

Raquel Bernardeth de Almeida

Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli

São Paulo

2010

ALMEIDA, R. B. **Efeitos da inibição de Aurora A sobre a proliferação e fenótipo de células derivadas de hepatocarcinoma humano.** 2010. 813 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O carcinoma hepatocelular (HCC) é o mais comum tumor maligno primário do fígado. Apesar dos amplos estudos realizados com HCC, este tipo de carcinoma apresenta baixa resposta ao tratamento convencional. Aurora A é importante durante o ciclo celular, incluindo a maturação centrossômica e sua separação, entrada em mitose, montagem de fuso bipolar, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e citocinese. Expressão alterada de Aurora A tem sido associada com o desenvolvimento do tumor e sua superexpressão ocorre em 60% dos HCCs, sendo considerado um marcador de agressividade. Recentemente, inibidores de Aurora quinases têm sido propostos como drogas antitumorais. 4(4'-Benzamidoanilina)-6,7dimetoxiquizanolina, BADIM, é um recém desenvolvido inibidor da Aurora e seu papel não está bem estabelecido. Nosso estudo investigou os efeitos deste inibidor na linhagem celular HepG2, derivada de HCC. Os tratamentos foram feitos com 300, 600 e 1200nm de BADIM por 24 e 48h. Células tratadas mostraram através de ensaios de citometria de fluxo uma diminuição no seu número em relação ao grupo controle. As culturas tratadas mostravam diminuição do numero de células com aumento nas freqüências de células tetraplóides e parada em G2/M do ciclo celular. Alterações nos microtúbulos foram notadas, como fuso monopolar e extensões incomuns contendo microtúbulos entre as células-filhas, aumento no número de células gigantes e binucleadas, observadas por imunofluorescência. Divisões celulares aberrantes, principalmente metafases com incorreto alinhamento cromossômico, foram observadas por ensaios de citoquímica fluorescente em todas as concentrações da droga, quando comparadas aos controles. Maiores freqüências de células apoptóticas foram observadas quando células foram submetidas às concentrações mais elevadas de BADIM, como mostraram a técnicas de TUNEL e ensaio para Caspase 9. Portanto, este inibidor é um agente promissor para estudos em HCC, pois atua em pontos críticos relacionados com a tumorigênese.

**Palavras-chave:** Hepatocarcinoma. Aurora-A. Ciclo celular. Citoesqueleto. Aberrações nucleares.

Apoptose.

ALMEIDA, R. B. **Aurora A inhibition effects in proliferation and morphology in cells derivated of Hepatocellular Carcinoma.** 2010. 81 p. Master thesis (Cell Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant tumor of liver. Despite the wide studies performed with HCC, this type of carcinoma has low response to conventional treatment. Aurora A is very important during cell cycle, including centrosome maturation and separation, mitotic entry, bipolar-spindle assembly, chromosome alignment on metaphase plate and cytokinesis. Altered expression of Aurora A has been associated with tumor development. Aurora A overexpression occurs in 60% of HCC and has been considered an aggressiveness marker. Recently, Aurora kinases inhibitors have been proposed as antitumoral drugs, one of the effects is the cell cycle arrest. 4'(4'-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxiquizanolina is an Aurora inhibitor, however its role is not well established. Our study aimed to investigate the effects of this inhibitor in HCC cell line, HepG2. Cell line was treated with 300nM, 600nM and 1200nM of inhibitor for 24 and 48h. Cultures treated with Aurora Kinase inhibitor showed decreased number of cells compared to control. Higher frequencies of tetraploid cells and G2/M arrested cells were observed. Microtubules alterations were noted, as monopolar spindle and uncommon tubulin extensions between daughter, as well increased number of giant cells and binucleated cells, were observed by immunofluorescence. Aberrant cell divisions, mainly metaphases showing incorrect chromosome alignment, were observed in all drug concentrations by fluorescent cytochemistry. Caspase 9 assay and TUNEL technique evidenced that 1200nM of Badim was associated with high frequencies of apoptosis. Therefore this inhibitor is a promising agent for studies in HCC, since it acts at critical points related to tumorigenesis.

**Key words:** Hepatocellular carcinoma. Aurora A. Cell cycle. Cytoskeleton. Nuclear aberrations. Apoptosis.

## 1 INTRODUÇÃO

O fígado é considerado a maior glândula do organismo e tem como unidade funcional o lóbulo hepático, o qual é constituído principalmente por cordões de hepatócitos, dentre as quais passam os capilares sinusóides, o que permite intensa troca de substâncias entre hepatócitos e sangue. As células ovais, também conhecidas como células estreladas correspondem às células tronco deste órgão (KIERSZEMBAUM, 2004). Em condições normais, os hepatócitos e células estreladas desempenham suas funções de metabolização de substâncias ou ainda o armazenamento de moléculas como o glicogênio e vitamina A (KIERSZEMBAUM, 2004). Além disso, os hepatócitos ou células estreladas podem estar quiescentes ou ativar processos de proliferação ou morte celular. Desordem nestes processos pode contribuir para a tumorigênese, levando a formação do Hepatocarcinoma (HCC).

O HCC representa o quinto tipo mais freqüente de câncer no mundo, e o terceiro em relação à causa *mortis* no mundo (LLOVET et al., 2003; SARBAH et al., 2004; FENG et al., 2005; SHIN, 2006; CHENG et al., 2009; LLOVET et al., 2009). Em 80% dos casos, a doença está relacionada com infecção viral crônica (hepatite B ou C). Sabe-se ainda que o risco de desenvolver HCC após contrair HBV aumenta aproximadamente de 5 a 15 vezes (EI SERAG e RUDOLPH, 2007), e em relação ao HCV este aumento é de 11,5 a 17 vezes (DONATO et al., 2001).

Na infecção por HBV, que é bem conhecida, sabe-se que ocorre a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro, fato que contribui para a instabilidade genética. Estudos mostram que a inserção de genoma viral na região promotora do gene *p16* induz a produção de oncoproteínas como, por exemplo, a HBx (KREMNSDORF et al., 2006; ZUCMAN-ROSSI e LAURENT-PUIG, 2007). A HBx é uma proteína que aumenta a expressão gênica e, conseqüentemente, a replicação do vírus por transativação de seu promotor celular (KREMNSDORF et al., 2006). A ação desta proteína é evidenciada como um evento para o desenvolvimento do HCC, uma vez que está diretamente

envolvida com a inibição gênica da proteína *p53*, a qual realiza funções importantes no controle do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose e supressão tumoral (KREMSDORF et al., 2006; FARAZI e DEPINHO, 2006). Além disso, HBx foi associada a esteatose, processo esse considerado como um importante co-fator para o desenvolvimento do HCC (KIM et al., 2007).

