



INSTITUTO SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE – NORTE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS

Mestrado Terapias Moleculares

**Análise da actividade do checkpoint mitótico em linhas
celulares do cancro da cavidade oral**

Íris Marisa de Andrade Ferreira



Íris Marisa de Andrade Ferreira

**Análise da actividade do checkpoint mitótico em linhas
celulares do cancro da cavidade oral**

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Terapias
Moleculares pelo Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte**

Trabalho de tese realizado sob a orientação de:

Doutor Hassan Bousbaa

Categoria – Professor Associado

Co-orientador – Doutora Roxana Moreira

Categoria – Professora Auxiliar

Afiliação – Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS); Instituto Superior de
Ciências da Saúde-Norte/CESPU; Gandra – Portugal

**Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte
Departamento de Ciências 2010**

Agradecimentos

Apesar da investigação realizada, que contribuiu para a escrita desta tese de mestrado, ser um trabalho individual a que qualquer investigador está destinado, contei com os contributos de inúmeras pessoas.

Em primeiro lugar, quero dirigir os meus agradecimentos ao meu orientador, o Professor Doutor Hassan Bousbaa, pela sua disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida e por prestar toda a orientação necessária para melhorar o meu desempenho durante a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Roxana Moreira, pela confiança que em mim depositou e especialmente pela preocupação constante com o andamento do meu trabalho.

À Mestre Juliana e à Mestre Joana, pelo acompanhamento exercido durante a execução do trabalho e por me ajudarem nas questões relacionadas com a investigação e pela revisão crítica do presente texto.

À Doutora Rita, técnica de investigação do laboratório Biologia Molecular e Celular do CICS, pelo apoio e interesse. Sem esquecer a sua ajuda que contribuiu para ultrapassar alguns dos problemas na execução deste projecto.

À Mestre Vanessa por me dispensar pormenores importantes do seu trabalho e por proporcionar um excelente ambiente de trabalho.

Ao instituto pelas condições que me foram disponibilizadas para desenvolver este trabalho.

Por fim, aos meus pais um agradecimento especial pelo apoio e compreensão.

Resumo	5
Introdução	8
Ciclo celular	9
Regulação do ciclo celular	13
Checkpoints do ciclo celular	15
Checkpoint mitótico	16
Estrutura do fuso mitótico.....	17
Mecanismo de acção do checkpoint.....	20
O aparelho mitótico, a segregação cromossómica e a tumorigénese	23
Cancro da Cavidade Oral.....	25
Objectivo Geral	26
Material e Métodos	28
Linhas Celulares.....	29
Cultura de Células	29
Subcultura	30
Tratamento de frascos com Poli-L-Lisina (PLL).....	31
Determinação de índice mitótico	31
Determinação dos parâmetros mitóticos.....	32
Chromosome Spread	32
Imunofluorescência	33
Tratamento de material laboratorial com DEPC (<i>Diethylpyrocarbonate</i>)	34
Extracção de RNA.....	35
Primers para Real-Time PCR.....	35
Real Time PCR	37
Análise estatística de resultados.....	38
Resultados	39
As linhas celulares SCC04 e SCC09 são incapazes de sustentar a paragem em mitose sob acção do nocodazole	40
As linhas SCC09 e SCC04 apresentam cromátídeos separados após 12 horas de incubação com nocodazole	44
As SCC09 apresentam um número elevado de metafases e as SCC04 apresentam um número elevado de prometafases.....	46

As linhas SCC09 e SCC04 apresentam uma distribuição subcelular normal das proteínas do checkpoint mitótico	48
As linhas SCC apresentam alterações nos níveis de expressão dos genes do checkpoint mitótico: Bub1, BubR1, Bub3, Cdc20, Chfr e Mad2	50
Discussão/Conclusão	52
Perspectivas Futuras.....	57
Bibliografia.....	59

I. Resumo

A instabilidade cromossómica é uma característica frequente nas células do carcinoma escamoso da cavidade oral (OSCC, *Oral Squamous Cell Carcinoma*), pensando-se estar associada a defeitos no checkpoint mitótico, mecanismo de controlo e de monitorização crucial para a correcta segregação dos cromossomas durante a divisão celular. Neste contexto, tem sido sugerido que alterações nas proteínas reguladoras deste mecanismo são responsáveis pela promoção da aneuploidia que se verifica habitualmente no cancro.

Tendo em conta, a necessidade de solidificar e complementar resultados anteriormente obtidos no nosso laboratório, este trabalho teve como objectivo a análise funcional e molecular do checkpoint mitótico nas linhas celulares tumorais, SCC04 e SCC09, utilizando-se como controlo uma linha celular normal da cavidade oral, a linha celular primária de queratinócitos normais humanos, HOK (*Human Oral Keratinocytes*).

Nestas linhas foi avaliada actividade do checkpoint mitótico através da análise da resposta das células à exposição a um fármaco anti-mitótico, o nocodazole, verificando-se que as linhas SCC, quando expostas por períodos prolongados ao fármaco apresentam um baixo índice mitótico revelando-se assim incapazes de sustentar uma paragem prolongada em mitose.

As alterações moleculares subjacentes a esta deficiência na actividade do checkpoint mitótico foram avaliadas através de estudos de expressão de genes do checkpoint mitótico. Verificou-se que os genes codificantes para as proteínas do checkpoint (Mad2, Bub1, BubR1, Bub3 e Cdc20) encontram-se sobre-expressos nas linhas SCC em estudo. Verificou-se também a existência de variações na expressão do gene codificante da proteína Chfr, entre as linhas celulares tumorais em estudo. Na linha celular tumoral SCC09 este gene é sobre-expresso, enquanto, na linha celular tumoral SCC04 se encontra sub-expresso. Na linha celular tumoral SCC25, a alteração na expressão do gene, Chfr, não é significativa, comparativamente à linha controlo.

Assim, os resultados obtidos demonstram que as linhas celulares tumorais SCC09 e SCC04 apresentam uma actividade reduzida do checkpoint mitótico, bem como, alterações na expressão dos genes envolvidos na via de sinalização do checkpoint, sugerindo uma relação de causa-efeito.

Chromosomal instability is a common feature in oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and it is thought to be associated with defects in mitotic checkpoint, a crucial mechanism for the proper segregation of chromosomes during cell division. It has been suggested that changes in the expression of regulatory proteins of this mechanism contribute to the aneuploidy that is commonly observed in cancer cells.

Taking into account the need to solidify and complement previous results, this study aimed at analyzing, at the molecular and functional levels, the spindle checkpoint activity in SCC04 and SCC09 tumor cell lines, using HOK (*Human Oral Keratinocytes*) as a control, since they constitute the normal, primary cell line of oral human keratinocytes.

In these cell lines, the mitotic checkpoint activity was evaluated through analysis of their response to the exposure to nocodazole, an anti-mitotic drug. SCC lines, when exposed for prolonged periods to the drug, have a low mitotic index, thus revealing that they are unable to sustain a prolonged mitotic arrest.

The molecular changes underlying this mitotic checkpoint inefficiency were analyzed through gene expression studies. Genes encoding for checkpoint proteins Mad2, Bub1, BubR1, Bub3 and Cdc20 were shown to be overexpressed in the SCC lines studied. Also, the expression of CHFR encoding gene was shown to be variable among the tumour cell lines. In SCC09 cell line, it is overexpressed, whereas in SCC04 is it underexpressed. In SCC25 cell line, the change in its expression was not significantly different from the control.

Thus, the results show that tumor cell lines SCC09 and SCC04 have a decreased activity of the mitotic checkpoint, which may be partially explained by the altered expression of genes involved in the mitotic checkpoint signaling pathway.

II. Introdução

Ciclo celular

O ciclo celular é o período compreendido entre a formação de uma célula e sua divisão em duas células filhas que, posteriormente, repetirão o ciclo. Uma nova célula tem sempre origem numa célula já existente. Evidentemente nem todas as células cumprem esse ciclo de vida, ou porque nunca se dividem (por exemplo, células nervosas) ou porque podem morrer acidentalmente antes de começarem o ciclo (Azevedo, 2002; Bruce Alberts, 2002).

Tratando-se de um processo vital para o desenvolvimento de um organismo, é de grande interesse científico o estudo do ciclo celular e dos mecanismos nele envolvidos, para além das suas implicações práticas no campo da saúde humana.

O ciclo celular pode ser dividido em interfase e mitose (Vermeulen *et al.*, 2003)(Figura 1).

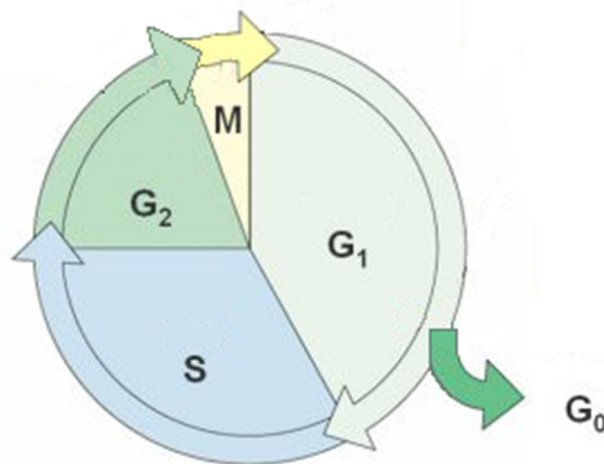


Figura 1: Representação esquemática do ciclo celular. O ciclo celular de uma célula somática divide-se em interfase (G_1 , S e G_2) e mitose (M). A fase G_0 representa a fase quiescente da célula (Adaptado de (Heuvel, 2005).

Interfase. As várias etapas da interfase denominam-se de fase G1, fase S (síntese) e fase G2 (Vermeulen *et al.*, 2003) (figura 1). A primeira etapa da interfase inicia-se no final da divisão celular anterior e estende-se até ao início da duplicação do DNA. Este período caracteriza-se por uma intensa síntese de RNA e de proteínas, com grande aumento do volume citoplasmático, que proporciona o crescimento da célula. A fase S, etapa que é sucedida pela fase G2 e antecedida pela fase G1, é responsável por garantir que as células-filhas recebem a mesma informação genética que determina as suas características. Nesta fase, ocorre duplicação da informação genética, bem como a duplicação dos centríolos e dos centrossomas. Na fase G2, inicia-se a produção de proteínas e componentes do fuso que, juntos, formarão o fuso mitótico. A célula completa o crescimento (síntese de RNA e outras proteínas) preparando-se para a mitose (Schafer, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003).

Mitose. A mitose é o processo de divisão celular pelo qual uma célula eucariótica origina duas células-filhas, cada uma com número de cromossomas igual ao seu. No final da década de 1980, comprovou-se que os mecanismos moleculares básicos da mitose são fundamentalmente os mesmos para todas as células eucarióticas (Zimmerman W. , 2000). Assim, os estudos destes mecanismos assumem grande relevância. A mitose é um processo contínuo; no entanto, é possível dividi-la em fases, o que facilita o seu estudo (Nasmyth, 1996; Zimmerman W. , 2000). As fases da mitose são: profase, prometafase, metafase, anafase e telofase (figura 3). Durante a profase, os cromossomas vão-se condensando no interior do núcleo, tornando-se mais visíveis e individualizados. A progressiva condensação cromossómica acarreta diminuição na produção de substâncias que compõem os nucléolos (que vão gradualmente desaparecendo) (Nasmyth, 1996; Cheeseman & Desai, 2008). Na prometafase, a membrana nuclear desintegra-se e os cromossomas condensados dispersam-se na região central do citoplasma. No decorrer da mesma, os centríolos vão-se afastando, dando origem a um complexo denominado de fuso mitótico (Nicklas RB, 1995; Kops *et al.*, 2005).

Cada cromossoma prometafásico ou metafásico é constituído por dois cromatídeos irmãos, unidos entre si por uma região de constrição denominada centrómero. Na região centromérica, distinguem-se ainda os cinetocoros, duas regiões proteicas, em posições opostas, que interagem com os microtúbulos que compõem o fuso mitótico (Figura 2) (Azevedo, 2002).

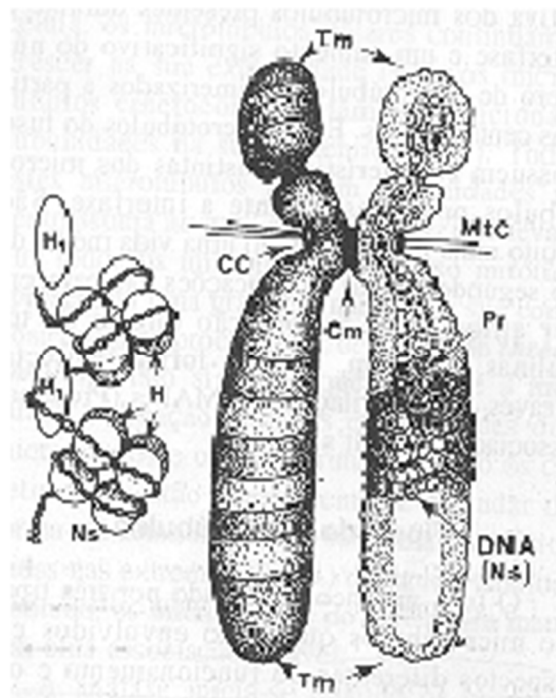


Figura 2: Representação esquemática de um cromossoma metafásico com dois cromatídeos irmãos interligados por um centrómero (Cm). Nas respectivas regiões dos cinetocoros (CC), ligam-se os microtúbulos cinetocorianos (MtC). Na esquematização mais reduzida, na lateral esquerda, apresenta-se uma porção de DNA nucleossômico (Ns) que forma os cromatídeos e respectivas histonas (H). Os telómeros (Tm) encontram-se também representados, bem como as proteínas esqueléticas (Pr). (Adaptado de (Azevedo, 2002)

Na metafase, os cinetocoros interagem com os microtúbulos do fuso, permitindo a ligação dos cromossomas ao mesmo. A tensão gerada nos microtúbulos faz com que os cromossomas permaneçam temporariamente “estacionados” na região equatorial da célula – placa metafásica (Nasmyth, 1996; Zimmerman W. , 2000). Posteriormente, na anafase, os centrómeros sofrem uma clivagem, ocorrendo separação dos cromatídeos irmãos. Os microtúbulos do fuso mitótico vão-se encurtando e arrastando consigo um cromatídeo, sendo que os cromatídeos irmãos, quando separados, migram em direcção a pólos opostos. Durante a telofase, os cromossomas, já em pólos opostos da célula,

descompactam-se e tornam a produzir nucléolos. Dá-se o aparecimento da membrana celular, que irá rodear cada um dos dois núcleos recém-formados, contendo conjuntos idênticos de cromossomas, e ocorre a divisão do citoplasma – citocinese. A citocinese tem início na anafase, depois de terminada a cariocinese (divisão do núcleo) e após a separação dos cromátídeos irmãos, inerente à normal prossecução do ciclo celular (Zimmerman W. , 2000).

A citocinese é um processo que depende da formação de um anel contráctil, estrutura formada por filamentos de actina e miosina II, responsável pela produção da força que determina a divisão da membrana plasmática (Azevedo, 2002).

