.E. Gascoigne, S.S. Taylor, Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs, *Cancer cell*, 14 (2008) 111-122.
- [51] H. Vakifahmetoglu, M. Olsson, B. Zhivotovsky, Death through a tragedy: mitotic catastrophe, *Cell death and differentiation*, 15 (2008) 1153-1162.
- [52] I. Vitale, L. Galluzzi, M. Castedo, G. Kroemer, Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12 (2011) 385-392.

- [53] Y. Chen, J.P. Chow, R.Y. Poon, Inhibition of Eg5 acts synergistically with checkpoint abrogation in promoting mitotic catastrophe, *Molecular cancer research : MCR*, 10 (2012) 626-635.
- [54] I.B. Roninson, E.V. Broude, B.D. Chang, If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells, *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 4 (2001) 303-313.
- [55] M.E. Tanenbaum, L. Macurek, A. Janssen, E.F. Geers, M. Alvarez-Fernandez, R.H. Medema, Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly, *Current biology : CB*, 19 (2009) 1703-1711.
- [56] E. Kavanagh, B. Joseph, The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer, *Biochimica et biophysica acta*, 1816 (2011) 50-56.
- [57] Z. Ullah, M.J. Kohn, R. Yagi, L.T. Vassilev, M.L. DePamphilis, Differentiation of trophoblast stem cells into giant cells is triggered by p57/Kip2 inhibition of CDK1 activity, *Genes & development*, 22 (2008) 3024-3036.
- [58] P.S. Larson, B.L. Schlechter, C.L. King, Q. Yang, C.N. Glass, C. Mack, R. Pistey, A. de Las Morenas, C.L. Rosenberg, CDKN1C/p57kip2 is a candidate tumor suppressor gene in human breast cancer, *BMC cancer*, 8 (2008) 68.
- [59] X.Y. Xu, W.Q. Wang, L. Zhang, Y.M. Li, M. Tang, N. Jiang, S.L. Cai, L. Wei, F. Jin, B. Chen, Clinical implications of p57 KIP2 expression in breast cancer, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 13 (2012) 5033-5036.
- [60] D.R. Green, G. Kroemer, Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53, *Nature*, 458 (2009) 1127-1130.
- [61] M.A. Shibata, K. Yoshidome, E. Shibata, C.L. Jorcyk, J.E. Green, Suppression of mammary carcinoma growth in vitro and in vivo by inducible expression of the Cdk inhibitor p21, *Cancer gene therapy*, 8 (2001) 23-35.
- [62] A.M. Abukhdeir, B.H. Park, P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance, *Expert reviews in molecular medicine*, 10 (2008) e19.
- [63] Z. Yang, L. Song, C. Huang, Gadd45 proteins as critical signal transducers linking NF-kappaB to MAPK cascades, *Current cancer drug targets*, 9 (2009) 915-930.
- [64] D.A. Liebermann, J.S. Tront, X. Sha, K. Mukherjee, A. Mohamed-Hadley, B. Hoffman, Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia, *Critical reviews in oncogenesis*, 16 (2011) 129-140.
- [65] D.A. Liebermann, B. Hoffman, Gadd45 in stress signaling, *Journal of molecular signaling*, 3 (2008) 15.
- [66] M. Mandal, D. Bandyopadhyay, T.M. Goepfert, R. Kumar, Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK), *Oncogene*, 16 (1998) 217-225.
- [67] T. Abbas, A. Dutta, p21 in cancer: intricate networks and multiple activities, *Nature reviews. Cancer*, 9 (2009) 400-414.
- [68] B.D. Chang, K. Watanabe, E.V. Broude, J. Fang, J.C. Poole, T.V. Kalinichenko, I.B. Roninson, Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 4291-4296.
- [69] L.E. Klein, B.S. Freeze, A.B. Smith, 3rd, S.B. Horwitz, The microtubule stabilizing agent discodermolide is a potent inducer of accelerated cell senescence, *Cell cycle*, 4 (2005) 501-507.