A infecção por HCV afeta aproximadamente 130 milhões de indivíduos no mundo todo e permanece como a maior causa de doenças hepáticas (SHEPARD et al., 2005). Na maioria dos casos (60-85%), HCV progride para doenças crônicas hepáticas, como esteatose, cirrose e HCC (SHEPARD et al., 2005). Sabe-se que a infecção por este vírus pode levar a problemas na via de apoptose e transdução de sinais, além de contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio e problemas no metabolismo de lipídeos e ativação transcricional (ANZOLA, 2004; IRSHAD e DHAR, 2006). As proteínas desse vírus podem ainda associar-se a proteínas supressoras tumorais, como *p53*, *p73* e *pRb*, fazendo com que estas deixem de ser responsivas as suas funções, tais como o bloqueio do ciclo celular (ALISI et al., 2003; BENARD et al., 2003) e modulação da expressão da quinase dependente de ciclina *p21*, que é importante para o controle da formação tumoral (YAMANAKA et al., 2002; KWUN e JANG, 2003). Devido à importância destes eventos para homeostase celular, a infecção por HCV, bem como por HBV pode contribuir para instabilidade genética, o que por sua vez irá contribuir para o desenvolvimento do HCC.

Em adição às infecções virais crônicas, outros fatores também contribuem para o processo de carcinogênese hepática como o consumo excessivo de álcool, *diabetes mellitus*, exposição à Aflatoxina B1 e a inalação de fumaça de cigarro (CHEN et al., 1997; HASSAN et al., 2002; MATSUO, 2003; KULKARNI et al., 2004; MCKILLOP e SCHRUM, 2005).

Outro fator de risco para o desenvolvimento do HCC é a cirrose, que é observada em cerca de 80% a 90% dos pacientes afetados por tal doença e está geralmente associada com infecção por HCV ou por consumo excessivo de álcool (FARAZI e DePINHO, 2006). O uso crônico de álcool pode causar a

produção de citocinas através da ativação de monócitos (MCCLAIN et al., 2002), provocando aumento nas concentrações de endotoxinas circulantes, como  $TNF\alpha$ , Interleucina- $1\beta$  e Interleucina 6. Além disso, também pode ativar prostaglandina E que por sua vez ativam as células de Kupffer, liberando citocinas responsáveis por causar um efeito adverso à sobrevivência de hepatócitos. Sabe-se que hepatócitos submetidos à freqüente exposição ao álcool apresentam aumento na sensibilidade a efeitos citotóxicos do  $TNF\alpha$ , o qual inicia o estágio de substituição destas células através de processo regenerativo intenso por meio de ativação de células estreladas. Este processo repetitivo de substituição de hepatócitos pode contribuir para o processo cirrótico, que é caracterizado como formação de nódulos anormais no fígado seguido por deposição de fibras de colágeno pelas células estreladas (FARAZI e DEPINHO, 2006). Nódulos hiperplásicos podem evoluir, devido a sua instabilidade genética, para nódulos displásicos e estes por sua vez, com marcante instabilidade genética e perda de p53, podem evoluir para o HCC (FARAZI e DEPINHO, 2006).

A patogênese do HCC pode envolver, portanto, eventos genéticos e epigenéticos que podem induzir alterações em hepatócitos ou ainda em suas células precursoras. Tais alterações favorecem desequilíbrios entre os processos de proliferação celular e apoptose, contribuindo para a hepatocarcinogênese (THORGEIRSSON, 2002; VOLGELSTEIN e KINZLER, 2004; VILLANUEVA et al., 2007).

### **1.1 Tumorigênese e controle do ciclo celular**

A hepatocarcinogênese, bem como o desenvolvimento de outros tumores tem seu ponto de início a partir de problemas no controle do ciclo celular, mecanismo intrincado que envolve a formação seqüencial, ativação e conseqüente inativação de uma série de complexos protéicos, os quais são constituídos por uma subunidade catalítica (proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina – cdk) associada a uma subunidade regulatória, a ciclina

(MORGAN, 1995; BROWN et al., 2003). Alguns complexos ciclina/cdk estão diretamente envolvidos na maquinaria de progressão do ciclo celular (ciclina D-cdk 4/6, ciclina E-cdk2, ciclina A-cdk2, ciclina A-cdk1 e ciclina B-cdk1), enquanto outros o fazem de modo indireto através da ativação da transcrição gênica que envolve a fosforilação do domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II pelos complexos ciclina H-cdk 7 e ciclina T-cdk9 (SHAPIRO, 2006). Existem ainda as proteínas que inibem a formação e/ou atividade dos complexos cdk-ciclina, as quais contribuem na regulação negativa do ciclo.

Em resposta a estímulos mitogênicos, as células sintetizam ciclina D que se associam às cdks 4 e 6. A progressão pela fase G1, bem como a transição G1/S envolve a formação dos complexos ciclinas D-cdk4/6 e ciclina E/cdk2 que fosforilam seqüencialmente a proteína retinoblastoma (Rb), que hiperfosforilada, libera o fator de transcrição E2F. Dessa forma genes necessários à entrada em S são transcritos. A progressão pela fase S e a transição S/ G2 depende da ativação do complexo ciclina A-cdk2 e a transição G2/M ocorre quando os complexos ciclina A-cdk1 e ciclina B-cdk1 são formados. O retorno à fase G1 ocorre pela degradação das ciclinas A e B e conseqüente inativação da cdk1. Na ausência de sinais que estimulam a progressão do ciclo, a transição G1/S é bloqueada devido ao seqüestro de E2F pela proteína Rb. O complexo Rb-E2F não apenas bloqueia a atividade transcricional de E2F como também impede o recrutamento de desacetilases de histona para as regiões promotoras dos genes que são essenciais à entrada na fase S (SHAPIRO, 2006).