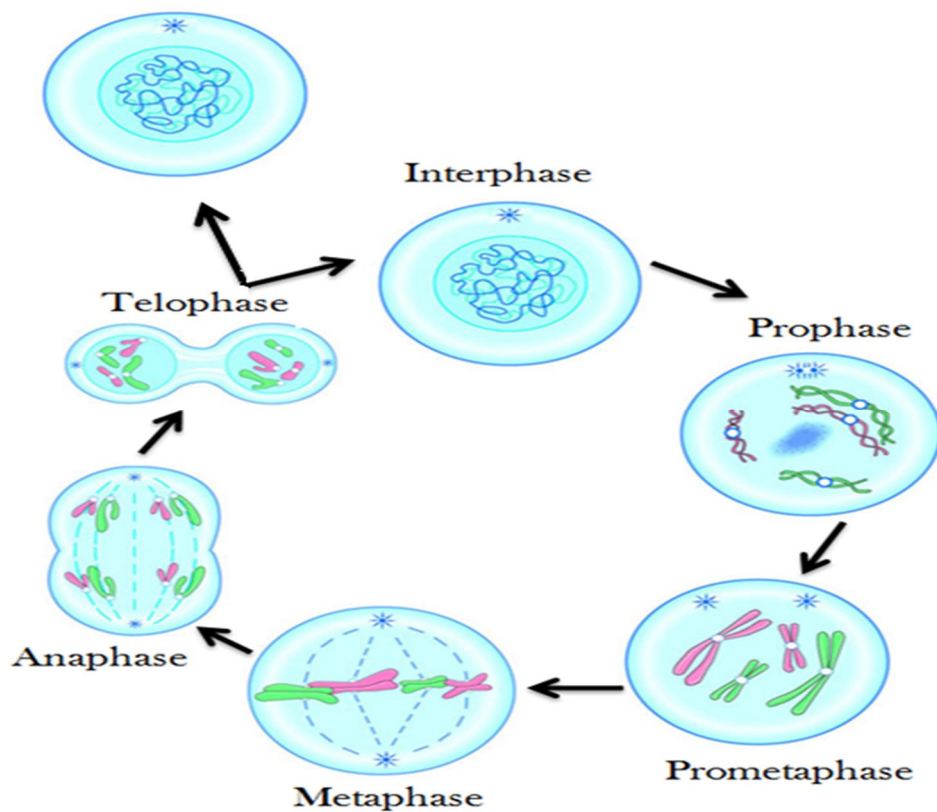


Figura 3: Esquema representativo das fases da mitose (profase, prometafase, metafase, anafase e telofase). Os círculos a azul, em forma de estrela, representam os cinetocoros, enquanto as linhas azuis a tracejado representam os microtúbulos (Adaptado de (Kops *et al.*, 2005; Cheeseman & Desai, 2008).

Regulação do ciclo celular

Os mecanismos de regulação do ciclo celular asseguram a ordenação e a correcta execução de todos os eventos do mesmo. Os sinais externos e a informação intrínseca da célula, em conjunto, determinam a entrada da célula no ciclo celular. Todo o ciclo celular é controlado pela maquinaria interna; os sinais externos interferem na altura em que a célula dá entrada no ciclo celular. A progressão da célula em mitose é determinada pela activação ou inactivação das cinases, Cdk's (*Cyclin-dependent kinases*) (Sullivan & Morgan, 2007).

As Cdk's são proteínas cinases de treonina (Thr) e serina (Ser) que requerem a associação com uma subunidade das ciclinas, proteínas de expressão cíclica essenciais ao controlo dos diversos fenómenos do ciclo celular, para sua activação ou inibição. As ciclinas, consoante os seus níveis de expressão e a ligação às Cdk, induzem a duplicação dos centrossomas e DNA durante a interfase (Heuvel, 2005). Existem vários tipos de ciclinas: a ciclina E suporta a replicação de DNA e a duplicação dos centrossomas; a ciclina A suporta a replicação de DNA, a duplicação dos centrossomas e a mitose; a ciclina B suporta apenas a mitose (Murray, 2004). Quando os nutrientes e factores de crescimento determinam a entrada da célula na divisão celular – fase G1 – as ciclinas expressas e necessárias para a progressão da célula no ciclo são as ciclinas D e E. A ciclina D é expressa para posterior expressão das ciclinas E e A (Murray, 2004). A ciclina D tem um papel crucial na regulação da resposta a factores de crescimento e proliferação; alterações na sua expressão (sobre ou subexpressão) podem induzir o aparecimento de tumores. Assim sendo, consoante a fase do ciclo celular em que a célula se encontra, predomina a actividade de diferentes Cdk's (figura 4).

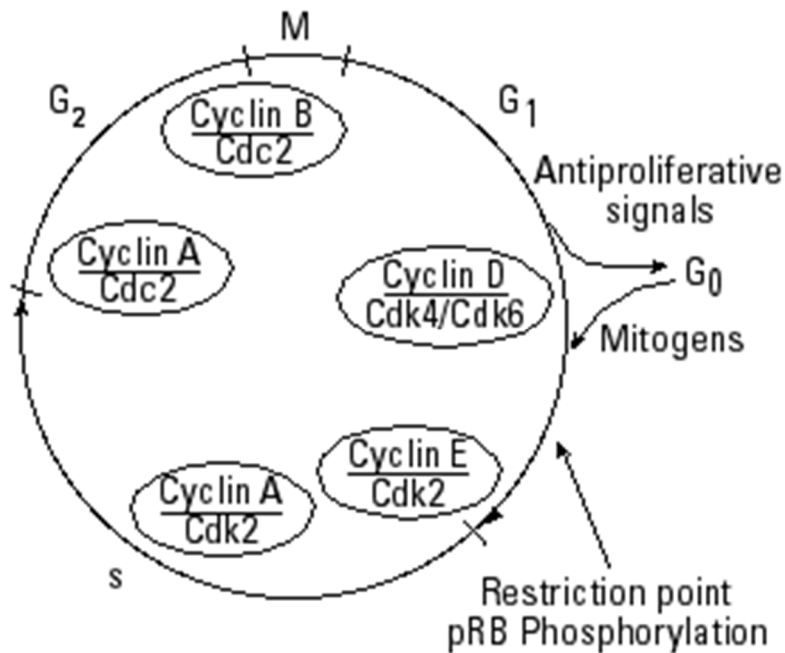


Figura 4: Representação esquemática da actividade dos diferentes complexos ciclinas/Cdk's ao longo do ciclo celular. Após sinais mitogénicos, a célula entra no ciclo celular, associando-se a ciclina D à Cdk-4 e Cdk-6. A actividade deste complexo induz a fosforilação da pRb (proteína do retinoblastoma). A expressão e activação do complexo ciclina E/Cdk-2 também é necessária para esta actividade. Nas fases S e G₂, é necessária a ciclina A, que se associa a duas Cdk's, a Cdk-2 e a Cdk-1 (também conhecida por Cdc 2 ou Cdc 28). Durante a transição G₂/M, actua o complexo Cdc 2/ciclina B (Retirado de (Shackelford RE, 1999).

O ciclo celular é controlado a diversos níveis e é alvo de regulação muito apertada por parte das Cdk's. Estas, por sua vez, vêm a sua actividade dependente da expressão e destruição controladas das ciclinas, da activação e inibição da sua fosforilação e desfosforilação e da expressão e destruição de proteínas inibitórias que se associam aos complexos Cdk's/ciclinas (Heuvel, 2005).

Checkpoints do ciclo celular

Durante o ciclo celular, a célula atravessa uma série de eventos sequenciais, sendo que cada passo tem de ser completado antes de o seguinte ter início. Este modo de progressão do ciclo celular é alcançado de duas maneiras: ou a etapa seguinte requer um produto da etapa anterior para o seu início ou actua um mecanismo regulador de *feedback*, que assegura que a etapa subsequente do ciclo celular não é iniciada antes que um evento crucial tenha sido completado correctamente. No caso das células eucarióticas, estas desenvolveram um mecanismo de controlo de qualidade chamado de checkpoint que monitoriza a correcta execução de um determinado evento do ciclo celular. Estão descritos 2 tipos de checkpoint: o checkpoint de dano do DNA e correcta replicação, que está apto a bloquear o ciclo celular nas fases G₁, S e G₂, e o checkpoint mitótico (*mitotic checkpoint*), descrito pela primeira vez em 1991 (Hoyt *et al.*, 1991; Li & Murray, 1991), que monitoriza a ligação dos cromossomas aos microtúbulos, assim como a tensão estabelecida ao longo dos mesmos durante a mitose (Vermeulen *et al.*, 2003).

Quanto ao checkpoint das fases G₁ e S, sabe-se que é activado em resposta a danos de DNA ou incorrecta replicação do mesmo, respectivamente. A sua activação depende da acção do produto do gene p53 (gene supressor tumoral), que impede a transcrição da proteína, não havendo progressão do ciclo. O checkpoint da fase G₂ suprime a activação da ciclina B/Cdc 2 (Shackelford RE, 1999; Murray, 2004). Este ponto de controlo impede a entrada na célula em mitose enquanto persistirem danos ou DNA por replicar; na sua regulação, intervém a proteína ligase da ubiquitina, a Chfr (Russell, 1995; Gong, 2004).

A Chfr regula processos de checkpoint mitótico durante a profase tardia (prometáfase), controlando a condensação e a ruptura do invólucro nuclear e impedindo a progressão da célula no ciclo, se for caso disso, durante o stress mitótico. Tem actividade de ubiquitina ligase, marcando as proteínas para degradação no proteossoma. A regulação destes eventos pela Chfr permite manter a estabilidade genómica, activando mecanismos de reparação e de protecção cromossómica e impedindo anomalias cromossómicas (Kang, Dougmin *et al* 2002; (Privette & Petty, 2008)

Checkpoint mitótico

O checkpoint mitótico actua na monitorização de um evento crucial, a transição de metafase para a anafase. Consiste em 3 elementos essenciais, os sensores que monitorizam os defeitos, os sinais de transdução e as proteínas alvo e efectoras. No seu conjunto, estes componentes actuam assegurando a segregação equitativa de cromossomas e evitando, deste modo a sua distribuição desigual (Hardwick, 2006). Para que a célula possa entrar na anafase, os microtúbulos devem estar ligados de forma correcta aos cinetocoros e os cromossomas correctamente orientados na placa equatorial. O checkpoint mitótico é, portanto, essencial para a verificação do correcto alinhamento e segregação dos cromossomas (Sluder G, 1994; Lu Y, 2009).

O checkpoint mitótico actua através de duas principais famílias de proteínas, a família Mad (*mitotic arrest deficient*), composta, nas leveduras, por Mad1, Mad2 e Mad3, e a família Bub (*budding uninhibited by benzimidazole*), composta por Bub1, BubR1 (ou Mad3 nas leveduras) e Bub3. A Mad2, pequena proteína composta por 205 aminoácidos e codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossoma 4q27, é encontrada, em grandes quantidades, associada aos cinetocoros não ligados aos microtúbulos durante a prometáfase (Shackelford RE, 1999; Christopher B. O'Connell, 2008). A Mad2 é uma proteína que adopta duas formas nativas diferentes, a forma aberta (O-Mad2) e a forma fechada (C-Mad2) (Luo & Yu, 2008). A interacção entre a Mad2 e outros componentes adicionais do checkpoint, com os cinetocoros não ligados, permite o bloqueio do início da anafase, prevenindo a segregação cromossómica desigual. No que diz respeito à família Bub, destaca-se a Bub1, uma proteína cinase codificada pelo gene de mesmo nome localizado no cromossoma 2q12-14. Estas proteínas (Mad2 e Bub1), em conjunto com a Bub3 e a BubR1, formam o complexo MCC (*mitotic checkpoint complex*). Este complexo inibe a Cdc20, um activador do complexo promotor da anafase APC-C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), retardando assim o início da anafase (Bharadwaj & Yu, 2000).

Estrutura do fuso mitótico

Designa-se de fuso mitótico a estrutura dinâmica que se forma durante a mitose, fundamentalmente constituída por microtúbulos e centrossomas.

O fuso mitótico é formado por três tipos de microtúbulos envolvidos em aspectos diferentes do funcionamento e organização do aparelho mitótico. Por possuírem nas suas extremidades diferentes componentes, exibem comportamentos também diferentes e encontram-se associados a processos distintos da divisão celular. Os microtúbulos polares são responsáveis, durante o período inicial da formação do fuso, pela interacção com as proteínas que estabelecem pontes entre os microtúbulos provenientes dos dois pólos, estabilizando o fuso. Os microtúbulos cinetocorianos estão envolvidos na organização da placa equatorial e, posteriormente, na segregação dos cromatídeos. Os microtúbulos astrais crescem em direcção ao córtex da célula, direcção oposta àquela segundo a qual se organiza o fuso (Azevedo, 2002).

A formação do fuso inicia-se na prometáfase e completa-se na metafase, assumindo especial papel na segregação cromossómica (Tanaka & Desai, 2008). Posteriormente, sofre desagregação e dissipando-se a sua estrutura durante a anáfase (Azevedo, 2002).

Uma vez que, a ligação correcta de todos os cromossomas ao fuso mitótico, durante a prometáfase, não acontece de forma instantânea, as células requerem tempo para completar a reunião de todos os cromossomas na placa metafásica (figura 5).

Para garantir a possibilidade de migração dos cromossomas para pólos opostos da célula, é fundamental a interacção entre os cinetocoros e os microtúbulos (Joglekar *et al.*, 2006; Cheeseman & Desai, 2008). A estabilidade desta interacção permite controlar os movimentos dos cromossomas durante a divisão celular. Os cinetocoros facilitam a ligação de cada cromossoma aos microtúbulos derivados de ambos os pólos – ligação bipolar –, garantindo a igual segregação do material genético (Straight *et al.*, 1997; Christopher B. O'Connell, 2008) (figura 5). Quando ocorrem ligações erradas dos cinetocoros aos microtúbulos, estas são detectadas devido ao tipo de tensão que é ou não gerada (Ault and Rieder 1992; (Christopher B. O'Connell, 2008), e a célula procura corrigir esta situação. Um dos factores determinantes para promover a ligação bipolar ou a bi-orientação é a proteína Aurora B, que quebra a ligação que se encontra mal estabelecida de forma a que cada cromatídeo do mesmo cromossoma se ligue a um cinetocoro do pólo oposto para uma correcta segregação do material genético (Pinsky &

Biggins, 2005; Tanaka & Desai, 2008) (figura 5).

Durante a metafase, nas células somáticas, os microtúbulos do fuso são organizados numa estrutura fusiforme e simétrica. Os cromossomas, nesta fase, já devem encontrar-se alinhados ao longo da placa metafásica (Tanaka & Desai, 2008).

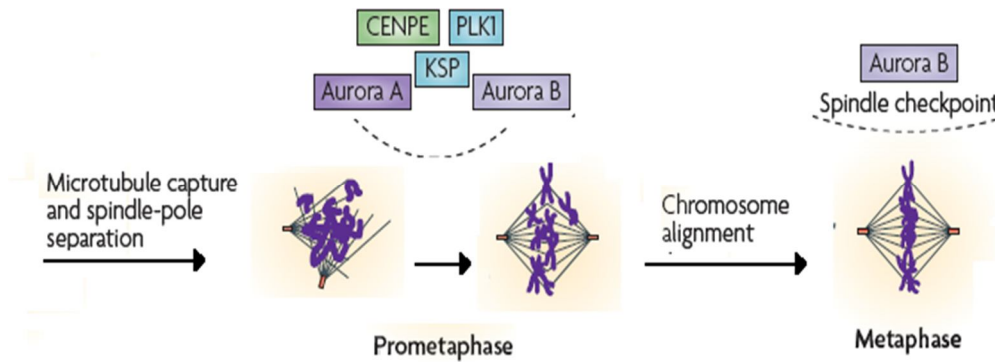


Figura 5: Eventos responsáveis pelo alinhamento dos cromossomas desde a prometáfase até à metafase. Os cromossomas são alinhados até constituírem a placa metafásica através de componentes cinetocorianos, Aurora A, CENPE, PLK1 e Aurora B. A interacção entre estes motores proteicos e os microtúbulos produz a estabilidade necessária para a correcta segregação cromossómica (Adaptado de Jackson, Jeffrey R. *et al* 2007).

Foi demonstrado que o alinhamento dos cromossomas na placa metafásica depende de várias proteínas cinetocorianas conhecidas por actuar em diferentes etapas do ciclo, e que, por isso, variam a sua concentração nos cinetocoros durante a mitose. A capacidade de deter a progressão mitótica durante o alinhamento cromossómico depende da formação de vários complexos proteicos, o que reflecte a existência de uma cascata de sinalização complexa e altamente regulada (Nicklas RB, 1995; Cheeseman & Desai, 2008) (figura 6). De entre várias proteínas, estão presentes as proteínas ZW10 (*Zeste White 10*), o complexo RZZ (Zw 10 – Rod (*Rough Deal*) – Zwilch), que é necessário para o encaminhamento da dineína para os cinetocoros, o complexo Ndc80, que actua na ligação entre o cinetocoro e o microtúbulo (May *et al* 2006), as proteínas MAPK (*mitogen activated protein kinases*) (Karess, 2005), Mps1 e Aurora B (responsável pela formação de ligações estáveis) (Torras-Llort *et al.*, 2009). As posições relativas destas proteínas não estão completamente claras, tratando-se de um mecanismo de controlo cuja base molecular não é ainda completamente conhecida (Ciferri *et al.*, 2007; Cheeseman & Desai, 2008) (figura 6).