## 5 Considerações finais

A busca por novos quimioterápicos anticâncer que de forma seletiva atuem sobre as células tumorais podem contribuir para minimizar os efeitos colaterais da quimioterapia. Neste contexto estão os compostos inibidores da cinesina mitótica Eg5. O monastrol é um inibidor desta cinesina, e neste estudo confrontamos a ação deste composto nas linhagens de mama tumoral, MCF-7, e não tumoral, HB4a. OS resultados encontrados indicam que o monastrol exerce atividade antiproliferativa diferencial entre as células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e epitélio mamário HB4a relacionada ao aprisionamento na fase M do ciclo celular com características de *slippage* mitótico. Nas células MCF-7 o efeito citotóxico observado está relacionado ao aprisionamento na fase M do ciclo celular com características de *slippage* mitótico. Ainda, nestas células o monastrol causa uma acentuada regulação positiva dos níveis de RNAm de *CDKN1A*, um gene que codifica para um regulador negativo da progressão do ciclo celular enquanto nas células não tumorais (HB4a) houve uma regulação negativa dos níveis de RNAm de outro regulador negativo do ciclo celular, o gene *CDKN1C*. Em baixas doses do monastrol, apenas a linhagem de adenocarcinoma mamário apresentou resultado significativo com o aprisionamento na fase G1 do ciclo, provavelmente decorrente da ativação do *checkpoint* de G1. Já para as células não-tumorais HB4a, o monastrol se mostrou menos eficaz, não foi observado efeitos citotóxicos e alterações na cinética de crescimento. Para estas células também foi encontrado parada na fase M do ciclo, porém em menores proporções que àquelas encontradas na MCF-7. Não foi encontrado indícios de apoptose em nossos ensaios, porém há sinais de que as células HB4a e MCF-7 possam estar sendo encaminhadas a catástrofe mitótica e senescência, porém mais testes devem ser realizados para confirmação.

Apesar de estudos demonstrarem maior expressão das proteínas Eg5 em células tumorais quando comparada com as normais, estas, ainda apresentam essa proteína e o uso de medicamentos que atuem sobre essa cinesina acabam gerando danos as mesmas. Sabe-se que poucas células depois de diferenciadas continuam a se multiplicar e, portanto, este composto poderia apresentar poucos efeitos colaterais quando utilizado. Dessa forma, os resultados encontrados indicam que o monastrol exerce atividade antiproliferativa diferencial entre as células de adenocarcinoma mamário MCF-7 e epitélio mamário HB4a, com maior potencialidade para as células tumorais tornando-o bom candidato à quimioterapia anticâncer.

## Apêndices

**Tabela 1.** Valores de absorvância das linhagens HB4a e MCF-7 após 24 e 48h de tratamento com monastrol 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$  obtidos pelo ensaio de MTT. Os dados são apresentados como média de três repetições biológicas com triplicatas  $\pm$  desvio padrão

Tratamentos	HB4a		MCF-7	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
Controle	0,47 $\pm$ 0,01	0,564 $\pm$ 0,03	1,05 $\pm$ 0,06	1,381 $\pm$ 0,06
5 $\mu\text{M}$	0,461 $\pm$ 0,02	0,591 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,05	1,47 $\pm$ 0,08
25 $\mu\text{M}$	0,489 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,03	1,03 $\pm$ 0,07	1,394 $\pm$ 0,08
50 $\mu\text{M}$	0,468 $\pm$ 0,03	0,656 $\pm$ 0,03	0,782 $\pm$ 0,09 ***	0,833 $\pm$ 0,07 ***
75 $\mu\text{M}$	0,466 $\pm$ 0,05	0,629 $\pm$ 0,02	0,803 $\pm$ 0,08 ***	0,764 $\pm$ 0,06 ***
100 $\mu\text{M}$	0,461 $\pm$ 0,08	0,616 $\pm$ 0,01	0,817 $\pm$ 0,09 ***	0,792 $\pm$ 0,05 ***

Dados analisados por ANOVA seguido de Dunnet.

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 2.** Valores de Índice Celular (IC) da linhagem HB4a obtidos pelo sistema xCELLigence-RTCA após até 96h de tratamento com monastrol 5, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{M}$ . Os dados foram normalizados no tempo de adição dos tratamentos. O IC foi mensurado a cada 30 min e os dados são apresentados como média de três replicatas.