A atividade das proteínas inibidoras de cdks (CKIs) contribui para regular negativamente o ciclo celular, pois são capazes de inativar os complexos cdk-ciclina ou impedir sua formação (MATSUSHIME et al., 1992; HUNTER e PINES, 1994; SHAPIRO, 2006). Duas classes de CKIs foram identificadas. A primeira é conhecida como INK4 e esta inibe especificamente os complexos ciclina D-cdk4, enquanto a segunda é conhecida como Kip/Cip e inibe a maioria dos complexos ciclina-cdk que se formam ao longo do ciclo (SHEER e ROBERTS, 1999; VIDAL e KOFF, 2000). As proteínas p15, p16, p18 e p19 fazem parte da família INK4, enquanto as proteínas p21, p27 e p57

fazem parte da família Kip/Cip (SERRANO et al., 1993; HANNON e BEACH, 1994; HIRAI et al., 1995). O equilíbrio entre a regulação positiva e negativa do ciclo celular é importante nos organismos multicelulares.

Além disso, ao longo do ciclo existem mecanismos de verificação (pontos de checagem) que permitem o monitoramento em relação à integridade do material genético e sua segregação (LUKAS et al, 2004; HAKEM, 2008). Em  $G_1/S$  eventuais danos no DNA são detectados e o ciclo celular é bloqueado até que o reparo tenha sido efetuado. Na fase S, o mecanismo de checagem confere se o conteúdo de DNA foi replicado uma única vez. Em  $G_2/M$  há a verificação não só quanto ao término do processo de replicação, mas também quanto à integridade do material genético (LUKAS et al., 2004). O ponto de checagem de M detecta se houve ligação correta do fuso mitótico aos cinetócoros e alinhamento cromossômico na placa metafásica (RIEDER et al., 1994; LI e NICKLAS, 1995).

Os componentes do ponto de checagem mitótico regulam a atividade da ubiquitina ligase, um complexo multiprotéico também conhecido por complexo promotor de anáfase, que induz a degradação das coesinas (proteínas que mantêm as cromátides irmãs paralelas após a replicação do DNA) e das ciclinas mitóticas permitindo assim a separação das cromátides e finalização da mitose (KING et al., 1996).

A perda da regulação normal do ciclo celular é uma característica de cânceres humanos, e falhas nos pontos de checagem mitóticos permitem a propagação de cariótipos anormais com o estabelecimento de um estado de instabilidade genética, que pode contribuir para o processo de tumorigênese (LENGAUER et al., 1998; BHARADWAJ e YU, 2004; CHI e JEANG, 2007).



## 1.2 Alterações nucleares

Células tumorais em geral apresentam número cromossômico alterado por perda e/ou ganho de cromossomos (aneuploidia) (JALLEPALLI; e LENGAUER, 2001; KIRSCH-VOLDERS et al., 2002; BHARADWAJ e YU, 2004). Theodor Boveri foi o primeiro cientista a relacionar aneuploidia e formação de tumor. Diversos mecanismos estão envolvidos na determinação de aneuploidias em células tumorais, os quais incluem amplificação cromossômica, erros de alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, anormalidades na montagem do fuso mitótico e falhas no processo de citocinese (NIGG, 2002).

Atualmente, sabe-se que muitos tumores sólidos são aneuplóides e possuem grande instabilidade genética, o que permite a perda ou ganho de cromossomos durante o processo de divisão celular (LENGAUER et al., 1997). Além disso, o número alterado de cromossomos pode culminar em alterações gênicas, as quais por sua vez podem causar alterações no perfil de expressão de proteínas envolvidas em processos importantes para a homeostase celular, como p53, contribuindo desta maneira para o desenvolvimento de transformações malignas (LENGAUER et al., 1997). Além disso, estudos têm evidenciado que a aneuploidia pode funcionar de alguma forma como um supressor de tumor, uma vez que o aumento exacerbado no conteúdo do cariótipo poderia ser reconhecido pela maquinaria de reparo celular que imediatamente ativaria a maquinaria de morte celular programada de forma direta (HEDE, 2005) ou de forma indireta, quando associado ao processo de multinucleação (NAKAGAWA, 2006).

Diversas análises podem ser utilizadas para estudar agentes com potencial genotóxico. Estes danos podem ser causados por fragmentações na cromatina ou ainda por distúrbios na formação dos fusos mitóticos, gerando, portanto células com distúrbios nos passos finais da divisão celular.

### 1.3 Aurora Quinase

Na última década, uma família de proteínas conhecidas como serina/treonina quinases Aurora têm sido diretamente associadas com os processos que garantem a segregação equivalente dos cromossomos durante os processos de divisão celular (SAUNDERS et al., 2002; MARUMOTO et al., 2005).

Sabe-se que em mamíferos essa família de proteínas inclui três membros, sendo elas as Auroras A, B e C, cujos genes localizam-se respectivamente nos cromossomos 20q13.2, 17p13.1 e 19q13.43. Altos níveis de expressão de Auroras A e B são observados no final de G2 e ao longo da mitose. Ambas as Auroras estão envolvidas na maturação e separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, segregação cromossômica e citocinese (KUFER et al., 2003; CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005; LENS e VADER, 2008).

A atividade funcional da Aurora C foi a última a ser pesquisada e estudos iniciais mostraram elevados níveis de RNAm em testículo, indicando seu possível envolvimento no processo de gametogênese, fato corroborado pelos experimentos em que camundongos que tiveram o gene da Aurora C nocauteado apresentaram redução na fertilidade (KIMMINS et al., 2006). Além disso, mutações nesse gene foram identificadas em espermatozóides de homens inférteis (DIETERICH et al., 2007). Ainda segundo esses pesquisadores a ausência de expressão da Aurora C não altera o fenótipo das células somáticas sugerindo que as mesmas não sejam relevantes na mitose. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que Aurora C possui atividade funcional semelhante à Aurora B, agindo durante a parte final da mitose, período este em que a mesma é fundamental para as fases de anáfase e citocinese, já que está envolvida na bi-orientação cromossômica, no checkpoint de mitose e na formação do anel contrátil (VADER et al., 2006; LENS e VADER, G., 2008). Foi também mostrado que algumas células tumorais

apresentam expressão elevada de Aurora C (SASAI et al., 2004; YAN et al., 2005).