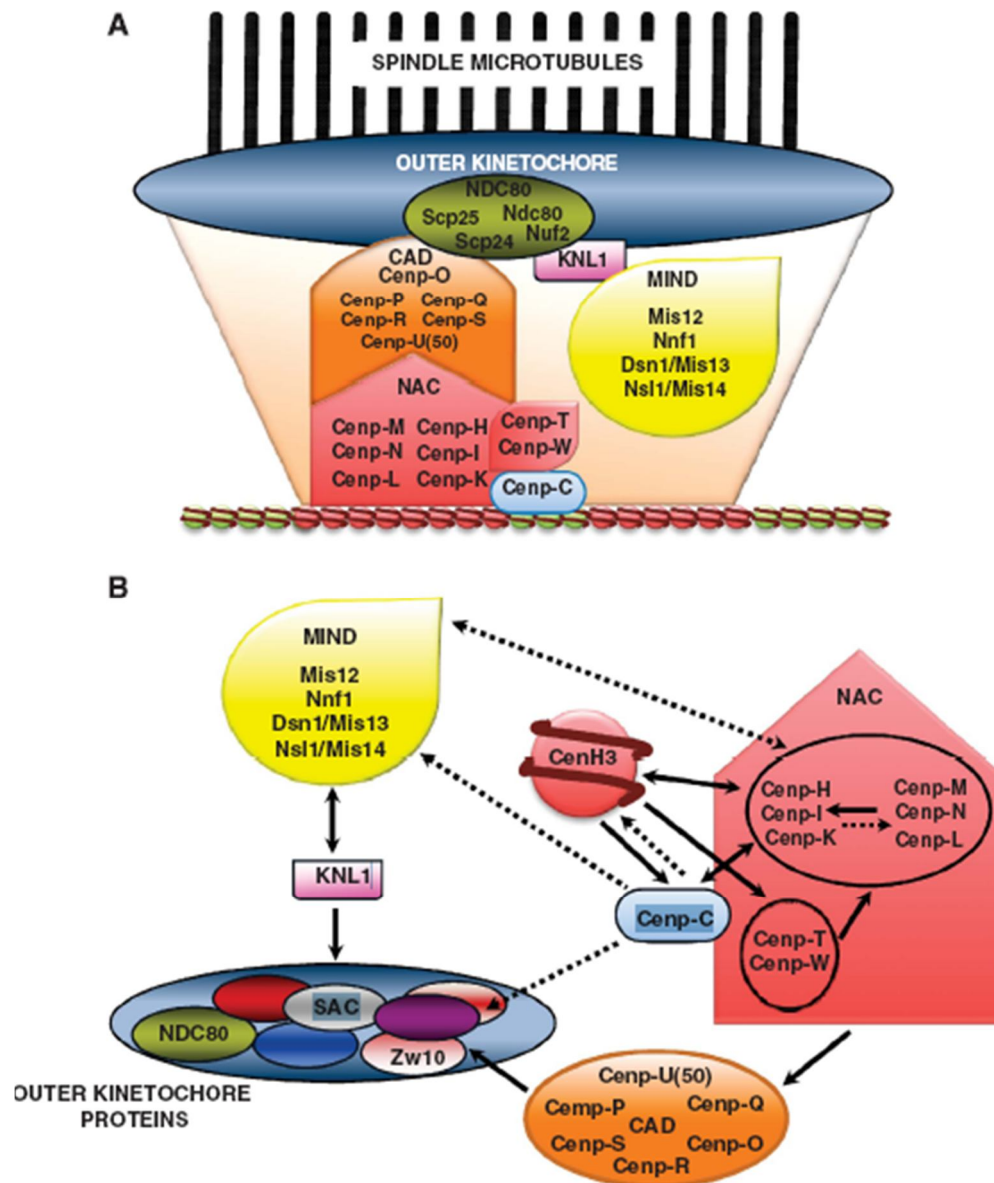


Figura 6: Representação esquemática do cinetocoro e complexos proteicos associados. (A) Vários complexos proteicos que actuam nas diferentes etapas do ciclo, destacando-se o complexo Ndc80. (B) A CENP-A (CenH3) é essencial para desencadear um conjunto de interações no cinetocoro. As interações possíveis mas ainda não confirmadas encontram-se representadas pelas setas a tracejado (Torras-Llort *et al.*, 2009)

Mecanismo de acção do checkpoint

Quando todos os cromossomas se ligam aos microtúbulos de pólos opostos no início da metafase, dá-se a activação do complexo APC/C – Cdc20 para haver progressão para anafase, que implica degradação da ciclina B, destruição da securina (proteína que inibe a separase, enzima que cliva as coesinas que mantêm os cromatídeos irmãos unidos) e, desta forma, separação dos cromatídeos irmãos (figura 7) (Kops *et al.*, 2005; MORROW *et al.*, 2005).

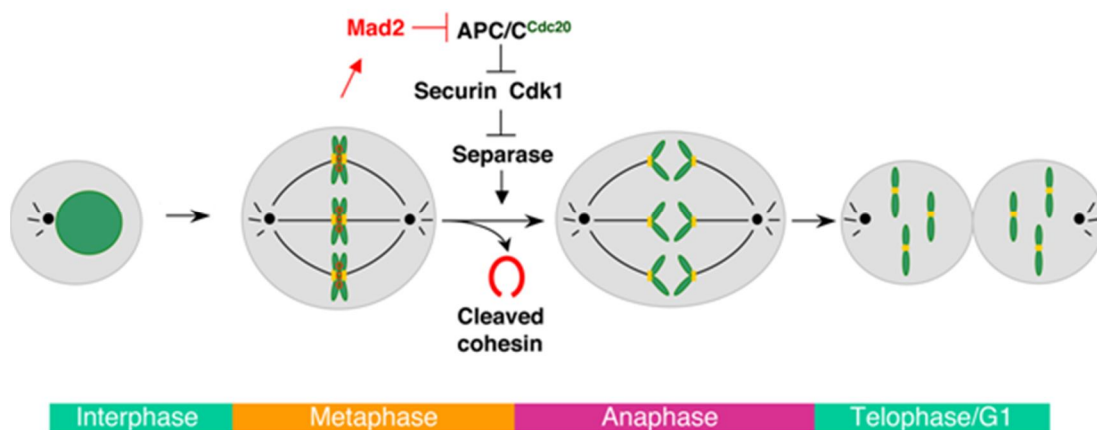


Figura 7: Esquema representativo da interacção entre a proteína Mad2 e o complexo APC/C. O correcto alinhamento dos cromossomas permite a progressão da célula no ciclo celular por indução da dissociação da proteína Mad2, que permite a activação do complexo APC/C (Adaptado de (Luo & Yu, 2008).

Quando falha alguma das ligações dos microtúbulos aos cinetocoros (quer por ligação incorrecta, quer por falta da mesma), o checkpoint mitótico é activado por um sinal produzido pela falta de tensão adequada, emitido pelo cinetocoro não ligado. Deste sinal, resulta uma interacção molecular, através da Chfr com outras proteínas, que evita a destruição da ciclina B pelo complexo APC (Brito *et al.*, 2008).

Assim, a Chfr mantém inactiva a ciclina B1/Cdc2 no citoplasma pela ubiquitinação da PLK1 e da Aurora A, que regula a actividade da ciclina B e impede a fosforilação da Cdc25, e interage com a Mad2, regulando a sua função e localização.

Após activação da Mad2, que irá ligar-se à Cdc20 (figura 8), esta interage com a Bub1 (Shackelford RE, 1999; Luo & Yu, 2008).

A interacção com a Bub1 vai activar outras Bub's, como a Bub3 e BubR1. A BubR1 participa na inibição do APC/C, ligando-se directamente à CENP-E e com a Cdc20 por via independente da Mad2 (Shackelford RE, 1999; Bharadwaj & Yu, 2000). A Cdc20, ao estabelecer a ligação com a BubR1 e Bub3, forma o complexo MCC, que fosforila o APC, impedindo o seu funcionamento e retardando o início da anafase até que todos os cinetocoros estejam adequadamente ligados aos microtúbulos (Yu, 2002; Musacchio & Salmon, 2007).

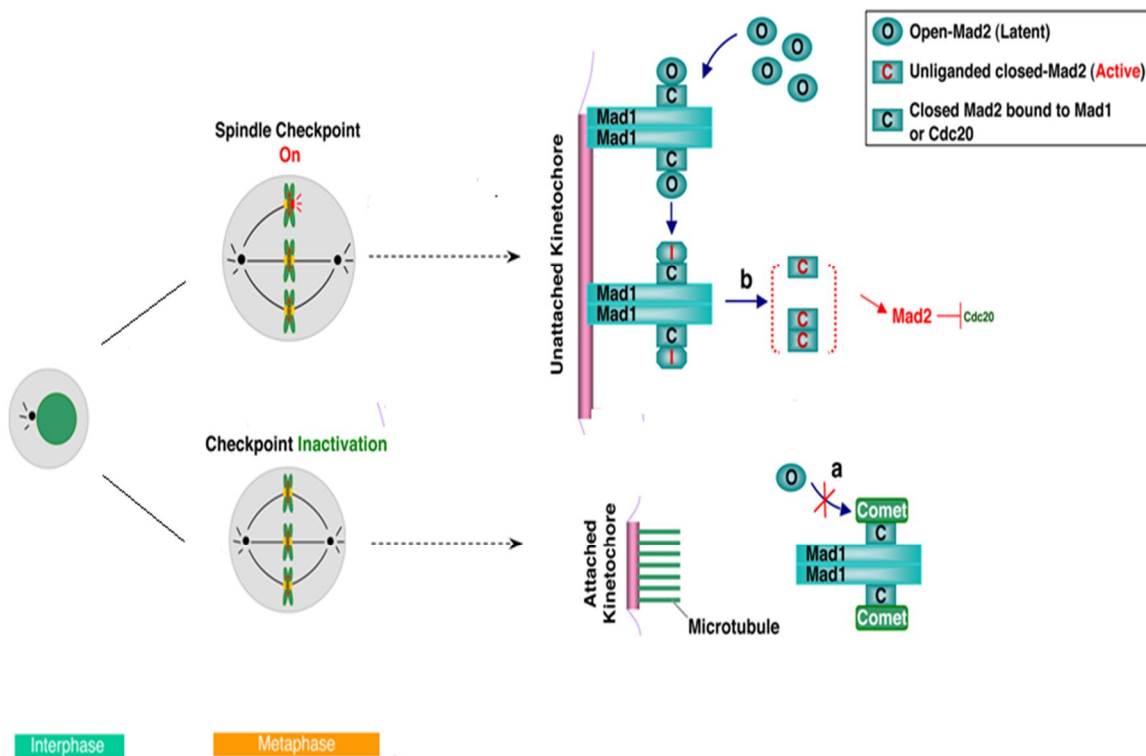


Figura 8: Representação ilustrativa da activação e inactivação do checkpoint mitótico. Encontram-se representadas as duas conformações possíveis da proteína Mad2 e a forma como actuam no complexo APC/C. A Mad1 é uma proteína que intervém na activação e inactivação da Mad2. Pensa-se que apenas uma das conformações da Mad2 se encontra nos cinetocoros, a C-Mad2, sendo esta a que estabelece ligação com a Mad1. A formação deste complexo recruta a forma aberta da Mad2 (O-Mad2). A O-Mad2, quando estabelece a ligação com o complexo, sofre alterações conformacionais, resultando em moléculas de C-Mad2 (forma activada da O-Mad2). Como esta ligação com o complexo é mais frágil, a O-Mad2, depois da alteração conformacional, liga-se à Cdc20. Para inactivação do checkpoint, o que impede o complexo Mad1-C-Mad2 de activar conformacionalmente a O-Mad2 é a p31^{comet} ou Cmt2, que actua não só no complexo Mad1-C-Mad2, impedindo a ligação da O-Mad2, como actua no complexo APC/C inibindo a actividade da Mad2 (Adaptado de (Luo & Yu, 2008).

Alguns estudos defendem que, durante a activação do checkpoint, o complexo Cdc20-BubR1-Bub3 permite a marcação da Cdc20 para ubiquitinação, e não a sua inactivação. A Cdc20 passa a ser degradada enquanto o checkpoint mitótico estiver activado; após o estabelecimento de ligações adequadas, a Cdc20, que é continuamente produzida pelo IRES (*Internal Ribosome Entry Site*), activa assim o complexo APC/C (Nilsson *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2009).

Uma vez preenchidos todos os requisitos do checkpoint mitótico, este é silenciado e a anafase tem início. As proteínas que o compõem sofrem uma redistribuição; a Mad2 deixa de ser recrutada para o cinetocoro e o MCC deixa de ser produzido. A proteína Cdc20 dissocia-se da Mad2 e da Bub1 e liga-se ao APC, activando-o. Este endereça então a securina para degradação proteolítica, o que liberta a separase para a clivagem das coesinas, proteínas que mantiveram, até então, os cromatídeos irmãos unidos (Bharadwaj & Yu, 2000; Musacchio & Salmon, 2007).

O checkpoint mitótico, a segregação cromossómica e a tumorigénese

O modo como as células tumorais adquirem a sua capacidade de crescimento e proliferação descontrolada deve-se, em parte, a mutações em genes codificantes para proteínas que regulam o ciclo celular. O cancro refere-se, na verdade, a um grupo de patologias molecularmente complexas e de difícil tratamento devido à grande variação na sensibilidade, à radiação e à quimioterapia, resultante da complexidade molecular mencionada (Privette & Petty, 2008).

Um dos principais pontos do ciclo celular onde ocorrem os defeitos moleculares responsáveis pela transformação da célula normal em célula neoplásica é precisamente o checkpoint mitótico. Pensa-se que os defeitos que ocorrem ao nível do checkpoint mitótico sejam responsáveis por aumentar a taxa de aneuploidia (número aberrante de cromossomas) que acompanha a tumorigénese. O conjunto de informações que diversos estudos permitiram recolher relaciona os defeitos moleculares com alterações nos níveis de expressão de genes e proteínas que constituem o checkpoint, bem como com alterações de importantes proteínas que constituem o fuso (MONDAL *et al.*, 2007)

Sendo o checkpoint mitótico um mecanismo de controlo da progressão da célula no ciclo celular, o comprometimento da sua actividade condiciona seriamente a sobrevivência da célula e a preservação da integridade genómica (Tao, 2005). A instabilidade genómica, MIN (instabilidade microsatélite) ou CIN (instabilidade cromossomal), encontra-se fortemente associada ao processo de tumorigénese (Lengauer, C. *et al* 1998; Grabsch, H. *et al* 2003), conducente a um fenótipo celular caracterizado por um número aberrante de cromossomas, que constitui uma característica dos tumores sólidos humanos (Hanahan & Weinberg, 2000; Jallepalli *et al.*, 2001). Assim, a falha na actuação do checkpoint seria responsável por um aumento da aneuploidia.

O tratamento de tumores explorando-se as alterações no checkpoint mitótico representa um desafio. Foram já observadas, em diferentes lesões, células neoplásicas com defeitos neste ponto de controlo, sendo que alterações na expressão de uma proteína (ou do gene dela codificante) têm normalmente implicações nas proteínas que com ela interactivam (ou na dos genes que as codificam), pelo que os alvos da terapia serão vários. De salientar que, apesar destas células apresentarem defeitos no seu

checkpoint, este terá de exibir uma funcionalidade mínima para garantir a viabilidade e a proliferação das células tumorais (Tao, 2005).