Tratamentos	Tempo (horas)								
	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Controle	1,00	1,60	2,48	3,42	4,58	6,48	9,21	12,23	15,55
5 $\mu\text{M}$	1,00	1,63	2,48	3,43	4,51	6,35	9,04	13,62	18,90
25 $\mu\text{M}$	1,00	1,52	2,32	3,21	4,12	5,70	7,98	11,42	15,86
50 $\mu\text{M}$	1,00	1,56	2,37	3,30	4,21	5,47	7,47	10,15	14,48
75 $\mu\text{M}$	1,00	1,53	2,28	3,09	3,86	4,67	5,89	7,52	9,99
100 $\mu\text{M}$	1,00	1,26	1,58	1,98	2,32	2,71	3,13	3,68	4,38

**Tabela 3.** Valores de Índice Celular (IC) da linhagem MCF-7 obtidos pelo sistema xCELLigence-RTCA. Os dados foram normalizados no tempo de adição dos tratamentos. O IC foi mensurado a cada 30 min e os dados são apresentados como média de três replicatas.

Tratamentos	Tempo (horas)								
	0	12	24	36	48	60	72	84	96
Controle	1	1,22	1,75	2,41	3,10	4,02	5,02	6,35	7,84
5 $\mu\text{M}$	1	1,24	1,72	2,32	3,18	4,18	5,34	6,78	8,20
25 $\mu\text{M}$	1	1,08	1,48	2,00	2,71	3,72	4,89	6,40	7,87
50 $\mu\text{M}$	1	0,82	0,88	1,41	1,87	2,25	2,68	3,25	4,01
75 $\mu\text{M}$	1	0,86	0,82	1,30	1,76	2,06	2,37	2,77	3,35
100 $\mu\text{M}$	1	0,78	0,62	0,98	1,37	1,56	1,69	1,83	1,97

**Tabela 4.** Análise da distribuição das células HB4a nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo. Porcentagem da população em G1, S e G2/M após 24 e 48 horas de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão.

	24h			48h		
	Controle	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	Controle	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
<b>G1</b>	45,79 $\pm$ 3,02	44,3 $\pm$ 4,45	35,18 $\pm$ 5,31*	47,8 $\pm$ 8,49	44,63 $\pm$ 6,41	28,88 $\pm$ 1,76 *
<b>S</b>	15,86 $\pm$ 2,01	15,75 $\pm$ 1,75	12,57 $\pm$ 1,09	16,78 $\pm$ 0,82	16,41 $\pm$ 1,14	12,4 $\pm$ 2,89 *
<b>G2/M</b>	28,13 $\pm$ 3,7	31,01 $\pm$ 3,73	42,73 $\pm$ 5,08 **	23,81 $\pm$ 3,09	28,53 $\pm$ 2,95	41,93 $\pm$ 3,99 **

Dados analisados por ANOVA seguido de Dunnet.

\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,5$ )

\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 5.** Análise da distribuição das células MCF-7 nas fases do ciclo celular por citometria de fluxo. Porcentagem da população em G1, S e G2/M após 24 e 48 horas de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão.

	24h			48h		
	Controle	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	Controle	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
<b>G1</b>	44,72 $\pm$ 1,38	50,76 $\pm$ 0,28 **	48,7 $\pm$ 2,42 *	54,75 $\pm$ 4,71	62,07 $\pm$ 1,6 *	48,42 $\pm$ 1,51
<b>S</b>	30,27 $\pm$ 1,01	29,37 $\pm$ 2,25	12,96 $\pm$ 2 ***	24,35 $\pm$ 1,77	21,22 $\pm$ 0,59	13,47 $\pm$ 1,92 ***
<b>G2/M</b>	18,69 $\pm$ 1,76	15,65 $\pm$ 0,34	35,18 $\pm$ 3,81 ***	17,23 $\pm$ 0,73	13,17 $\pm$ 0,85 **	34,19 $\pm$ 1,29 ***

Dados analisados por ANOVA seguido de Dunnet.

\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,5$ )

\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 6.** Análise de morte celular das células MCF-7 e HB4a por citometria de fluxo. Porcentagem da população de células viáveis (LL), em apoptose inicial (LR) e apoptose tardia/necrose (UR/UL) após 24 h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$ . Os dados são apresentados como média de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão.