O mecanismo molecular envolvido na atividade funcional da Aurora A tem sido o foco principal de alguns estudos. A Aurora A está envolvida na maturação centrossômica agindo na fosforilação da proteína TACC (*transforming acidic coiled-coil*), que quando fosforilada é encaminhada à região centrossômica. A TACC forma um complexo com proteínas que se associam à microtúbulos (MSPs/XMAP215), estimulando a polimerização dos mesmos (MARUMOTO et al., 2005). Na separação centrossômica, a Aurora A fosforila a HsEg5, proteína motora, auxiliando no processo de migração dos centrossomos para os pólos opostos (CASTILLO et al., 2007). A Aurora A interage com a proteína TPX2 (*targeting protein for XKLP2*), a qual representa não apenas um substrato, mas também um ativador da Aurora A. Tal interação é relevante para a montagem do fuso mitótico. A entrada em mitose ocorre devido a fosforilação da proteína Ajuba pela Aurora A, evento este que recruta os complexos ciclina B-cdk1 responsáveis pela transição G2/M (CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005).

A Aurora A também está envolvida com o alinhamento cromossômico na placa metafásica por promover a fosforilação da proteína CENP-A, cuja ativação é essencial para a composição e organização dos cinetócoros. Assim, essa fosforilação é importante não apenas para a ligação dos microtúbulos, mas também para o alinhamento e segregação cromossômica. A Aurora B participa do processo de ligação dos microtúbulos aos cinetócoros.

Os mecanismos envolvidos na citocinese são regulados pelas Auroras A e B, embora esta última tenha uma participação maior (MARUMOTO et al., 2005). Alterações no padrão de expressão das Auroras determinam anormalidades em vários estágios da mitose que incluem amplificação centrossômica, divisão não equivalente do material genético e falhas na citocinese originando alterações na ploidia (CASTILLO et al., 2007; CARMENA e EARNSHAW, 2003; MARUMOTO et al., 2005; DE LUCA et al., 2006), o que contribui para o processo de carcinogênese.

Em estudo recente observou-se que a inibição da expressão de Aurora A por RNA de interferência (RNAi) ou por microinjeção de anticorpos promoveu falhas nos processos de alinhamento e segregação cromossômica, contudo algumas células completaram a divisão mitótica, o que indica falhas no ponto de checagem mitótico. Foram observadas também pontes cromatínicas na telófase, o que contribui para a regressão da citocinese e determinação de tetraploidia ou aneuploidia (HOAR et al., 2007). Shi e King (2005) demonstraram que a regressão da citocinese em células tumorais leva ao surgimento de células tetraplóides, as quais podem originar células aneuplóides nos próximos ciclos de divisão. Esses autores sugerem que a Aurora A pode estar diretamente envolvida na regressão da citocinese.

No fígado, desvios nos valores normais de ploidia estão associados tanto a eventos fisiológicos normais como patológicos incluindo a carcinogênese. Lu et al. (2007) demonstraram que populações de hepatócitos normais poliplóides 4N e 8N são constituídas por células binucleadas (70% e 80%, respectivamente), entretanto não foram observadas alterações no padrão de expressão gênica nessas células poliplóides, ao contrário do que ocorre em hepatocarcinoma, onde se observa desvios de ploidia com alterações no perfil de expressão e, em geral, o conteúdo de DNA é aneuploide e está associado com instabilidade genética.

#### **1.4 Citoesqueleto e terapias antitumorais**

Portadores de hepatocarcinoma têm como sobrevida média de um ano. No momento do diagnóstico apenas 40% dos pacientes são candidatos a terapias convencionais que compreendem cirurgia (transplante ou ressecção hepática), quimioterapia e radioterapia. Desta forma, muito tem sido estudado para que novas abordagens terapêuticas sejam aplicadas em pacientes que não são aptos aos tratamentos convencionais.

Algumas moléculas têm sido utilizadas como agentes antitumorais por serem capazes de interferir no ciclo celular agindo de forma direta sobre o citoesqueleto. Estes agentes atuam sobre proteínas que controlam parte da orquestra de eventos que são realizadas pelos microtúbulos, os quais correspondem a um dos principais constituintes do citoesqueleto. Sabe-se que estes têm papel fundamental durante a divisão celular, já que estão relacionados com eventos mitóticos importantíssimos, como o alinhamento cromossômico na placa metafásica e a separação das cromátides irmãs (MITCHISON, 2010). Foi observado que estes agentes antitumorais podem ser alvo-específicos para microtúbulos, uma vez que seu uso causa distúrbios na sua função, podendo ocasionar formação de fusos monopolares ou de forma geral, bloqueio celular da mitose (SAITO, 2009).

Os microtúbulos são estruturas filamentosas compostas por heterodímeros de tubulina  $\alpha$  e  $\beta$ . Sua polimerização depende de uma área de nucleação, constituído por polímeros curtos a partir dos quais irá ocorrer o processo conhecido como alongação, no qual ocorre adição não-covalente de novas subunidades, sendo este processo reversível e dinâmico (SAITO, 2009). O processo dinâmico entre polimerização e despolimerização é importante para a divisão celular, sendo necessário para o crescimento e retração dos filamentos de forma que os microtúbulos associem-se aos cinetócoros dos cromossomos e sejam capazes de posteriormente separá-los.

Estudos demonstram que freqüentemente ocorrem alterações no citoesqueleto de células tumorais, o que permite que estas células se tornem hábeis na realização de atividades diferenciadas das células normais, como crescimento anormal, habilidade de aderência a diferentes tecidos e metástase (FRIEDL e BRÖCKER, 2000).

Os microtúbulos são considerados estruturas muito importantes por desenvolver tarefa fundamental na divisão celular. Devido a sua importância neste evento e pela sua função, agentes vem sendo estudados para atuar na sua estrutura, permitindo não só a sua estabilização, como também a sua desestabilização (MITCHISON, 2010).

Alguns compostos foram amplamente pesquisados e são eles conhecidos como venenos do fuso, nome este que se deve ao efeito que causa

no mesmo durante o período de divisão celular. O primeiro agente antimitótico caracterizado foi a colchicina, posteriormente a este, outros alcalóides derivados da vinca como vincristina, vimblastina e vindesina foram descobertos. Sabe-se que estes possuem a capacidade de desestruturar os microtúbulos, impedindo, portanto a sua estabilidade (JOHNSON et al., 1963; SAITO, 2009). Outras substâncias também foram estudadas e mostraram características inversas. Estes agentes são conhecidos como taxóides e são capazes de manter os microtúbulos estáveis (RINGEL e HORWITZ, 1991; MANFREDI e HORWITZ, 1991).