Para desenvolver uma terapia anti-tumoral otimizada para uma dada neoplasia, é necessária a elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes à ineficiência do checkpoint mitótico nas várias linhas tumorais relacionadas. Estudos demonstram que a CIN está presente em linhas tumorais como as de cancro colo-rectal e da nasofaringe. A identificação das divergências moleculares inerentes à actuação menos eficaz do checkpoint mitótico nestas linhas poderá contribuir, desta forma, para o desenvolvimento de estratégias de tratamento anti-tumoral (Cahill *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Schmidt & Medema, 2006).

Cancro da Cavidade Oral

O cancro da cavidade oral do tipo escamoso (OSCC, *Oral Squamous Cell Carcinoma*) insere-se no grupo dos tumores que atingem a cabeça e pescoço.

Pensa-se que a aquisição do fenótipo maligno por parte de células normais (queratinócitos orais) estará relacionada com o aumento dos telómeros, associado à activação da telomerase, sendo que esta será também potenciada pela instabilidade genómica resultante de mitoses catastróficas. Estas hipóteses são suportadas pela observação de uma elevada quantidade de células com aumento do número de centrossomas e com formação de múltiplos pólos, o que aumenta a probabilidade de aneuploidia nas células filhas (Brinkley, 2001; Kops *et al.*, 2005). Contudo, tais mecanismos de conversão não estão completamente estabelecidos (Neville & Day, 2002).

Estes tipos de tumor são caracterizados por uma expressiva incidência e morbidade. Apresentam uma elevada letalidade associada ao diagnóstico tardio, constituindo, por isso, uma relevante preocupação para a saúde mundial (Andreotti *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2008).

Os tipos de cancro da cavidade oral mais comuns são o cancro do lábio, do fundo da boca, das gengivas e o cancro da língua (Dobrossy, 2005). O fumo e consumo de álcool são os principais factores de risco conhecidos. Contudo, alguns estudos encontraram relação entre cancro da cavidade bucal e faringe com o exercício de determinadas ocupações, como por exemplo: pescadores e agricultores, pintores, pedreiros e condutores de veículos a motor e trabalhadores da construção civil, uma vez que estes indivíduos estão sujeitos a exposições a substâncias químicas específicas, tais como formaldeído, que têm sido apontados como potenciais factores de risco para neoplasias de cavidade oral e faringe (Andreotti *et al.*, 2006).

III. Objectivo Geral

O carcinoma de células escamosas orais (OSCC), também denominado de carcinoma epidermóide ou espinocelular, representa mais de 90% de todos os tumores malignos que afectam a cavidade oral e 38% dos tumores malignos da cabeça e pescoço. Ocupa o sexto lugar entre os mais comuns em todo o mundo (Neville *et al* 2004).

À semelhança de outros cancros, nalgumas linhas celulares do cancro da cavidade oral do tipo escamoso, foi já documentada uma deficiência na funcionalidade do checkpoint mitótico, possivelmente justificativa da instabilidade genética que se verifica nos carcinomas do grupo de tumores de cabeça e pescoço.

Conhecendo-se a importância do checkpoint mitótico como mecanismo de controlo da divisão celular, tornam-se pertinentes estudos em linhas tumorais OSCC, com o intuito de elucidar a base molecular da instabilidade cromossómica, que envolve perda e ganho de cromossomas.

Deste modo, este trabalho teve como objectivo averiguar, em duas linhas celulares de OSCC, não anteriormente estudadas, a existência de falhas na actividade do checkpoint mitótico e as alterações moleculares subjacentes. Este estudo foi desenvolvido em duas linhas celulares de OSCC, SCC04 e SCC09, usando como controlo a linha celular primária de queratinócitos orais normais (HOK, *Human Oral Keratinocytes*). Para além da inserção das linhas, SCC25 (utilizada em estudos anteriores) e HeLa, ambas linhas celulares tumorais.

IV. Material e Métodos

a. Linhas Celulares

No presente estudo, utilizaram-se cinco linhas celulares humanas, sendo quatro delas tumorais e uma normal. As linhas celulares tumorais foram SCC 25, SCC04, SCC09, estas duas últimas linhas em estudo, todas derivadas de células do carcinoma escamoso da cavidade oral (*Human Oral Squamous Cell Carcinoma - ATCC*). Como controlo no estudo, utilizou-se uma linha celular primária de queratinócitos orais (HOK, *Human Oral Keratinocytes*), por se tratar da linha celular normal com igual proveniência tecidual das linhas tumorais em estudo. Inclui-se também como controlo a linha HeLa (Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa), derivada do cancro cervical e que, por possuir um checkpoint mitótico eficaz, constitui um bom modelo de estudo.

b. Cultura de Células

Para iniciar a cultura de células, descongelou-se rapidamente a suspensão celular, contida no interior de um criotubo, em banho-maria a 37°C. Após o descongelamento, ressuspendeu-se a suspensão celular em 1ml de meio, e transferiu-se para um frasco T75 (Nunc), que se colocou numa incubadora de células (Hera Cell Incubator, Heraeus) a uma temperatura de 37°C, em atmosfera húmida, com 5% de CO₂.

Os HOK foram plaqueados em frascos tratados com Poli-L-lisina (Sciencell) para uma melhor aderência das células. Deixou-se a cultura durante 16 horas na estufa e, no dia seguinte, procedeu-se à substituição do meio de cultura por meio de cultura fresco. Os HOK foram cultivados em meio *Oral Keratinocyte Medium - OKM* (Sciencell Research Laboratories), constituído por *Basal Medium*, suplementado com *Oral Keratinocytes growth supplement - OKGS* (1%) e *Penicillin/Streptomycin solution - P/S* (1%). As células HeLa foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM* suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal, 1% de Antibiótico-Antimicótico e com 1% de Glutamax (todos da GIBCO, Invitrogen).

As células SCC 25, SCC09 e SCC04 foram cultivadas em meio DMEM-F12 (1:1) (GIBCO, Invitrogen) previamente suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (excepto as células SCC04, cujo meio foi suplementado com 20% de Soro Bovino Fetal), 1% de Antibiótico-Antimicótico (GIBCO, Invitrogen) e com

hidrocortisona (Sigma) para uma concentração final de 40 ng/ml.

c. Subcultura

A subcultura é um requisito necessário para efectuar uma correcta manutenção do crescimento das várias linhagens celulares. Procedeu-se à subcultura quando as células apresentavam 80% de confluência, quer após descongelamento, quer nas subculturas seguintes. As soluções utilizadas na cultura de células foram aquecidas em banho a 37°C, excepto as soluções para mudança dos HOK, que foram utilizadas à temperatura ambiente. Todas as manipulações inerentes à subcultura foram efectuadas em câmara de fluxo laminar. O procedimento de subcultura variou consoante a linha celular. As etapas iniciais foram comuns para todas as linhas. O meio de cultura que se encontra no frasco foi rejeitado, seguindo-se uma lavagem com tampão fosfato salino estéril (PBS, pH 7.2: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 6.4mM, K₂HPO₄, 1mM NaHPO₄), para remoção de inibidores da acção da tripsina contidos no meio de cultura. No caso das linhas SCC04, SCC25 e SCC09, foram efectuadas 2 lavagens com PBS para assegurar a remoção total do meio de cultura. Adicionou-se 1 ml de Tripsina-EDTA (GIBCO, Invitrogen) para as células SCC25, SCC09, SCC04 e HeLa e 1 ml Tripsina-EDTA (Sciencell Research Laboratories) para os HOK. Os frascos foram colocados a 37°C para promover o destacamento (durante 5 minutos no caso da linha SCC25 e HOK, 3 minutos no caso das células HeLa, 10-15 minutos para as linhas SCC09 e SCC04). Após confirmação do destacamento por observação microscópica, procedeu-se à inibição da tripsina, adicionando-se um volume do meio de cultura igual ao de tripsina. Após a recolha da suspensão celular, retirou-se 30 µl da mesma para contagem em câmara de *Neubauer* e subsequente determinação da densidade celular. Posteriormente, procedeu-se ao plaqueamento em novos frascos T25 ou T75, sendo que o número total de células variou consoante o frasco e a experiência a realizar. Por exemplo, para um T25 as células foram plaqueadas em 5 ml de meio de cultura, sendo que, o número total de células HeLa transferidas foi de $0,2 \times 10^6$, o de células SCC25 de $0,3 \times 10^6$ e o de SCC04 e SCC09 de $0,4 \times 10^6$.

Na subcultura dos HOK, recolheu-se a tripsina e colocou-se o frasco na estufa durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 1 ml solução de neutralização de tripsina *Trypsin Neutralization Solution* – TNS (Sciencell Research Laboratories). Após homogeneização, foi recolhida a solução. Por último, adicionou-se 1 ml meio de

cultura ao frasco, também recolhido em seguida. Da suspensão celular, foi retirada uma alíquota de 30 µl para contagem em câmara de *Neubauer*. Colocou-se a centrifugar a suspensão celular a 1000 rpm durante 5 minutos. Após centrifugação, ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de meio de cultura. O número total de células transferidas para um T25 foi de $0,2 \times 10^6$, num volume de meio de 5ml, em frascos tratados com Poli-L-Lisina.

d. Tratamento de frascos com Poli-L-Lisina (PLL)

A Poli-L-Lisina (Sciencell) é em componente sintético que permite uma melhor aderência das células, através da alteração das cargas do substrato da cultura. Foi descongelada em banho-maria a 37°C, adicionando-se 5 µl de PLL a 5 ml de água estéril para um frasco T25 e 15 µl de PLL a 10 ml água estéril para um T75. Deixou-se a incubar o frasco na estufa durante, pelo menos, 1 hora a 37°C.

Após remoção da solução, lavou-se o frasco duas vezes com água estéril e utilizou-se em seguida para cultura celular.

e. Determinação de índice mitótico

Com o intuito de determinar o índice mitótico, procedeu-se a três etapas principais: plaqueamento de células, sincronização G₁/S e adição do fármaco nocodazole às culturas celulares. As células foram plaqueadas em poços (discos de 40 mm, OrangeScientific) a uma densidade de $0,1 \times 10^6$ células/poço e mantidas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, adicionou-se timidina (Sigma) a uma concentração de 2 mM, deixando-se actuar durante 18-19 horas. Em seguida, efectuou-se o *release*, que consiste na lavagem com PBS (pH 7.2: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.4 mM, K₂HPO₄, 1 mM NaHPO₄), duas vezes, seguida de substituição do meio (soluções devidamente aquecidas a 37°C). Três horas após o *release*, adicionou-se nocodazole ao meio de cultura para uma concentração final 5 µM. Os poços foram incubados a 37°C durante diferentes períodos de tempo (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas). Em cada um dos períodos de exposição, as células foram observadas em microscópio de contraste de fase (Nikon Eclipse TE 2000-U), tendo sido, em cada tempo, quantificado o número de células mitóticas e de células interfásicas. A determinação do índice mitótico (IM) consistiu no cálculo da percentagem de células mitóticas relativamente ao número total de células. Para cada um dos tempos de incubação, usou-se uma cultura controlo, à qual não se adicionou nocodazole. Repetiu-se a experiência três vezes, de forma

independente, e determinou-se o índice mitótico médio para cada tempo de exposição.

f. Chromosome Spread

O *chromosome spread* consiste na exposição das células a um choque hipotónico para posterior visualização dos seus cromossomas. Após subcultura das células em frascos T25, T75 ou em poços, procedeu-se à adição de nocodazole para uma concentração final 5 μM , para enriquecimento das culturas em células mitóticas. Seguiu-se um período de incubação de 14h. Após incubação com nocodazole, procedeu-se ao *shake off* das células mitóticas e transferiu-se a suspensão celular para um tubo Falcon de 15 ou de 50 ml, consoante o volume final. As células foram em seguida submetidas a um choque hipotónico, mediante adição de água bidestilada (60% do volume da suspensão para as células HeLa e 90% para as células das linhas SCC e HOK). Após homogeneização suave, o tubo foi colocado num banho a 37°C durante 5 minutos para as células HeLa e 7 minutos para as linhas SCC e HOK. Em seguida, centrifugou-se a 1000 rpm, durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante com ajuda de uma pipeta, e as células constituintes do sedimento foram ressuspensas e fixadas em 2 mL de uma solução solução de metanol 75% e ácido acético 25%, durante 2 minutos à temperatura ambiente.

Repetiu-se a centrifugação e ressuspensão por mais duas vezes; após a terceira centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante deixando-se 100 – 200 μl , nos quais se ressuspendeu o sedimento. A suspensão celular foi então transferida para uma lâmina seca na *hotte* durante a noite, sendo-lhe adicionados, de seguida, 8 μL de Vectashield contendo 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de DAPI e cobrindo-se, por último, com uma lamela.

g. Determinação dos parâmetros mitóticos

Para cada linha celular, determinaram-se os parâmetros mitóticos (percentagem de células nas diferentes fases de mitose). Após subcultura de células em lamelas tratadas com Poli-L-Lisina, verificou-se, por microscopia de contraste de fase, que as culturas celulares se encontravam em crescimento exponencial. Lavaram-se as células em PHEM 1x (240 mM PIPES, 100 mM HEPES, 40 mM EGTA, 16 mM HgSO_4). De seguida, as células foram mergulhadas em PHEM 1x e 0,5% Triton X-100 (Sigma) durante 3 minutos. Posteriormente, lavaram-se as células em PHEM 1x e FA

(formaldeído) 4%, durante 20 minutos. Efectuou-se, uma última, uma lavagem em PBST (PBS 1x e 0,5% Triton X-100) durante 5 minutos. Por fim, adicionou-se 8 µL de Vectashield contendo 0.5 µg/ml de DAPI, e cobriu-se com uma lamela. As lamelas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon TE 2000-U) e procedeu-se à determinação do número de células em cada uma das fases da mitose (profase, prometáfase, metafase e anáfase).

h. Imunofluorescência

Procedeu-se à fixação das células às lamelas utilizando diferentes fixadores, adequados à estrutura celular que se pretendia preservar, assim como ao anticorpo a utilizar. Deste modo, as células crescidas sobre lamelas, em placas de 6 poços, foram fixadas em 2% paraformaldeído (PFA, Sigma), preparado de fresco em PBS ou, alternativamente, em metanol 100% frio.

No caso da fixação com PFA 2%, foi necessário efectuar três lavagens em PBS, durante 5 minutos, e permeabilizar com 0.2% Triton X-100 em PBS durante 5-7 minutos. De seguida, procedeu-se ao bloqueio com uma solução 10% FBS em PBS durante 30 minutos. Depois do bloqueio, incubaram-se as lamelas com o anticorpo primário diluído numa solução de FBS 5% em PBS durante 1h, à temperatura ambiente, em atmosfera húmida. De seguida, procedeu-se a três lavagens com PBST (PBST, pH 7.2: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 6.4 mM K₂HPO₄; 136 mM NaHPO₄; 0,02% Tween-20) com a duração de 5 minutos cada, e incubou-se, em seguida, anticorpo secundário durante 1h à temperatura ambiente. Por último, após três lavagens com PBS, marcou-se o DNA com DAPI 0.5 µg/ml (Sigma).

As células fixadas em metanol foram lavadas com TBS (1M Tris Cl, pH 7,4; 5 M NaCl) e permeabilizadas, em seguida, em TBS com 0,5% Triton X-100 durante 5 minutos. Posteriormente, lavou-se em TBS com 0,05% Triton X-100 (TBST) durante 1,5 minutos. O bloqueio foi efectuada em TBST e contendo 10% FBS. As soluções de anticorpos primários e de anticorpos secundários em que as células foram incubadas, foram diluídas numa solução de FBS 5% em TBST. Os tempos de incubação foram os mesmos utilizados aquando da fixação com PFA. Entre a incubação com anticorpo primário e secundário, lavou-se as células com TBST) duas vezes durante 5 minutos. Após uma lavagem final em TBS durante 5 minutos, marcou-se o DNA com DAPI 0.5 µg/ml (Sigma).

Após a fixação com PFA 2%, utilizaram-se os seguintes anticorpos: *mouse* anti-BubR1 (diluição 1:1000, Chemicon International) e *rabbit* anti- α -tubulina (diluição 1:1000, Abcam). Para os anticorpos *mouse* anti-Bub1 (diluição 1:1000, Abcam), *mouse* anti-Cdc20 (1:500, oferta de K. Helin) e *rabbit* anti- α -tubulina (diluição 1:1000, Abcam), procedeu-se previamente à fixação das células com metanol.