	HB4a			MCF-7		
	Controle	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$	Controle	25 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
<b>Viáveis (LL)</b>	94,2 $\pm$ 2,07	93,8 $\pm$ 1,67	89,3 $\pm$ 2,96	83,8 $\pm$ 3,5	76,7 $\pm$ 3,57	74,6 $\pm$ 6,4
<b>Apop. Inicial (LR)</b>	1,8 $\pm$ 0,81	2,3 $\pm$ 0,69	2,2 $\pm$ 0,78	0,8 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,19	1,2 $\pm$ 0,37
<b>Apop. Tardia/necrose (UL/LR)</b>	4 $\pm$ 1,26	3,9 $\pm$ 1	8,5 $\pm$ 3,31	15,8 $\pm$ 3,4	22,2 $\pm$ 3,68	23,9 $\pm$ 5,88

Dados analisados por ANOVA seguido de Dunnet.

**Tabela 7.** Índice mitótico (%) das células MCF-7 e HB4a obtidos após 24 e 48h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$  por análise morfológica com Hoechst 33342. Os dados são apresentados como média de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão.

Tratamentos	HB4a		MCF-7	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<b>Controle</b>	4,6 $\pm$ 0,53	4,1 $\pm$ 0,42	3,1 $\pm$ 0,61	3,5 $\pm$ 0,7
<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>	7,1 $\pm$ 0,61	4,1 $\pm$ 1,3	4,6 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,3
<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	12,5 $\pm$ 2,73 **	8,3 $\pm$ 1,1 **	14,6 $\pm$ 1,31 ***	8,2 $\pm$ 1,7 **

Dados analisados por ANOVA seguido de Dunnet.

\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,01$ )

\*\*\* Diferença estatisticamente significativa ao controle negativo ( $p < 0,001$ )

**Tabela 8.** Índice apoptótico (%) das células MCF-7 e HB4a obtidos após 24 e 48h de tratamento com monastrol 25 e 50  $\mu\text{M}$  por análise morfológica com Hoescht 33342. Os dados são apresentados como média de três repetições biológicas  $\pm$  desvio padrão.

Tratamentos	HB4a		MCF-7	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<b>Controle</b>	0,2 $\pm$ 0,35	0,07 $\pm$ 0,11	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>25 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,23 $\pm$ 0,11	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
<b>50 <math>\mu\text{M}</math></b>	0,87 $\pm$ 0,42	0,27 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,31	0,6 $\pm$ 0,53

Dados analisados por ANOVA seguido de Dunnet.

**Tabela 9.** Expressão relativa normalizada com o gene de referência GAPDH. Os valores de expressão relativa representam quantas vezes o gene foi menos expresso em relação ao grupo controle. Os dados são apresentados como média de três replicatas  $\pm$  desvio padrão

Genes	Expressão relativa $\pm$ Desvio padrão	
	MCF-7	HB4a
<i>EG5</i>	0,57 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,17
<i>TP53</i>	0,75 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,03
<i>CDKN1A</i>	5,25 $\pm$ 1,07 UP	1,83 $\pm$ 0,22
<i>CDKN1B</i>	0,69 $\pm$ 0,17	0,92 $\pm$ 0,22
<i>CDKN1C</i>	0,68 $\pm$ 0,09	0,48 $\pm$ 0,19 DOWN
<i>CCNA2</i>	0,8 $\pm$ 0,11	0,60 $\pm$ 0,14
<i>CCNB1</i>	1,04 $\pm$ 0,18	0,72 $\pm$ 0,2
<i>CCND1</i>	0,81 $\pm$ 0,22	0,64 $\pm$ 0,07
<i>CCNE1</i>	0,64 $\pm$ 0,12	0,81 $\pm$ 0,21
<i>CDC25A</i>	0,64 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,24
<i>CDC25C</i>	0,6 $\pm$ 0,02	1,01 $\pm$ 0,12
<i>GADD45A</i>	1,71 $\pm$ 0,05	1,30 $\pm$ 0,20
<i>BAX</i>	0,77 $\pm$ 0,03	1,18 $\pm$ 0,32
<i>BAK</i>	0,96 $\pm$ 0,22	0,85 $\pm$ 0,12
<i>BCL2</i>	0,69 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,32
<i>BCL-XL</i>	0,93 $\pm$ 0,23	0,88 $\pm$ 0,11