Sabe-se que células submetidas a tratamentos com as drogas supracitadas sofrem bloqueio na fase M, mas que o retorno às condições normais de cultura celular pode causar diferentes efeitos, como continuidade pelo ciclo celular e finalização da divisão, encaminhamento destas células para apoptose ou para a formação de células tetraplóides e/ou aneuplóides por regressão de citocinese (MCGROGAN et al., 2008).

Na última década, novos compostos têm sido testados como agentes antitumorais, que incluem VX680, VE465, PHA680632, AZD1152, MLN8054 e ZM447439. Entretanto, estes agentes não têm como alvo os microtúbulos, mas sim outra proteína diretamente relacionada a desordens durante o ciclo celular, a Aurora A. Testes *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que esses agentes podem inibir as Auroras quinases atuando como agentes anti-mitóticos para a utilização como drogas antitumorais em possíveis terapias (CHENG et al., 2009; EYERS et al., 2007).

Foi observado que os níveis de expressão de Aurora A estão aumentados em 60% dos casos de HCC (KATAYAMA et al., 2003; JENG et al., 2004; MARUMOTO et al., 2005), aspecto que tem sido associado à maior malignidade e pior prognóstico da doença (JENG et al., 2004), fazendo com que esta proteína seja uma possível candidata a terapia alvo-específica. Portanto, compostos específicos para Aurora A têm sido testados quanto a sua habilidade de inibir a atividade de Aurora quinases.

O inibidor VX-680, também conhecido como MK-0457 foi o primeiro inibidor de Aurora quinase a demonstrar amplo efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo*, bem como seu análogo VE-465, o qual reprime a viabilidade de células tumorais derivadas de fígado, interferindo na mitose e causando a formação de mitoses aberrantes, causando o bloqueio do ciclo celular e a indução de morte celular por apoptose (LIN et al., 2009). Outro composto utilizado para estudos em hepatocarcinoma foi o composto PHA-739358, que também se mostrou efetivo como agente antitumoral (BENTEN et al., 2009).

O composto 4'(4`-Benzamidoanilino)-6,7-dimethoxyquizanolina (BADIM) foi recentemente desenvolvido e também tem atividade de inibição da aurora quinase (MELMED et al., 2008). Entretanto, a literatura não apresenta informações sobre seus efeitos em HCC. Desta forma, é relevante o estudo mais detalhado dos efeitos desta droga sobre a biologia celular do HCC, enfocando principalmente o ciclo celular para que seja possível o estabelecimento de novas terapias.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi apresentado neste trabalho quanto ao uso do inibidor de Aurora quinase, BADIM, sobre células HepG2, podemos inferir que:

- O tratamento com inibidor apresentou efeito antiproliferativo em todas as concentrações estudadas quando comparado ao grupo controle, não exposto ao agente.
- Aumento na frequência de células tetraplóides foi observado após tratamento por 24 horas na concentração de 1200nM e após 48 nas concentrações de 300nM, 600nM e 1200nM.
- Bloqueio de células em G2/M do ciclo celular foi observado em 24 e 48 horas após tratamento com as concentrações estudadas de BADIM.
- Alterações morfológicas foram observadas utilizando a concentração de 300nM, como presença de divisões celulares originando três células filhas a partir de uma única célula mãe após 24 horas de tratamento, aumento na frequência de células formando fusos monopolares após 48 horas de tratamento, bem como presença de células binucleadas.
- As concentrações de 600nM e 1200nm levaram a alterações na morfologia celular, causando aumento na quantidade de células binucleadas ou gigantes e presença de prolongamentos incomuns de microtúbulos em células em divisão após 24 e 48 horas de tratamento.
- Frequências aumentadas de alterações nucleares foram observadas para todas as concentrações do inibidor a partir de 8 horas de tratamento, levando ao aparecimento de mitoses atípicas, apresentando células em metáfase com incorreto alinhamento cromossômico.
- Indução de morte celular foi observada a partir de 24 e 48 horas para as concentrações de 600nM e 1200nM.



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ANDREWS, P. D. Aurora Kinases: shining lights on the therapeutic horizons. **Oncogene**, v. 24, p. 5005-15, 2005.

ANZOLA, M.; SAIZ, A.; CUEVAS, N.; LOPEZ-MARTINEZ, M.; MARTINEZ DE PANCORBO, M. A.; BURGOS, J. J. High levels of p53 protein expression do not correlate with p53 mutations in hepatocellular carcinoma. **J. Viral. Hepat.**, v. 11, n. 3, p. 502-10, 2004.

BENTEN, D.; KELLER, G.; QUAAS, A.; SCHRADER, J.; GONTAREWICZ, A.; BALABANOV, S.; BRAIG, M.; WEGE, H.; MOLL, J.; LOHSE, A. W.; BRUMMENDORF, T. H. Aurora kinase inhibitor PHA-739358 suppresses growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in a xenograft mouse model. **Neoplasia**, v. 11, n. 9, p. 934-44, 2009.

BHARADWAJ, R.; YU, H. The spindle checkpoint, aneuploidy and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 11, p. 2016-27, 2004.

BROWN, G.; HUGHES, P. J.; MICHELL, R. H. Cell differentiation and proliferation--simultaneous but independent? **Exp. Cell Res.**, v. 291, n. 2, p. 282-8, 2003.

CARMENA, M; EARNSHAW, W. C. The Cellular Geography of Aurora Kinases. **Nature**, v. 4, p. 842-854, 2003.

CARVAJAL, R. D.; TSE, A.; SCHWARTZ, G. K. Aurora Kinases: New targets for cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 6869-75, 2006.

CASTILLO, A; MORSE, H. C 3<sup>rd</sup>; GODFREY, V. L.; NAEEM, R.; JUSTICE, M. J. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. **Cancer Res.**, v. 67, n. 21, p. 10138-47, 2007.

CHAN, A. O. O.; YUEN, M. F.; LAM, C. M.; FONG, C. Y.; WONG, B. C. Y.; LAI, C. L. Prevalence and characteristics of familial hepatocellular carcinoma caused by chronic hepatitis B infection in Hong Kong. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 19, p. 401-6, 2004.

CHEN, C. Y.; LU, C. L.; CHIU, C. F. Primary biliary cirrhosis associated with mixed type autoimmune hemolytic anemia and sicca syndrome. A case report and review of literature. **Am. J. Gastroentent**, v. 92, n. 9, p. 1547-4549, 1997.