Os anticorpos secundários utilizados (anti-*mouse*, anti-*rabbit*, anti-*human*, e anti-*sheep* (Molecular Probes), seleccionados de acordo com a origem dos anticorpos primários, foram todos diluídos 1:1000, conjugados com Alexa Fluor® 488 ou 568 nm. As imagens de imunofluorescência foram obtidas com uma objectiva apocromática 60x num microscópio Nikon Eclipse TE 2000-U, equipado com uma câmara digital DXM1200F e controlado através do programa Nikon ACT-1. Para cada imagem, foi recolhido um plano de focagem representativo.

i. Tratamento de material laboratorial com DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*)

Para qualquer procedimento experimental em que seja necessária extracção/manipulação de RNA, dada a fragilidade e susceptibilidade deste ácido nucleico à acção de RNases, deve dispor-se de material *RNase-free*. Assim, foi preparado o volume apropriado de uma solução aquosa de DEPC 0,1% (Sigma). Após preparação da solução, o material necessário foi mergulhado completamente na solução de DEPC e incubado a 37°C durante 16 horas. Após incubação, o material foi autoclavado a 121°C, durante pelo menos 15 minutos (inactivando deste modo vestígios de DEPC). Por fim, o material foi seco a 37°C durante a noite e devidamente identificado como material para manipulação apenas de RNA, sendo manuseado com luvas e apenas em superfícies limpas com etanol. Para a extracção de RNA, para além do material tratado com DEPC, tratou-se água com DEPC.

j. Extracção de RNA

Previamente à extracção de RNA, utilizou-se uma solução de etanol 70% para pulverizar todo o material laboratorial a utilizar, e uma solução 0.5 M NaOH alternada com a de etanol para pulverizar a superfície de trabalho, sendo esta limpa periodicamente durante as diversas etapas do processo de extracção.

As células foram cultivadas em placas de Petri de 10 cm² Nunc (Nunclon Δ Surface). Após aspiração do meio de cultura, que foi rejeitado, adicionou-se 1 ml do reagente PureZOL (Bio-Rad). Depois de sucessivas pipetagens *up and down*, para permitir a disrupção das células e a completa dissociação dos complexos proteicos nucleares, os lisados repousaram 5 minutos à temperatura ambiente.

Recolheram-se os lisados para um tubo *Eppendorf*, tratado com DEPC, e adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio, agitando-se em seguida vigorosamente durante 15 segundos. Após esta agitação, os lisados permaneceram novamente 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, procedeu-se a uma centrifugação a 12000g, durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, eram visíveis três fases, sendo que a fase aquosa (que continha o RNA total) foi recolhida para um novo tubo *Eppendorf*. Adicionou-se à fase aquosa 0,5 ml de isopropanol 100% e, após mistura, deixou-se incubar durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Depois de uma segunda centrifugação a 12000g, por 10 minutos a 4°C, descartou-se o sobrenadante e, ao precipitado de RNA, foi adicionado 1 ml de etanol a 75%. Após vortexar a amostra, procedeu-se a nova centrifugação a 7500g por 5 minutos e a 4°C. Finalmente, e após rejeição do sobrenadante, deixou-se o RNA secar, sendo posteriormente ressuspendido em 50 µl de H₂O *RNase-free* (tratada com DEPC). O RNA extraído foi dividido em alíquotas de 10 µl e armazenado a -80°C. A fim de verificar a integridade do RNA, correu-se 1 µg da amostra em gel de agarose *RNase-free* 1%. Terminada a corrida, observou-se o gel sob luz UV. A determinação da concentração de RNA foi efectuada por medição espectrofotométrica da densidade óptica a um comprimento de onda de 260 nm, usando H₂O como branco.

k. Primers para Real-Time PCR

Os primers (tabela 1) foram desenhados utilizando 2 softwares: Beacon Designer 7.2 (BioRad) (forums.partselect.com/washer-repair/download-caesar-ii-5-0-aspenone-2006-crack-17039.html) e PerlPrimer versão 1.1.14 (perlprimer.sourceforge.net), e

obtidos de STABvida (Oeiras, Portugal).

Após recepção dos primers, estes foram testados por PCR. Foram realizados dois PCR's, um com o intuito de confirmar a inexistência de amplificação de DNA genómico, e um outro PCR utilizando como molde o cDNA para confirmar a especificidade e temperatura de *annealing* dos primers. Utilizou-se o kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR* com *Platinum® Taq DNA Polimerase* (Invitrogen). Cada reacção foi preparada para um volume final de 50µl. A mistura continha 1µg de RNA total, extraído a partir de células HeLa; 25µl de *Reaction Mix*; 2µl primer *forward* (100nM); 2µl primer *reverse* (100 nM); 2µl de 1xTaq polimerase e água. A reacção ocorreu no termociclador (MJ Mini™, Bio - Rad) através do programa seleccionado: um ciclo de 20 minutos a 50°C (para a síntese de cDNA) e 35 ciclos de 94°C por 15 segundos (desnaturação), 30 segundos a 60°C (*annealing*) e 72°C por 1 minuto (extensão). Correram-se 10µl dos produtos obtidos em gel de 1% agarose. Foram adquiridos, os resultados, utilizando o densitómetro GelDoc XR (Bio-Rad) e analisados utilizando o software de análise Quantity One (Bio-Rad).

Gene	Primer	Sequência oligonucleotídica	Posição de emparelhamento	Tamanho (pb)
GADPH	Forward	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTC-3'	9	101
	Reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	149	
Bub1	Forward	5'-CAAGCTAGAACCTCAGAACC-3'	421	151
	Reverse	5'-CACTCTTCGTTCCATATTTGAC-3'	571	
BubR1	Forward	5'CAGATGCGATATTTTCAGGAAGGG3'	463	171
	Reverse	5'-GCTTGGAATTGTCGGTGCTG-3'	633	
Bub3	Forward	5'-GTGTTGGTGTGGGACTTACG-3'	512	82
	Reverse	5'-GCTTAATACATAACCCTGCTTG-3'	593	
Mad2	Forward	5'-GTGGAACAACCTGAAAGATTGGT-3'	475	117
	Reverse	5'-GTCACACTCAATATCAAACCTGC-3'	591	
Cdc20	Forward	5'-CCAGAGGGTTATCAGAACAG-3'	205	117
	Reverse	5'-CCACAAGGTTTCAGGTAATAGT-3'	321	
Chfr	Forward	5'-AGACATCCTGAAGAATTACCT-3'	1671	105
	Reverse	5'-TAATCAGACAGCAGAAACACTC 3'	1775	

Tabela 1: Sequências oligonucleotídicas correspondentes a cada par de primers utilizados em ensaios de Real Time PCR, em amostras de RNA total de todas as linhas celulares em estudo.

g. Real Time PCR

O Real-Time PCR foi executado em duas etapas (*two-step qRT-PCR*): síntese de cDNA e a reacção de Real-Time PCR, propriamente dita. O cDNA foi preparado a partir do RNA total extraído, utilizando o kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad). Para todas as amostras, o RNA foi diluído, para uma concentração de 400 ng/ml.

Para cada reacção de síntese de cDNA, a mistura continha 6 µl de *iScript Reaction Mix*, 1,5 µl de *iScript Reverse Transcriptase*, 20 µl H₂O *nuclease-free* e 2,5 µl de RNA (400 ng/ml) para um volume final de 30 µl. A reacção de síntese ocorreu através do seguinte programa: 20 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C e 20 minutos a 85°C. Após a síntese, o cDNA foi guardado a -20°C.

Para a reacção do Real-Time PCR, procederam-se a três etapas principais: a diluição do cDNA, a preparação de uma mistura para cada gene a testar e a preparação de várias misturas tendo em conta a linha celular a testar. A diluição de cDNA foi realizada numa proporção de 1:10. Cada mistura de reacção era constituída por: 12,5 µl de *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), 0,25 µl de cada primer específico para o gene (*forward* e *reverse*), 10 µl de H₂O *RNAse-free* e 2 µl de cDNA.

As misturas de reacção para Real-Time PCR foram colocadas num aparelho iQ Thermal Cycler (Bio-Rad). O programa utilizado compreendeu uma desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Por último, a *melting curve* foi efectuada entre as temperaturas de 65 e 95°C, com incrementos de 0,5°C, durante 5 segundos. Utilizou-se o termociclador C1000 Thermal Cycler, acoplado ao CFX96 Real-Time PCR Detection System (ambos Bio-Rad).

No final de cada reacção, os dados foram adquiridos e analisados utilizando o *software* CFX Manager Software, versão 1.0 (Bio-Rad). O *housekeeping gene* GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi escolhido como controlo do *loading*, tendo os níveis de expressão dos genes do checkpoint mitótico sido normalizados relativamente aos de GAPDH.

Os produtos de Real-Time PCR obtidos foram posteriormente corridos em gel de agarose 1%, para verificar a intensidade do produto amplificado e comprovar a existência de único produto de amplificação.

h. Análise estatística de resultados

Os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental foram analisados recorrendo-se à probabilidade associada ao teste t-Student.

Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos para um grau de confiança de 95% e os de $p < 0.01$ estatisticamente muito significativos para um grau de confiança de 99%.

V. Resultados

As linhas celulares SCC04 e SCC09 são incapazes de sustentar a paragem em mitose sob acção do nocodazole

Com o intuito de verificar a existência de deficiências na funcionalidade do checkpoint mitótico, procedeu-se à avaliação do checkpoint mitótico nas linhas celulares do cancro da cavidade oral em estudo. Como controlo, foram utilizadas duas linhas celulares: a linha celular primária de queratinócitos orais (HOK, *Human Oral Keratinocytes*) por se tratar da linha celular normal com igual proveniência tecidual das linhas tumorais em estudo, e a linha celular HeLa por possuírem um checkpoint mitótico eficaz.

Um dos fármacos anti-mitóticos utilizados a nível experimental é o Nocodazole (NOC). O Nocodazole é um fármaco que promove a despolimerização dos microtúbulos. Em cultura de células, a despolimerização dos microtúbulos, induzida pelo Nocodazole, activa o checkpoint mitótico. Na ausência de microtúbulos polimerizados, não ocorre ligação dos cinetocoros aos mesmos nem se estabelece a subsequente tensão bipolar necessária à progressão para anafase, pelo que o ciclo celular sofre um bloqueio em prometafase como resultado da activação do checkpoint mitótico. Consequentemente, o índice mitótico (percentagem de células mitóticas em relação ao número total de células em cultura) aumenta. O prolongar da exposição ao fármaco culmina, eventualmente, na morte celular.

Com o intuito de verificar a acção do fármaco, as linhas celulares (HeLa, HOK, SCC25, SCC09 e SCC04) foram incubadas com o nocodazole e de seguida visualizadas por imunofluorescência após incubação com o anticorpo anti-tubulina para verificar a despolimerização dos microtúbulos.

Como mostra a figura 9, nas culturas controlo (sem nocodazole), é visível a estrutura dos microtúbulos organizados num fuso bipolar bem definido, nas células em mitose. Após a incubação com o Nocodazole, este exerceu efeito sobre todas as linhas. Ocorreu, conforme o esperado, despolimerização dos microtúbulos comprometendo a formação do fuso mitótico.

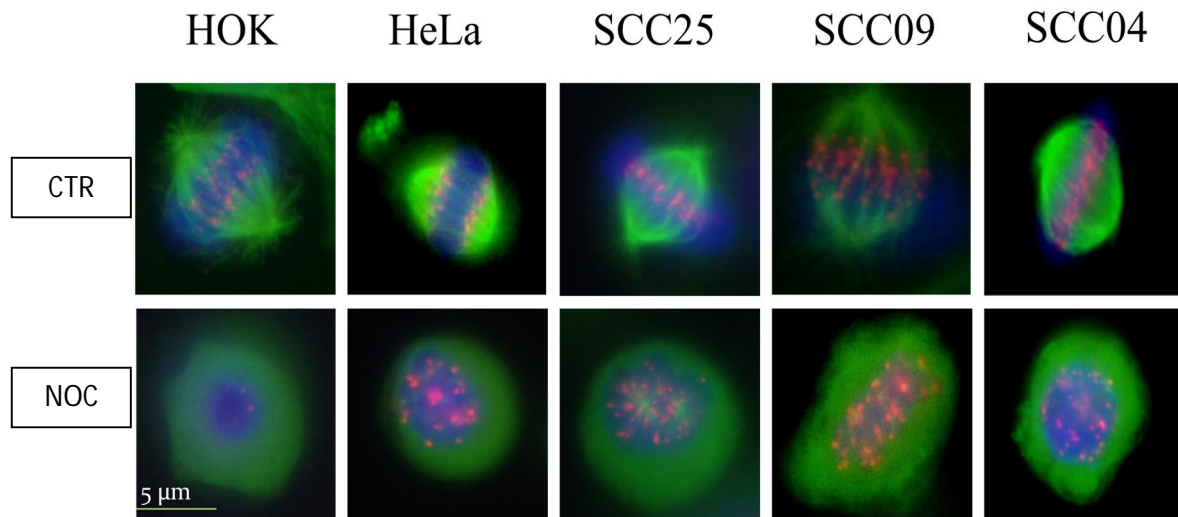


Figura 9: Verificação, por imunofluorescência, do efeito do nocodazole (NOC) nas diferentes linhas celulares em estudo. Nas linhas controlo (CTR), na ausência de nocodazole, observam-se os microtúbulos bem definidos, e a formação do fuso mitótico. Na presença de nocodazole observa-se a despolimerização dos microtúbulos, em todas as linhas celulares. O DAPI marcou a azul o DNA, a tubulina encontra-se marcada a verde, o que corresponde aos microtúbulos, e os centrómeros a vermelho.

Tendo-se verificado, que, tal como esperado, o nocodazole promove a despolimerização dos microtúbulos, em todas as linhas celulares em estudo, procedeu-se à incubação das linhas celulares, SCC09, SCC04 e HOK, com o fármaco por vários períodos (0, 12, 24, 36 e 48h), determinando-se, no final dos mesmos, os respectivos valores de índice mitótico.

Nas figuras 10 e 11, é possível verificar o estado das culturas após exposição ao nocodazole, sendo que, os valores de índice mitótico de qualquer uma das culturas em análise foram superiores aos valores das culturas controlo correspondentes (verificando-se, deste modo, uma acumulação em mitose, promovida pela activação do checkpoint mitótico). Contudo, deve salientar-se que a diferença de valores entre a situação controlo e a exposição ao nocodazole foi muito superior para a linha HeLa (que apresenta um checkpoint mitótico eficiente) e HOK linha celular primária da mesma origem que as linhas celulares do cancro da cavidade oral.