CHENG, A. L.; LIN, Z. Z.; HSU, H. C.; HSU, C. H.; YEH, P. Y.; HUANG, C. Y. F.; HUANG, Y. F.; CHEN, T. J.; KUO, S. H.; HSU, C.; HU, F. C.; JENG, Y. M.; CHUNG, Y. The Aurora kinase inhibitor VE-465 has anticancer effects in pre-

---

<sup>1</sup> De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

clinical studies of human hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.**, v. 50, p. 518-527, 2009.

CHI, Y.H.; JEANG KT. Aneuploidy and cancer. **J. Cell Biochem.**, v. 102, n. 3, p. 531-8, 2007.

DAR, A. A.; BELKHIRI, A.; ECSEDY, J.; ZAIKA, A.; EL-RIFAI, W. Aurora Kinase A inhibition leads to p73-dependent apoptosis in p53-deficient cancer cells. **Cancer Res.**, v. 68, n. 21, p. 8998-9004, 2008.

DAR, A. A.; ZAIKA, A.; PIAZUELO, M. B. Frequent overexpression of Aurora kinase A in upper gastrointestinal adenocarcinomas correlates with potent antiapoptotic functions. **Cancer**, v. 112, p. 1688-98, 2008.

DE LUCA, M; LAVIA, P.; GUARGUAGLINI, G. A Functional Interplay Between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at Spindle Poles: Plk1 Controls Centrosomal Localization of Aurora-A and TPX2 Spindle Association. **Landes Biosci.**, v. 5, n. 3, p. 296-303, 2006.

DIETERICH, K.; RIFO, R. S.; FAUREL, A. K.; HENNEBICQ, S.; AMAR, B. B.; ZAH, M.; PERRIN, J.; MARTINEZ, D.; SELE, B.; JOUK, P. S.; OHLMANN, T.; ROUSSEAU, S.; LUNARDI, J.; RAY, P. F. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 5, p. 661-665, 2007.

DONATO, F.; GELATTI, U.; TAGGER, A.; FAVRET, M.; RIBEIRO, M. L.; CALLEA, F.; MARTELLI, C.; SAVIO, A.; TREVISI, P.; NARDI, G. Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatitis C and B virus infection, alcohol intake, and hepatolithiasis: a case-control study in Italy. **CCC, Cancer causes control.**, v. 12, n.10, p. 959-64, 2001.

DREIER, M. R.; GRABOVICH, A. Z.; KATUSIN, J. D.; TAYLOR, W. R. Short and long-term tumor cell responses to Aurora kinase inhibitors. **Exp. Cell Res.**, v. 315, p. 1085-1099, 2009.

EL-SARAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2557-76, 2007.

EYERS, P.A.; MARQUEZ, R.; SHPIRO, N.; TYLER, R.K. VX-680 Inhibits Aurora A and Aurora B Kinase Activity in Human Cells. **Cell Cycle**, v. 22, n. 6, p. 2846-2854, 2007.

FARAZI, P. A. e DEPINHO, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **Nat. Rev. Cancer**, v. 6, n. 9, p. 674-87, 2006.

FEITELSON, M. A.; SUN. B.; SATIROGLU TUFAN, N. L.; LIU, J.; PAN, J.; LIAN, Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Oncogene**, v. 21, n. 16, p. 2593-604, 2002.

FENG, J. T.; LIU, Y. K.; SONG, H. Y.; QIN, L. X.; ALMOFTI, M. R.; FANG, C. Y.; LU, H. J.; YANG, P. Y.; TANG, Z. Y. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. **Proteomics**, v. 5, n. 17, p. 4581-8, 2005.

FRIEDL, P.; BROCKER, E.B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 57, n. 1, p. 41-64, 2000.

GIANNINI, E.; RISSO, D.; BOTTA, F.; ROMAGNOLI, P.; MALFATTI, F.; FUMAGALLI, A.; TESTA, E.; PODESTA, E.; CHIARBONELLO, B.; POLEGATO, S.; TESTA, R. Prognosis of hepatocellular carcinoma in anti-HCV positive cirrhotic patients: a single-centre comparison amongst four different staging systems. **J. Intern. Med.**, v. 255, n. 3, p. 399-408, 2004.

GLOVER, D. M.; LEIBOWITZ, M. H.; MCLEAN, D. A.; PARRY, H. Mutations in Aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. **Cell**, v. 81, p. 95-105, 1995.

GÖRGÜN, G.; CALABRESE, E.; HIDESHIMA, T.; ECSEDY, J.; PERRONE, G.; MANI, M.; IKEDA, H.; BIANCHI, G.; HU, Y.; CIRSTEANU, D.; SANTO, L.; TAI, Y. T.; NAHAR, S.; SABIKUN, Z.; ZHENG, M.; BANDI, M.; CARRASCO, R. D.; RAJE, N.; MUNSHI, N.; RICHARDSON, P.; ANDERSON, K. C. A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma. **Blood**, v. 115, n. 25, p. 5202-5213, 2010.

HAKEM, R. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. **Embo J. (Online)**, v. 27, p. 589-605, 2008.

HANNON, G. J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 257-61, 1994.

HARRINGTON, E.A.; BEBBINGTON, D.; MOORE, J.; RASMUSSEN, R. K.; AJOSE-ADEOGUN, A. O.; NAKAYAMA, T.; GRAHAM, J. A.; DEMUR, C.; HERCEND, T.; DIU-HERCEND, A.; SU, M.; GOLEC, J. M.; MILLER, K. M. VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora Kinases, suppresses tumor growth in vivo. **Nat. Med**, v. 10, p. 262-267, 2004.

HASSAN, M. I.; KASSIM, S.K.; ALI, H.S.; SAYED EL-DA; KHALIFA, A. Evaluation of nitric oxide (NO) levels in hepatitis C virus (HCV) infection: relationship to schistosomiasis and liver cirrhosis among Egyptian patients. **Dis. Markers**, v.18, n. 3, p. 137-142, 2002.

HEDE, K. Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, n. 2, p. 87-89, 2005.

HIRAI, H.; ROUSSEL, M. F.; KATO, J. Y.; ASHMUN, R.A.; SHERR, C. J. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. **Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 5, p. 2672-81, 1995.

HOAR, K.; CHAKRAVARTY, A.; RABINO, C.; WYSONG, D; BOWMAN, D.; ROY, N.; ECSEDY, J. A. MLN8054, a Small-Molecule Inhibitor of Aurora A, Causes Spindle Pole and Chromosome Congression Defects Leading to Aneuploidy. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 12, p. 4513-4525, 2007.

HUANG, H. C.; SHI, J.; ORTH, J. D.; MITCHISON, T. J. Cell death when the SAC is out of commission. **Cell Cycle**, v. 9, n.11, p. 2453-98, 2010.

HUNTER, T.; PINES, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 573-82, 1994.

IONTA, M. **O efeito do ácido retinóico sobre células normais e tumorais de fígado**: uma perspectiva promissora em terapia de diferenciação para hepatocarcinoma. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

IRSHAD, M.; DHAR, I.; JOSHI, Y. K. Significance of hepatitis C virus core protein in the diagnosis of hepatitis C virus infection in different liver diseases. **J. Investig. Med.**, v. 54, n. 8, p. 478-83, 2006.

IRWIN, M. S.; MILLER, F. D. p73:regulator in cancer and neural development. **Cell Death Differ.**, v. 11, p.17-22, 2004.

JALLEPALLI, P. V.; LENGAUER, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, n. 2, p. 109-17, 2001.

JENG, Y. M; PENG, S. Y; LIN, C. Y; HSU, H. C. Overexpression and amplification of Aurora-A in Hepatocellular Carcinoma. **Clin. Cancer Res. (Online)**, v. 10, p. 2065-2071, 2004.

JOHNSON, I. S; ARMSTRONG, J. G; GORMAN, M; Jr, P.B. The vinka alkaloids: a new class of oncolytic agents. **Cancer Res.**, v. 23, 1963.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, p.153-64, 2002.

KAMADA, K.; YAMADA, Y.; HIARO, T. Amplification/overexpression of Aurora kinase A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis. **Oncol. Rep.**, v. 12, p. 593-9, 2004.

KATAYAMA, H.; BRINKLEY, W. R.; SEN, S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 22, n. 4, p. 451-64, 2003.

KATAYAMA, H.; SASAI, K.; KAWAI, H. Phosphorylation by Aurora kinase A induces Mdm-2 destabilization and inhibition of p53. **Nat. Genet.**, v. 36, p. 55-62, 2004.

KEEN, N. J.; TAYLOR, S. S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 927-36, 2004.

KIERSZEMBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p. 499-509.

KIMMINS, S; CROSSIO, C.; KOTAJA, N; HIRAYAMA, J.; MONACO, L.; HOOG, C.; VAN DUIN, M.; GOSSEN, J. A.; SASSONE-CORSI, P. Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, n. 3, p. 726-39, 2006.

KING, R. W.; DESHAIES, R. J.; PETERS, J. M.; KIRSCNER, M. W. How proteolysis drives the cell cycle. **Science**, v. 274, p. 1652, 1996.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWART, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat. Res**, v. 504, n. 1-2, p. 137-48, 2002.

KO, L. J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes Dev.**, v. 10, p. 1054-72, 1996.

KREMSDORF, D.; SOUSSAN, P.; PATERLINI-BRECHOT, P. ; BRECHOT, C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 25, p. 3823-33, 2006.

KUFER, T. A.; NIGG, E. A.; SILLJ, H. H. W. Regulation of Aurora-A kinase on the mitotic spindle. **Chromosoma**, v. 112, p. 159-163, 2003.

KULKARNI, K.; BARCAK, E.; EL-SERAG, H. GOODGAME, R. The impact of immigration on the increasing incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 20, n. 4, p. 445-450, 2004.

KWUN, H.J.; JANG, K.L. Dual effects of hepatitis C virus Core protein on the transcription of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene. **J. Viral Hepat.**, v. 10, n. 4, p. 249-55, 2003.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-9, 1998.

LI, X; NICKLAS, R. B. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. **Nature**, v. 373, p. 630, 1995.

LI, Y.; ZHANG, Z. F.; CHEN, J.; HUANG, D.; DING, Y.; TAN, M. H.; QIAN, C. N.; RESAU, J. H.; KIM, H.; THE, B. T. VX-680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma. **Am. J. Transl. Res.**, v. 2, n. 3, p. 296-308, 2010.

LIN, B.; WHITE, J.T.; WU, J.; LELE, S.; OLD, L.J.; HOOD, L.; ODUNSI, K. Deep depletion of abundant serum proteins reveals low-abundant proteins as potential biomarkers for human ovarian cancer. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 3, n. 7, p. 853-861, 2009.

LIU, Q.; KANEDO, S.; YANG, I. Aurora A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 52175-82, 2004.

LLOVET, J. M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. **Lancet.**, v. 362, n. 9399, p. 1907-17, 2003.

LLOVET, J. M.; MÍNGUEZ, B.; TOVAR, V.; CHIANG, D.; VILLANUEVA, A. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma and molecular therapies. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, p. 186-194, 2009.

LU, P.; PROST, S.; CALDWELL, H.; TUGWOOD, J. D.; BETTON, G. R.; HARRISON, D. J. Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy. **Mamm. Genome**, v. 18, p. 617-626, 2007.

LUKAS, J.; BARTEK, J. Watching the DNA Repair Ensemble Dance. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 666-668, 2004.

MARKS, J. R.; DAVIDOFF, A. M.; KERNS, B. J. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 51, p. 2979-84, 1991.

MARUMOTO, T.; ZHANG, D.; SAYA, H. Aurora A - A Guardian Of Poles. **Nature**, v. 5, p. 42-50, 2005.

MATSUO, M. Association between diabetes mellitus and hepatocellular carcinoma: results of a hospital- and community-based case-control study. **Kurume Med. J.**, v. 50, n. 3-4, p. 91-98, 2003.

MATSUSHIME, H.; EWEN, M. E.; STROM, D. K.; KATO, J. Y.; HANKS, S. K.; ROUSSEL, M. F.; SHERR, C. J. Identifications and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 323-334, 1992.

MCCLAIN, M.T.; SCOFIELD, R.H.; KURIEN, B.T.; GROSS, T.F.; JAMES, J.A. Selective small antigenic structures are capable of inducing widespread autoimmunity which closely mimics the humoral fine specificity of human SLE. **Scand. J. Immunol.**, v. 56, n. 4, p. 399-407, 2002.

MCGROGAN, B. T.; GILMARTIN, B.; CARNEY, D. N.; MCCANN, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. **Biochem. Biophys Acta**, v. 1785, n. 2, p. 96-132, 2008.