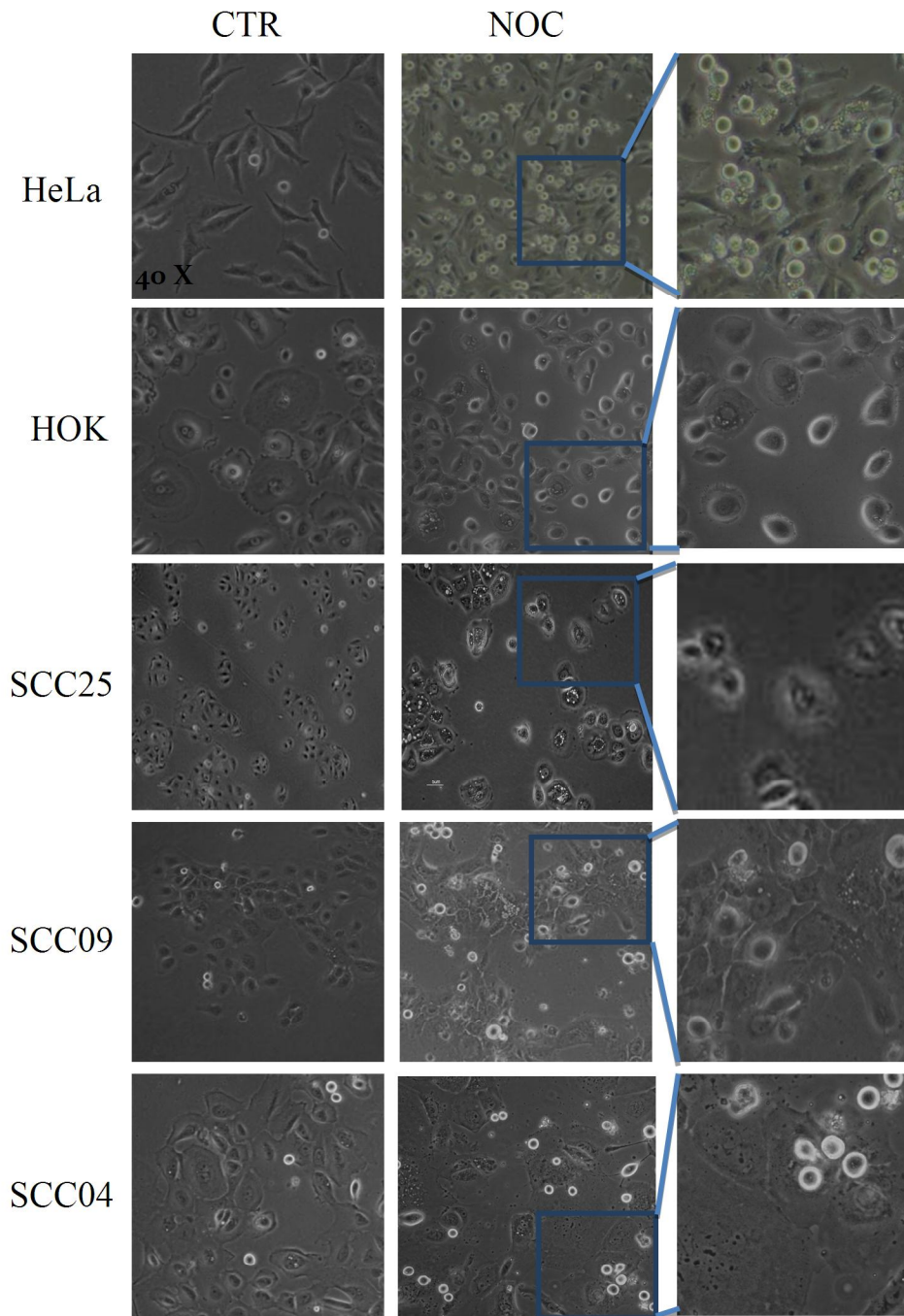


Figura 10: Imagem de microscopia de contraste de fase mostrando a resposta das linhas celulares após 24h de incubação com nocodazole. Durante a incubação com o nocodazole, numa concentração de 5 μ M, foi observado que as resposta das diversas linhas ao fármaco variava.. As células HeLa na presença de nocodazole acumulavam em mitose. Na cultura de HOK, sob acção do nocodazole, aumenta o número de células mortas e células mitóticas (células interfásicas com vacúolos). As linhas celulares tumorais (SCC25, SCC09 e SCC04) na presença de nocodazole ocorre apenas um ligeiro aumento de células mitóticas.

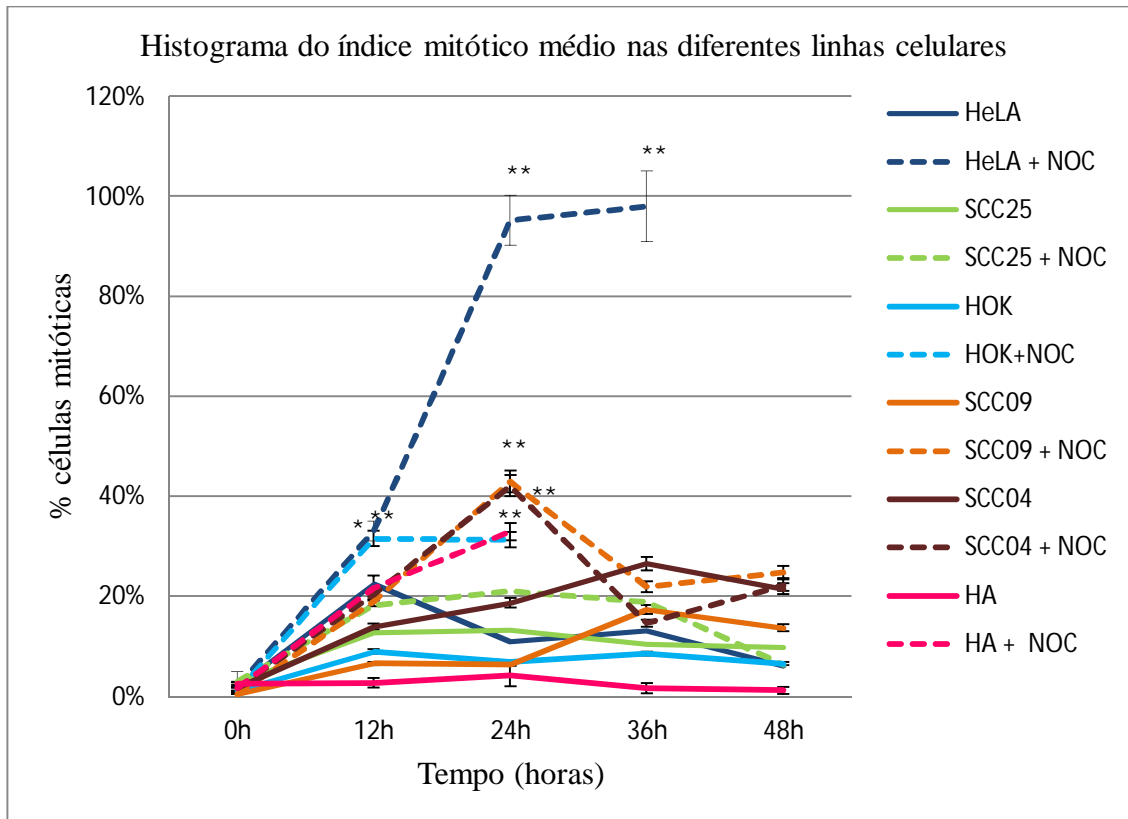


Figura 11: Índice mitótico nas diferentes linhas celulares sincronizadas, na presença e ausência do nocodazole. Os valores do índice mitótico surgem da observação das culturas por microscopia de contraste de fase. O eixo das coordenadas corresponde à percentagem de células mitóticas e o eixo das ordenadas ao tempo em horas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Segundo a figura 11, na linha celular HeLa na presença do nocodazole observa-se uma acumulação de células mitóticas ao longo do tempo de exposição, sendo que 90% das células encontra em mitose após 24 horas de exposição ao fármaco. Na linha celular SCC25 observou-se que a incubação com nocodazole promove o aumento do número de células mitóticas relativamente ao controlo (linha celular SCC25 sem nocodazole), no entanto o valor máximo atingido é apenas de 25%. Nas outras linhas celulares, SCC04 e SCC09 sob acção do nocodazole foi possível verificar que há um aumento de células em mitose e por isso, um aumento do índice mitótico, atingindo o seu pico máximo às 24h, ao qual corresponde um valor de 49% para a linha celular SCC09 e 42% para a linha celular SCC04.

Para a linha celular HOK o aumento do índice mitótico é mais abrupto nas primeiras 12h atingindo valores de 31%. É possível verificar que entre as 12h e as 24h ocorre uma certa estabilização de valores do índice mitótico. A partir das 12h já se

observavam células mortas nesta cultura, sendo que o número aumentava ao longo do tempo.

Nas culturas de SCC04 e SCC09 poucas células mortas foram visualizadas na presença do nocodazole. Verificou-se uma diminuição do índice mitótico às 36h (cerca de 18% para ambas) e um aumento do índice mitótico às 48h (26% para as SCC09 e 29% para as SCC04), estes valores aliados à presença de células em interfase nestas culturas celulares indiciavam sinais de progressão na mitose.

As linhas SCC09 e SCC04 apresentam cromátídeos separados após 12 horas de incubação com nocodazole

Após constatação de que as culturas SCC09 e SCC04 progridem no ciclo celular mesmo na presença de nocodazole, realizaram-se ensaios de *chromosome spread* no sentido de analisar o grau de união dos cromátídeos irmãos das células mitóticas após incubação com o fármaco anti-mitótico. A observação de cromátídeos separados em culturas incubadas com nocodazole é indicadora da saída prematura da mitose desta cultura e, portanto, da sua incapacidade de sustentar a paragem em mitose imposta pelo fármaco. Nestes ensaios, foram analisadas células nas condições utilizadas para a contagem do IM, sendo recolhidas às 12h de incubação (tempo necessário para que as células entrem em mitose) e posteriormente montadas em DAPI. Estes ensaios permitiram-nos verificar que os cromátídeos de várias células mitóticas provenientes das culturas SCC09 e SCC04 se encontram separados, resposta semelhante à da linha SCC25 e contrária das culturas de HeLa e HOK (figura 12).

Embora preliminar como resultado, uma vez que carece de uma análise quantitativa, esta observação vem reforçar os resultados obtidos nas contagens do índice mitótico. A separação de cromátídeos irmãos, ocorrida mesmo na ausência de um fuso mitótico e, portanto, de ligações cinetocoro-microtúbulo e de tensão bipolar, explica a progressão no ciclo celular e a diminuição do índice mitótico verificada após incubação prolongada com nocodazole. Do mesmo modo, reflecte a presença de um checkpoint mitótico ineficiente nas linhas SCC09 e SCC04, à semelhança do que havia anteriormente sido verificado para a linha SCC25.

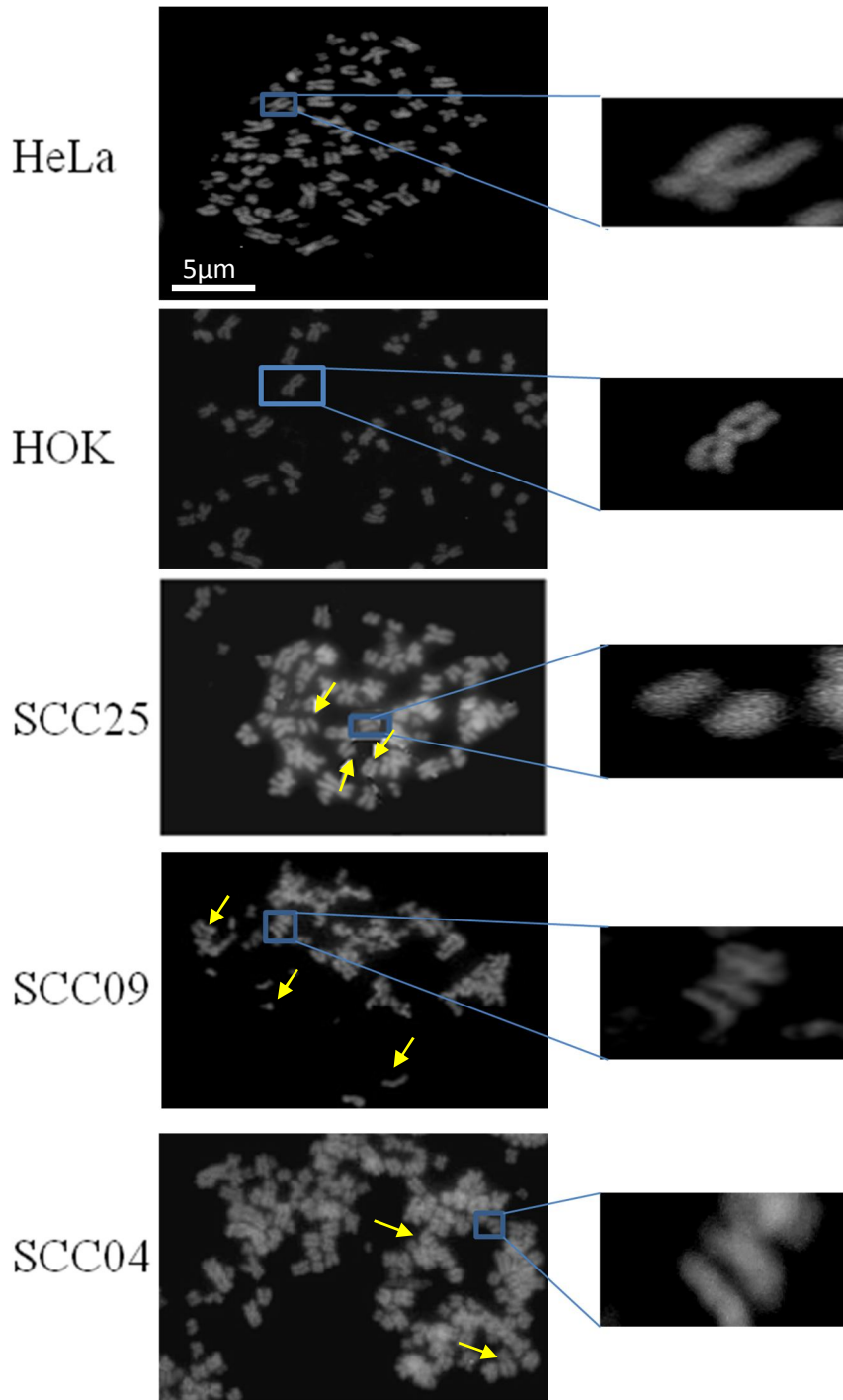


Figura 12: Resultados obtidos por *chromosome spread* das diferentes linhas celulares após 12 horas de incubação com nocodazole. Ao contrário das linhas HeLa e HOK as três linhas SCC apresentam separação precoce dos cromátídeos irmãos (imagem ampliada e setas).

As SCC09 apresentam um número elevado de metafases e as SCC04 apresentam um número elevado de prometafases:

As linhas SCC09 e SCC04 apresentam uma alteração na progressão na mitose. De acordo com os resultados anteriores, demonstrou-se que a funcionalidade do checkpoint mitótico das linhas tumorais em estudo estava afectada. Pela observação destas culturas por microscopia de fluorescência, foi possível visualizar a predominância de células em prometafase, na linha SCC04, sobre as outras fases da mitose, e predominância de células em metafase na linha celular SCC09.

Assim, com o intuito de identificar eventuais defeitos relacionados com a progressão da mitose quer na maquinaria quer no tempo de saída de mitose, procedeu-se à avaliação dos parâmetros mitóticos determinando-se a frequência de cada uma das seguintes fases da mitose: profase, prometafase, metafase e anafase.

Como se pode verificar na figura 13A, na linha controlo HOK a metafase é a fase predominante, ao passo que a linha celular tumoral SCC04 destaca-se pela predominância de prometafase relativamente à metafase. Tal reflecte-se na inversão do rácio de prometafase sobre metafase que passou de 0,5 nas HOK para 1,35 nas SCC04 (figura 13B). Por outro lado, a linha SCC09 apresenta um comportamento próximo do da linha controlo, observando-se contudo uma maior discrepância entre os valores de prometafase e metafase. Na linha celular tumoral SCC25, a diferença de valores entre as células que se encontram em prometafase e metafase não é expressiva, há apenas um ligeiro aumento da metafase em relação à prometafase, contudo, para ambas as fases verificam-se valores muito superiores em relação à linha controlo, HOK.

Para as linhas tumorais SCC09 e SCC25, estas alterações reflectem-se nos valores de rácio (prometafase/metáfase) que são muito superiores à da linha controlo, cerca de 0,98 e 0,78, respectivamente.