MCKILLOP, I. H.; SCHRUM, L. W. Alcohol and liver cancer. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p. 195-203, 2005.

MELINO, G.; LU, X.; GASCO, M.; CROOK, T.; KNIGHT, R. A. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, p. 663-70, 2003.

MELMED, S.; TONG, Y.; BEN-SHLOMO, A.; ZHOU, C.; WAWROWSKY, K. Pituitary tumor transforming gene 1 regulates Aurora kinase A activity. **Oncogene**, v. 27, p. 6385-6395, 2008.

MORGAN, D. O. Principles of CDK regulation. **Nature**, v. 374, n. 6518, p. 131-4, 1995.

NAKAGAWA, E. K. **Estudo do significado biológico da multinucleação induzido por vincristina em células em cultura**. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NIGG, E. A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 11, p. 815-25, 2002.

OZAKI, T; NAKAGAWARA, A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. **Cancer Sci.**, v. 96, p. 729-37, 2005.

REITER, R.; GAIS, P.; JUTTING, U. Aurora A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 12, p. 5136-41, 2006.

RIEDER, C. L.; SCHULTZ, A.; COLE, R.; SLUDER, G. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. **J. Cell. Biol.**, v. 127, p. 1301, 1994.

RINGEL, I.; HORWITZ, S. B. Effect of alkaline pH on taxol-microtubule interactions. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 259, n. 2, p. 855-60, 1991.

SAITO, S. Toxins affecting actin filaments and microtubules. **Prog. Mol. Subcell Biol.**, v. 46, p. 187-219, 2009.

SARBAH, S. A.; GRAMLICH, T.; YOUNOSA, A.; OSMACK, P.; GOORMASTIC, M.; GROSSO, L.; COOPER, J. N.; DI BISSEGLIE, A.; SENECA, R.; YOUNOSS, Z. M. Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, n. 5, p. 850-853, 2004.

SASAI, K.; KATAYAMA, H.; STENOIEN, D. L.; FUJII, S.; HONDA, R.; KIMURA, M.; OKANO, Y.; TATSUKA, M.; SUZUKI, F.; NIGG, E. A.; EARNSHAW, W. C.; BRINKLEY, W. R.; SEN, S. Aurora-C Kinase Is a Novel Chromosomal Passenger Protein That Can Complement Aurora-B Kinase Function in Mitotic Cells. **Cell Motil. Cytoskelet.**, v. 59, p. 249–263, 2004.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTA, M.; HUANG, X.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, J.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proc. Natt. Acad. Sci USA**, v. 97, n. 1, p. 303-8, 2002.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 704-707, 1993.

SHAPIRO, G. I. Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 11, p. 1770-1783, 2006.

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

SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P. Epidemiology of hepatitis B and hepatitis B virus infection in United States children. **Ped. Infect. Dis. J.**, v. 24, n. 9, p. 755-60, 2005.

SHI, Q.; KING, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. **Nature**, v. 437, p. 1038-1042, 2005.

SHIMODAIRA, H.; YOSHIOKA-YAMASHITA, A.; KOLODNER, R. D.; WANG, J. Y. Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 2420-5, 2003.

SHIMOMURA, T.; HASAKO, S.; NAKATSURU, Y.; MITA, T.; ICHIKAWA, K.; KODERA, T.; SAKAI, T.; NAMBU, T.; MIYAMOTO, M.; TAKAHASHI, I.; MIKI, S.; KAWANISHI, N.; OHKUBO, M.; KOTANI, H.; IWASAWA, Y. MK-5108, a Highly Selective Aurora-A Kinase Inhibitor, Shows Antitumor Activity Alone and in Combination with Docetaxel **Mol. Cancer Ther.**, v. 9, n. 1, p. 157-166, 2010..

SHIN, H. R. Epidemiology of hepatitis C virus in Korea. **Intervirolology**, v. 49, n. 1-2, p. 18-22, 2006

TANAKA, E.; HASHIMOTO, Y.; ITO, T. The clinical significance of Aurora A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, p. 1827-34, 2005.

TATSUKA, M. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and Ipl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. **Cancer Res.**, v. 58, p. 4811-4816, 1998.

THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nat. Genet.**, v. 31, n. 4, p. 339-46, 2002.

TOMITA, M.; MORI, N. Aurora A selective inhibitor MLN8237 suppresses the growth and survival of HTLV-1-infected T-cells in vitro. **Cancer Sci.**, v. 101, n. 5, p. 1204-1211, 2010.



TYLER, R. K.; SHPIRO, N.; MARQUEZ, R.; EYERS, P. A. VX-680 inhibits Aurora A and Aurora B kinase activity in human cells. **Cell Cycle**, v. 6, n. 22, p. 2846-2854, 2007.

VADER, G.; LENS, S.M. The Aurora kinase family in cell division and cancer. **Biochem. Biophys Acta**, v. 1786, n. 1, p. 60-72, 2008.

VADER, G.; MEDEMA, R. H.; LENS, S. M. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. **J. Cell Biol.**, v. 173, n. 6, p. 833-7, 2006.

VIDAL, A.; KOFF, A. *Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause.* **Gene**, v. 247, n. 1-2, p. 1-15, 2000.

VILLANUEVA, A.; NEWELL, P.; CHIANG, D. Y.; FRIEDMAN, S. L.; LLOVET, J. M. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. **Semin. Liver Dis**, v. 27, n.1, p. 55-76, 2007.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nat. Med.**, v. 10, n. 8, p. 789-99, 2004.

YAN, X.; CAO, L.; LI, Q.; WU, Y.; ZHANG, H.; SAIYIN, H.; LIU, X.; ZHANG, X.; SHI, Q.; YU, L. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. **Genes Cells**, v. 10, p. 617-626, 2005.

ZAICA, A. I.; EL-RIFAI, W. The role of p53 protein family in gastrointestinal malignancies. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 935-40, 2006.

ZHOU, H.; KUANG, J.; ZHONG, L. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nat. Genet.**, v. 20, p. 189-93, 1998.

ZHU, J.; JIANG, J.; ZHOU, W.; CHEN, X. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. **Cancer Res.**, v. 58, p. 5061-5, 1998.

ZUCMAN-ROSSI, J.; LAURENT-PUIG, P. Genetic diversity of hepatocellular carcinomas and its potential impact on targeted therapies. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 8, p. 997-1003, 2007.