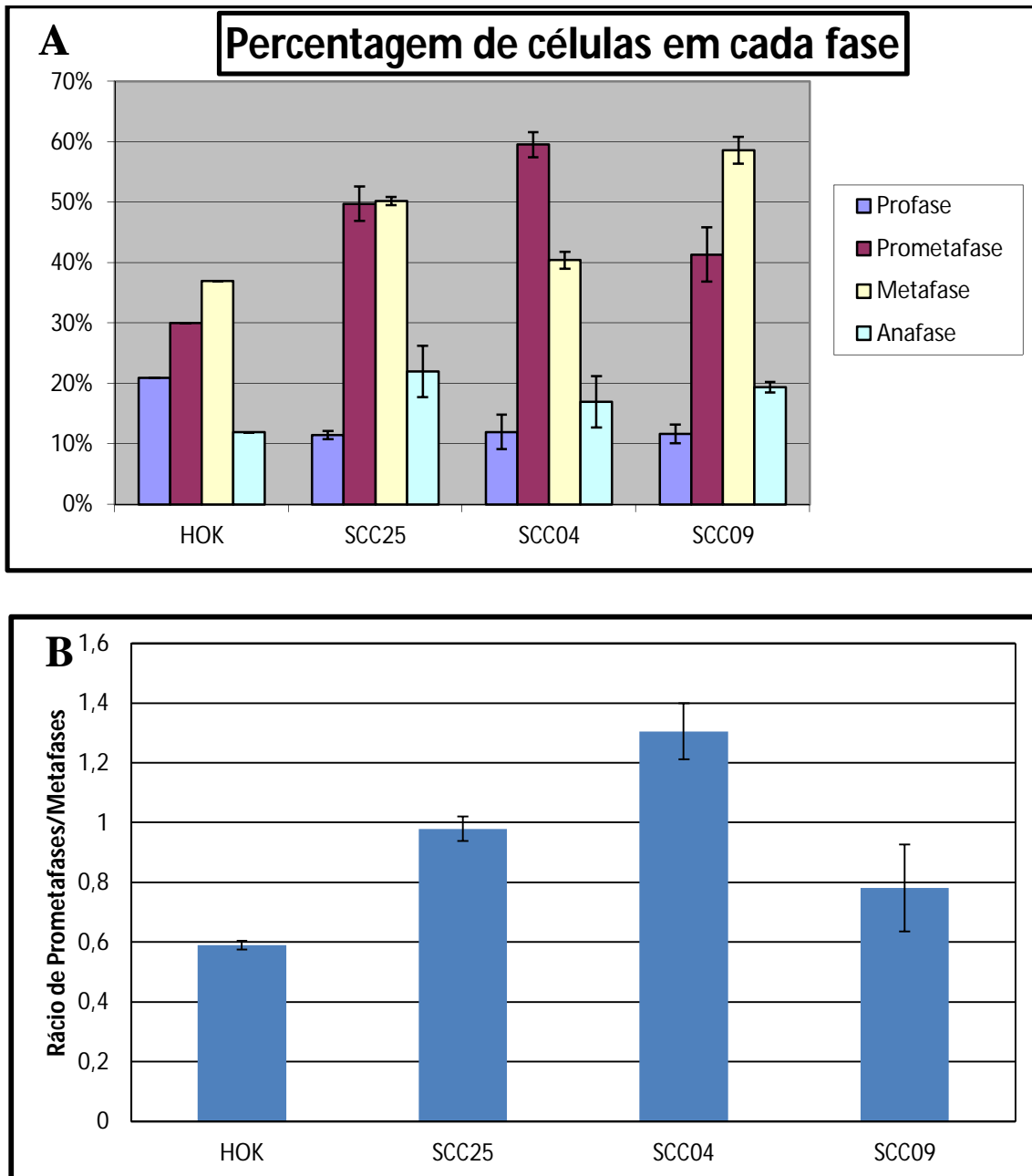


Figura 13: Quantificação dos parâmetros mitóticos em células não sincronizadas. A: Quantificação dos parâmetros mitóticos nas linhas celulares HOK, SCC25, SCC04 e SCC09. Comparando os resultados obtidos nas linhas tumorais relativamente à cultura controlo (HOK) é possível verificar que a linha celular SCC09 possui maior número de células em metafase e a linha SCC04 possuem um maior número de células em prometáfase. B: Rácio de prometafases sobre metafases nas diferentes linhas em estudo.

As linhas SCC9 e SCC4 apresentam uma distribuição subcelular normal das proteínas do checkpoint mitótico:

Com o intuito de verificar se a ineficiência detectada no checkpoint mitótico nas linhas em estudo estava relacionada com uma eventual alteração na distribuição subcelular quantitativa e qualitativa, das proteínas do checkpoint mitótico, procedeu-se à análise destas proteínas por imunofluorescência.

Da análise dos resultados obtidos verificou-se que as proteínas, marcadas por imunofluorescência, apresentavam uma distribuição subcelular normal de acordo com o que foi descrito na literatura (Clarke *et al* 2000). Em todas as linhas celulares, foi visível uma intensa marcação nos cinetocoros de células em profase e prometafase (figura 15), diminuindo esta em metafase (figura 14) e sendo indetectável em anafase. As linhas SCC's apresentam um padrão idêntico às linhas celulares HeLa e HOK, ou seja, distribuição subcelular normal das proteínas do checkpoint.

A figura 15 mostra a marcação intensa para as proteínas Bub1, BubR1 e Cdc20 em prometafase nas linhas SCC's, o que sugere uma eventual sobre-expressão das proteínas analisadas quando comparado com a linha controlo, HOK.

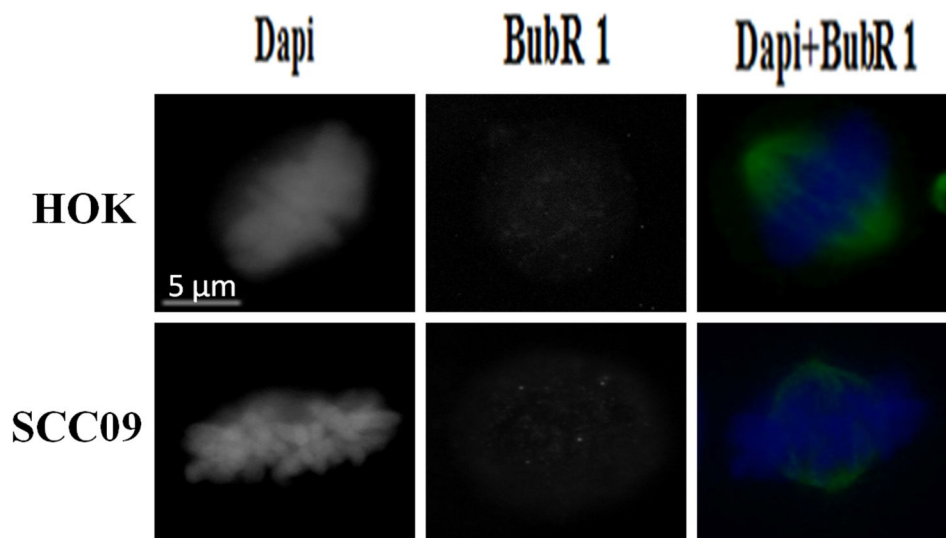


Figura 14: Imagens de imunofluorescência, onde se pode observar a diminuição de marcação de BubR1 em células em metafase. O DNA foi corado com DAPI (azul) e a proteína do checkpoint está marcada a vermelho. Os HOK representam a linha celular controlo e a linha celular tumoral SCC09 representa as linhas SCC's.

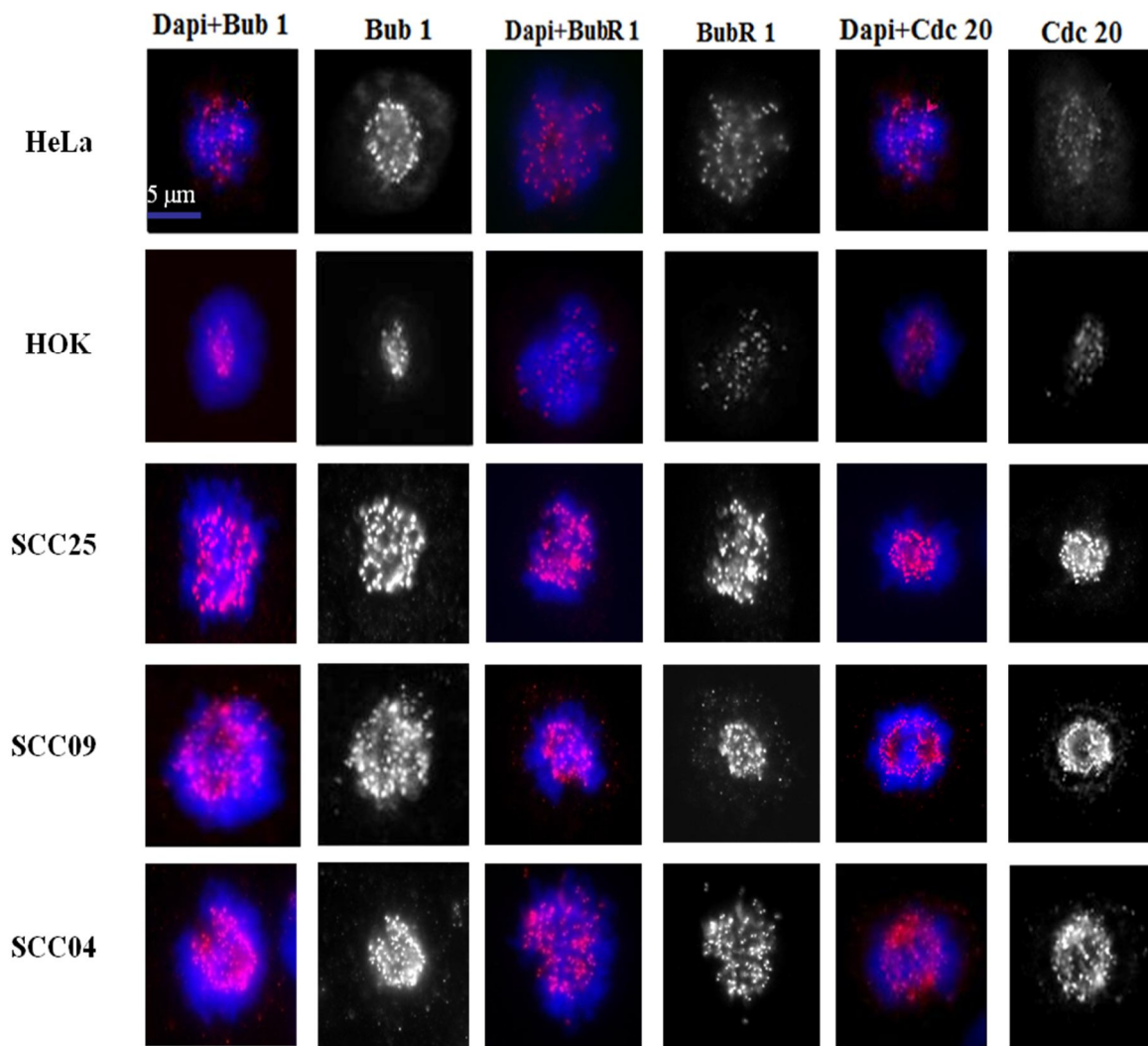


Figura 15: Imagens de imunofluorescência, onde se pode observar a marcação de Bub1, BubR1 e Cdc20 em células em prometáfase. O DNA foi corado com DAPI (azul) e as proteínas do checkpoint estão marcadas a vermelho. Em todas as linhas celulares a localização das proteínas apresenta-se normal, a nível dos cinetocoros; contudo, a marcação de cada proteína para as linhas SCC's parece mais intensa em relação às linhas celulares HOK e HeLa.

As linhas SCC apresentam alterações nos níveis de expressão dos genes do checkpoint mitótico Bub1, BubR1, Bub3, Cdc20, Mad2 e CHFR

Com o intuito de verificar se a ineficiência detectada no checkpoint mitótico nas linhas em estudo estava relacionada com uma eventual alteração nos níveis de expressão de genes do checkpoint mitótico, procedeu-se à análise quantitativa dos genes Bub1, BubR1, Bub3, Cdc20, CHFR e Mad2, por qRT PCR (quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction). Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 16, sendo que o “housekeeping gene” GAPDH foi utilizado como “loading control” (verificando-se, previamente que a sua expressão não varia entre as linhas celulares utilizadas). Nesta análise não foi incluída a linha celular HeLa, uma vez que, não tem a mesma proveniência que as linhas celulares em estudo.

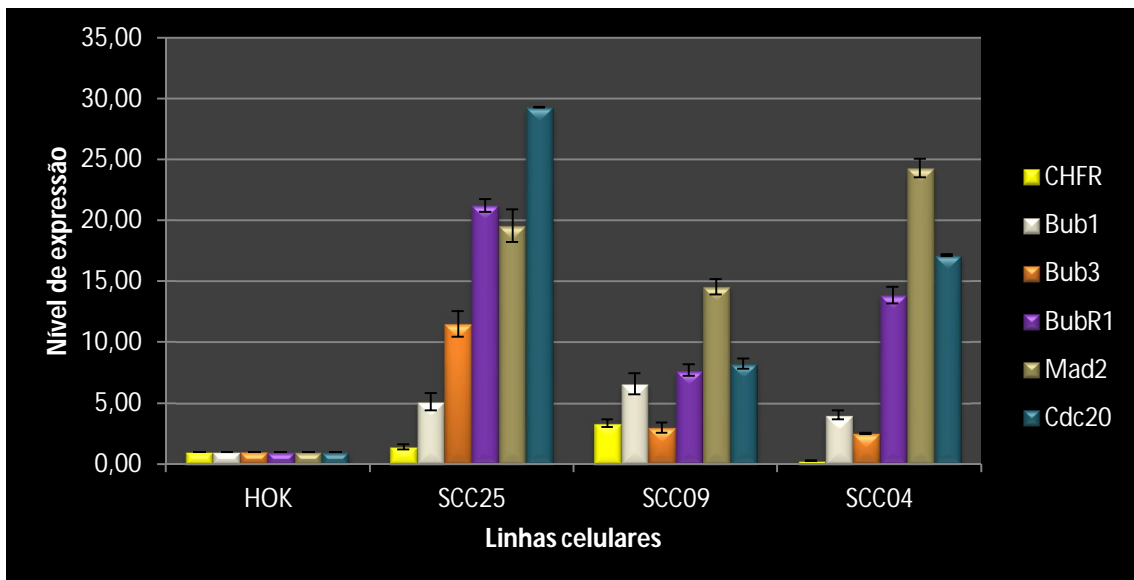


Figura 16: Expressão relativa dos genes que codificam para as proteínas Bub1, BubR1, Bub3, Cdc20, CHFR, e Mad2 obtida por qRT-PCR. Os valores obtidos foram normalizados relativamente ao *housekeeping gene* GAPDH, que se mantém constante na sua expressão entre as linhas celulares, e com o valor obtido para a linha celular HOK, que foi estabelecido como 1.

Os níveis de expressão de todos os genes analisados encontram-se alterados nas linhas celulares SCC. Em SCC25, SCC04 e SCC09 os genes que codificam para as proteínas da família Bub, para a Cdc20 e a Mad2 encontram-se sobre-expressos, comparativamente aos níveis de expressão verificados em HOK.

Relativamente às proteínas da família Bub, a maior sobre-expressão de Bub1 foi detectada na linha celular SCC09 (6,5 vezes mais expressa em relação ao controlo, os

HOK); a maior sobre-expressão de Bub3 foi detectada na linha SCC25 (12 vezes em relação ao controlo); e a de BubR1 foi detectada na linha celular SCC25 (21 vezes em relação ao controlo). Relativamente ao gene que codifica para a Mad2 a maior sobre-expressão detectou-se na linha celular SCC04 (25 vezes superior aos HOK). Contudo, as alterações mais expressivas foram detectadas no gene que codifica para a Cdc20 (a maior sobre-expressão verificada foi na linha celular SCC25, de cerca de 30 vezes).

Por outro lado, no gene que codifica para a CHFR, observou-se um padrão de expressão diferente nas diversas linhas celulares. Na linha celular SCC25 não se verificaram valores significativamente diferentes do controlo (HOK), a linha celular SCC09 apresenta uma sobre-expressão, de cerca de 4 vezes, e a linha celular SCC04 apresentam uma sub-expressão, de apenas 0,3 vezes.

VI. Discussão/Conclusão

O objectivo do presente trabalho é analisar funcional e molecularmente o checkpoint mitótico nas linhas celulares da cavidade oral SCC09 e SCC04. Tal objectivo está inerente à necessidade de complementar e solidificar resultados anteriormente obtidos pelo grupo de investigação, que comprovaram a ineficiência do checkpoint mitótico na linha celular tumoral SCC25, quando comparado com a da linha celular tumoral HeLa. Contudo, nestes ensaios compararam-se linhas celulares de diferentes proveniências, pelo que se impunha a realização de ensaios utilizando como controlo uma linha celular “normal” de células da cavidade oral, como as da linha celular HOK e alargar este estudo a outras linhas tumorais da cavidade oral. Assim, este estudo compreendeu a inclusão de mais duas linhas tumorais com a mesma proveniência (SCC04 e SCC09), mantendo-se a utilização de células HeLa como controlo para a eficiência do checkpoint mitótico.

Para análise da actividade do checkpoint mitótico das linhas tumorais em estudo, as células foram expostas ao Nocodazole. Em linhas com checkpoint mitótico eficiente, é expectável que incubações prolongadas promovam a paragem das células em mitose, devido à ausência de microtúbulos e da sua ligação aos cromossomas.

De facto, após a exposição das culturas da linha celular HeLa por períodos prolongados ao nocodazole, observa-se um elevado aumento de células mitóticas, ocorrendo uma acumulação destas ao longo do tempo (até aproximadamente 36h), o que reflecte a eficiência do checkpoint mitótico.

Os HOK revelaram-se possuir uma capacidade de paragem mais limitada no tempo na medida em que começaram a demonstrar sinais de morte celular já a partir das 12 horas de incubação com o nocodazole, inviabilizando deste modo as contagens a partir deste tempo.

Resultados que demonstram um checkpoint mitótico funcional, o que seria de esperar por se tratar de uma linha celular normal.

Nas linhas celulares tumorais SCC04 e SCC09, mesmo após períodos prolongados de exposição ao nocodazole, observaram-se células em diferentes fases do ciclo celular. Estas linhas celulares apresentaram uma resposta semelhante à linha celular SCC25, que possui um checkpoint mitótico ineficiente. Nestas linhas celulares verifica-se acumulação de células mitóticas, o que indica a activação do checkpoint; contudo, o número de células mitóticas tende a baixar sem que se observe um número significativo de células mortas, sugerindo a existência de falhas na funcionalidade do

checkpoint mitótico.

Possivelmente, em consequência da ineficiência do checkpoint mitótico nestas linhas tumorais, a divisão celular não ocorre devidamente dando origem a todas as situações de aneuploidia características de tumores da cavidade oral.

Recorrendo à técnica de *chromosome spread*, foi possível verificar que, na presença de nocodazole, um considerável número das células, que se pensavam paradas em mitose nas linhas tumorais SCC25, SCC09 e SCC04, exibiam os cromatídeos irmãos separados, em oposição ao observado nas linhas celulares HOK e HeLa. Assim, confirma-se a ineficiência do checkpoint mitótico, inferida pelas contagens do índice mitótico, e confirmada pelos ensaios de *chromosome spread* os quais permitiram verificar que células que se pensavam paradas em mitose sob acção do nocodazole, na realidade, eram células em diferentes fases da mitose.

Assim, o baixo índice mitótico determinado nestas linhas era de facto subestimado. Permitindo concluir que, as linhas celulares tumorais, SCC25, SCC09 e SCC04 têm capacidade de escapar a uma paragem prolongada em mitose. Ou seja, apesar de estes resultados apontarem para a ineficiência do checkpoint mitótico nas linhas tumorais SCC, este apresenta uma funcionalidade mínima que permite a viabilidade celular, ou seja, o escape à morte celular. Neste contexto, quando se procede às contagens do índice mitótico das linhas SCC09 e SCC04, sob acção do nocodazole, há um aumento do índice mitótico nestas linhas e não uma grande acumulação em mitose (figura 11), como acontece com as linhas HeLa e HOK em que as células estão paradas em mitose acabando por morrer ao longo do tempo.

Outra característica visível nas linhas celulares em estudo (após contagem das diferentes fases da mitose) é que as linhas celulares tumorais SCC09 e SCC25 apresentam como fase predominante da mitose a metafase, que em comparação com os HOK apresentam resposta semelhante mas com valores muito superiores. A linha celular tumoral SCC04 quando comparada com os HOK, apresenta resposta diferente tendo como fase predominante a prometafase. Estes dados indicam que existem defeitos na progressão da mitose, que poderá estar relacionado com alterações nos genes do checkpoint mitótico (como Bub1, BubR1 e Bub3) envolvidos na regulação da ligação dos microtúbulos aos cinetocoros e, portanto, na progressão da mitose.

Tendo-se identificado deficiências no checkpoint mitótico nas linhas SCC09 e SCC04, direccionaram-se, assim, os estudos para a análise da distribuição das proteínas

do checkpoint mitótico e para a análise dos níveis de expressão de genes que codificam para proteínas do checkpoint mitótico. Por imunofluorescência, verificou-se que não existiam alteração aparente na localização subcelular e temporal, ao longo da mitose, das principais proteínas do checkpoint mitótico, nas linhas tumorais do cancro da cavidade oral quando comparadas com os HOK. Contudo, observou-se um aumento da intensidade do sinal de marcação das proteínas nas culturas celulares de SCC's que, embora necessite de quantificação, sugere a existência de uma possível sobre-expressão dos genes do checkpoint mitótico.

Por Real-Time PCR, foi possível determinar uma sobre-expressão de genes que codificam para as proteínas do checkpoint: Cdc20, proteínas da família Bub (BubR1, Bub1 e Bub3) e Mad2, sendo que a maior alteração observada foram nos níveis de expressão de Cdc20. Relativamente aos níveis de expressão do gene CHFR, este diverge entre as linhas celulares em estudo, quando comparados com o controlo. Este gene que codifica para a proteína CHFR, também se encontra descrito mas como sub-expresso para outras linhas tumorais do cancro da cavidade oral (Baba *et al.*, 2009).

A sobre-expressão da proteína Cdc20 foi já documentada noutras linhas celulares tumorais do cancro da cavidade oral. Elevados níveis de Cdc20 estão associados à rápida progressão para anafase, promovendo o aparecimento de células aneuplóides. Alterações nos níveis de Cdc20 e defeitos no centrossoma conduzem a um aumento da malignidade e progressão do tumor (Mondal *et al* 2007 e Thirthagiri *et al* 2007).

O aumento dos níveis das proteínas da família Bub e Mad2 pode dever-se a um mecanismo de compensação que impede uma progressão mais rápida para anafase e, como tal, a ocorrência de divisões celulares catastróficas, que poderiam comprometer a viabilidade da linha celular. O mecanismo de compensação mencionado consistirá, portanto, num conjunto de alterações que podem ocorrer no sentido de assegurar que, apesar de não ser eficiente, o checkpoint mitótico apresente uma funcionalidade compatível com a manutenção da viabilidade da linha celular. A compensação da sobre-expressão de determinados genes com a sobre-expressão de outros pode, assim, estar na base de um nível de funcionalidade mínima do checkpoint mitótico. Este mecanismo de compensação resultará em ajustes nos níveis de expressão genica quando há alterações na dosagem genica.

Na linha celular tumoral SCC04, por exemplo, a sub-expressão da proteína

CHFR aliada a uma sobre-expressão de Cdc20, por si só seria catastrófico, e incompatível com a funcionalidade do checkpoint mitótico. A progressão/divisão destas células, tendo em conta, o papel crucial destas proteínas os níveis alterados da expressão, dos genes que as codificam, teria como resultado uma divisão desigual dos cromossomas, podendo originar aneuploidias aberrantes incompatíveis com a viabilidade celular. Assim, a sobre-expressão de todos os outros genes permitirá sustentar o checkpoint para manter parte da sua funcionalidade.

Tal como na linha celular SCC04, na linha celular SCC09 os ajustes nos níveis de expressão dos genes que codificam para as proteínas BubR1, Bub1, Bub3 e Mad2 permitem a manutenção da viabilidade celular face ao aumento verificado da expressão de Cdc20 nesta linha.

Em conclusão, os resultados obtidos comprovaram que i) o checkpoint mitótico é deficiente nas linhas celulares de carcinoma da cavidade oral em estudo, ii) à alteração verificada na actividade do checkpoint mitótico está associada uma alteração nos níveis expressão dos genes do checkpoint mitótico e iii) estas alterações moleculares ainda garantem uma certa actividade do checkpoint mitótico que, embora não comprometam a viabilidade celular, poderão proporcionar um meio para a instabilidade genómica que se verifica durante a carcinogénese.

VII. Perspectivas Futuras

O presente trabalho cumpriu os objectivos a que se propunha, contudo torna-se fundamental a realização de ensaios adicionais, de modo a complementar os ensaios já realizados, e a ampliar o conhecimento dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento e progressão do cancro da cavidade oral.

Deste modo, para verificar se a expressão das proteínas do checkpoint mitótico (Cdc20, Bub1, BubR1, Bub3 e Mad2) apresentam alterações nos níveis de expressão, que são esperadas face às alterações verificadas nos níveis de expressão dos seus genes correspondentes (ensaios de Real-Time PCR), seria fundamental a realização de ensaios de Western Blot.

Após confirmação da alteração na expressão destas proteínas a estratégia a adoptar será interferir na expressão das mesmas. O silenciamento de proteínas sobre-expressas, por RNAi poderia ser realizado com o objectivo de se verificar se efectivamente existe um mecanismo de compensação. A realização de ensaios de degradação da ciclina B, com intuito de avaliar o tempo de permanência em mitose das células, poderia constituir um indicador do papel da proteína silenciada no eventual mecanismo de compensação.

Por outro lado, de modo a aprofundar o estudo do checkpoint mitótico nestas linhas celulares, poder-se-á alargar os ensaios a outras proteínas, e também incluir no estudo um maior número de linhas celulares.

Por último, também seria importante a realização de ensaios imunohistoquímicos em amostras histológicas de tumores da cavidade oral e a análise por Real-Time, de RNA extraído destas amostras, para uma comparação dos resultados obtidos *in vitro* com os resultados obtidos *in vivo*.

VIII. Bibliografia

- Andreotti M, Rodrigues AN, Cardoso LM, Figueiredo RA, Eluf-Neto J & Wunsch-Filho V (2006) [Occupational status and cancer of the oral cavity and oropharynx]. *Cad Saude Publica* **22**, 543-552.
- Azevedo C (2002) *Biologia Celular e Molecular*, 3ª edição ed.
- Baba, #160, Seiji, HARA, Akira, KATO, Keizo, LONG NK, HATANO, Yuichiro, KIMURA, Masashi, OKANO, Yukio, YAMADA, Yasuhiro, SHIBATA & Toshiyuki (2009) *Aberrant promoter hypermethylation of the CHFR gene in oral squamous cell carcinomas*. Athens, GRECE: Spandidos.
- Bharadwaj R & Yu H (2000) The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23**, 2016-2027.
- Brinkley BR (2001) Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol* **11**, 18-21.
- Brito DA, Yang Z & Rieder CL (2008) Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied Rockefeller University Press.
- Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed.
- Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW & Vogelstein B (1998) Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* **392**, 300-303.
- Cheeseman IM & Desai A (2008) Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 33-46.
- Christopher B. O'Connell JL, Polla Hergert, Antonis Kourtidis, Douglas S. Conklin, and Alexey Khodjakov (2008) The spindle assembly checkpoint is satisfied in the absence of interkinetochore tension during mitosis with unreplicated genomes. *Journal of Cell Biology* **183**, 129-136
- Ciferri C, Musacchio A & Petrovic A (2007) The Ndc80 complex: Hub of kinetochore activity. *FEBS Letters* **581**, 2862-2869.
- Dobrossy L (2005) Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 9 - 17.
- Ge S, Skaar JR & Pagano M (2009) APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell Cycle* **8**, 167-171.
- Gong (2004) [Advance of study on effects of Chfr gene of mitosis prophase checkpoint--review]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. **12**, 870-874.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hardwick KMMaKG (2006) The spindle checkpoint *Journal of Cell Science* **119**, 4139-4142.
- Heuvel Svd (2005) Cell-cycle regulation. *Wormbook*, ed The C. elegans Research Community.
- Hoyt MA, Totis L & Roberts BT (1991) S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. **66**, 507-517.
- Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters J-M, Kinzler KW, Vogelstein B & Lengauer C (2001) Securin Is Required for Chromosomal Stability in Human Cells. **105**, 445-457.
- Joglekar AP, Bouck DC, Molk JN, Bloom KS & Salmon ED (2006) Molecular architecture of a kinetochore-microtubule attachment site. *Nat Cell Biol* **8**, 581-585.
- Karess R (2005) Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol* **15**, 386-392.
- Kops GJPL, Weaver BAA & Cleveland DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773-785.
- Li R & Murray AW (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. **66**, 519-531.
- Lu Y WZ, Ge L, Chen N, Liu H. (2009) The RZZ complex and the spindle assembly checkpoint. *Cell Struct Funct*. **34**, 31-45.
- Luo X & Yu H (2008) Protein Metamorphosis: The Two-State Behavior of Mad2. **16**, 1616-1625.
- Mondal, #160, Gourish, SENGUPTA, Shiladitya, PANDA, K. C, GOLLIN, M. S, SAUNDERS, S. W, ROYCHOUDHURY & Susanta (2007) *Overexpression of Cdc20 leads to impairment of*

- the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer*. Oxford, ROYAUME-UNI: Oxford University Press.
- Morrow, #160, J. C, TIGHE, Anthony, JOHNSON, L. V, SCOTT, F. MI, DITCHFIELD, Claire, TAYLOR & S. S (2005) *Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/C*[C][d][c][2][0]. Cambridge, ROYAUME-UNI: Company of Biologists.
- Murray AW (2004) Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. **116**, 221-234.
- Musacchio A & Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 379-393.
- Nasmyth K (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* **12**, 405-412.
- Neville BW & Day TA (2002) Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* **52**, 195-215.
- Nicklas RB WS, Gorbsky GJ. (1995) Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J Cell Biol.* **130**, 929-939.
- Nilsson J, Yekezare M, Minshull J & Pines J (2008) The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat Cell Biol* **10**, 1411-1420.
- Pinsky BA & Biggins S (2005) The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends in Cell Biology* **15**, 486-493.
- Privette LM & Petty EM (2008) CHFR: A Novel Mitotic Checkpoint Protein and Regulator of Tumorigenesis. *Transl Oncol* **1**, 57-64.
- Russell CHMaP (1995) Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* **14**, 2166–2175.
- Schafer KA (1998) The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology Online* **35**, 461-478.
- Schmidt M & Medema RH (2006) Exploiting the compromised spindle assembly checkpoint function of tumor cells: dawn on the horizon? *Cell Cycle* **5**, 159-163.
- Shackelford RE KW, Paules RS. (1999) Cell Cycle Control, Checkpoint Mechanisms, and Genotoxic Stress. *Environ Health Perspect.* **107**, 5-24.
- Sluder G MF, Thompson EA, Wolf DE. (1994) Feedback control of the metaphase-anaphase transition in sea urchin zygotes: role of maloriented chromosomes. *J Cell Biol.* **126**, 189-198.
- Straight AF, Marshall WF, Sedat JW & Murray AW (1997) Mitosis in Living Budding Yeast: Anaphase A But No Metaphase Plate. *Science* **277**, 574-578.
- Sullivan M & Morgan DO (2007) Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 894-903.
- Tanaka TU & Desai A (2008) Kinetochore-microtubule interactions: the means to the end. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 53-63.
- Tao W (2005) The mitotic checkpoint in cancer therapy. *Cell Cycle* **4**, 1495-1499.
- Torras-Llorca M, Moreno-Moreno O & Azorin F (2009) Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J* **28**, 2337-2348.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR & Berneman ZN (2003) *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*.
- Wang X, Jin DY, Wong YC, Cheung AL, Chun AC, Lo AK, Liu Y & Tsao SW (2000) Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis* **21**, 2293-2297.
- Ye H, Yu T, Temam S, Ziober B, Wang J, Schwartz J, Mao L, Wong D & Zhou X (2008) Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* **9**, 69.
- Yu H (2002) Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 706-714.
- Zimmerman W. DS (2000) "Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles.". *Traffic* **1**, 927-934.