Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

LUIZA MARCONDES FERRAZ PRIMO

O PAPEL DA CICLINA E1 NO ESTRESSE REPLICATIVO E NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

Orientador: Dr. Leonardo Karam Teixeira

RIO DE JANEIRO
2017

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

LUIZA MARCONDES FERRAZ PRIMO

O PAPEL DA CICLINA E1 NO ESTRESSE REPLICATIVO E NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Dr. Leonardo Karam Teixeira

RIO DE JANEIRO
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Palavras-chave: 1. Ciclo celular 2. Ciclina E 3. Estresse replicativo 4.Instabilidade genômica 5. Câncer de mama.

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

LUIZA MARCONDES FERRAZ PRIMO

O PAPEL DA CICLINA E1 NO ESTRESSE REPLICATIVO E NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

Orientador: Dr. Leonardo Karam Teixeira

Aprovada em: _____/_____/_____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho **- Presidente**
Prof. Dr. Juan Clinton Llerena Junior
Prof. Dr. Rodrigo Alves Portela Martins
Profa. Dra. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá
Prof. Dr. Francisco Meirelles Bastos de Oliveira

RIO DE JANEIRO
2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã, pelo apoio em todos os momentos e pelo conforto nos dias mais difíceis. Eu amo vocês.

Ao Felipe, obrigada pelo grande apoio, incentivo e por acreditar em mim sempre, mesmo quando eu não acreditei que fosse conseguir.

Ao meu orientador Leonardo, por me orientar e ensinar da melhor forma possível. Obrigada por ter dividido esse projeto comigo, por ter acreditado em mim, pela confiança, por toda a (enorme) paciência e por ser um excelente chefe. É muito bom aprender com quem ama o que faz, e você é um claro exemplo disso. Mil vezes obrigada por tudo!

Ao Dr. João Viola, por todo o apoio que nos deu durante a execução deste projeto e a todos do Programa de Biologia Celular: grupos do Leo, João, Possik, Pat e Miriam, Matheus e Karina. Vocês foram parte fundamental para que esse trabalho acontecesse da melhor forma. Sou muito feliz por ter convivido com cada um de vocês. Obrigada por serem tão disponíveis e por sempre doarem uma parte do tempo de vocês para me explicar e ensinar, e também pelos momentos de descontração.

À Aleksandra, Amanda e Lucas por tornarem nossos dias mais fáceis e alegres com seu eficiente trabalho (e por todas as doações de chocolate).

À Ana Beatriz Santoro, por ter me apresentado ao Leo e por ter me ensinado a dar os primeiros passos na pesquisa acadêmica.

Ao Departamento de Genética do Instituto Fernandes Figueira, em especial ao grupo do Dr. Juan Llerena, pela oportunidade de aprender sobre a Citogenética na prática com pessoas super experientes.

Ao Programa de Hematologia e Oncologia Pediátrica, por disponibilizarem o espaço e infraestrutura do laboratório para que pudéssemos fazer os experimentos de FISH e contagem de cromossomos, em especial à Caroline Barbieri. Carol, muito obrigada por me ajudar, ensinar e aprender junto comigo sobre citogenética. Sua alegria e animação fizeram toda a diferença.

À todas as agência de fomento que permitiram com que esse trabalho fosse realizado.

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

O PAPEL DA CICLINA E1 NO ESTRESSE REPLICATIVO E NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUIZA MARCONDES FERRAZ PRIMO

A ciclina E, juntamente com Cdk2, é um regulador importante da transição das fases G1/S do ciclo celular, promovendo o início e a progressão da síntese de DNA. Em alguns tipos de câncer, como o câncer de mama, os níveis de ciclina E se encontram desregulados, correlacionando com um estágio avançado do tumor e mau prognóstico. Níveis elevados de ciclina E interferem com a montagem de complexos pré-replicativos e retardam a progressão das forquilhas de replicação, levando ao fenômeno de estresse replicativo e eventualmente a instabilidade genômica. No entanto, as alterações genômicas causadas pela desregulação da ciclina E ainda não foram totalmente investigadas. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que altos níveis de ciclina E1 retardam a progressão pela fase S, permitindo que células entrem em mitose antes do término da replicação do DNA. A replicação incompleta do DNA induz aberrações cromossômicas em regiões genômicas específicas, como sítios frágeis. O objetivo deste projeto é avaliar o efeito da desregulação de ciclina E1 na instabilidade genômica de células epiteliais da mama ao longo da proliferação celular. Para estabelecer o modelo de estresse replicativo, células do epitélio da mama humana imortalizadas (HME1) foram transduzidas com adenovírus controle (Adv-Controle) ou com adenovírus que codifica o cDNA de ciclina E1 humana (Adv-Ciclina E1). Como controle positivo, foram utilizadas as linhagens celulares de câncer da mama SUM149PT e MDA-MB-157, que têm níveis aumentados de ciclina E1. Nossos resultados indicam que altos níveis de ciclina E1 não interferem com a proliferação de células HME1. Contudo, análises de citometria de fluxo indicam que altos níveis de ciclina E1 reduzem o número de células na fase G1, reduzem a progressão pela fase S e atrasam a entrada nas fases G2/M ao longo de 7 dias. A desregulação de ciclina E1 não induz a morte celular, mas induz eventos de poliploidia. Células HME1 tratadas com a afidicolina, um inibidor de DNA polimerase, progridem mais lentamente pela fase S, mas não apresentam alterações na morte celular ou poliploidia. Além disso, células HME1 com desregulação de ciclina E1 apresentam aberrações cromossômicas, como endorreduplicação, hiperfragmentação cromossômica e separação prematura de cromátides irmãs quando comparadas com células controle. No momento, estamos avaliando a instabilidade de sítios frágeis específicos em células HME1 com altos níveis de ciclina E1 usando Hibridização Fluorescente *In Situ* (FISH). Além disso, células HME1 com níveis elevados de ciclina E1 serão analisadas através de cariótipo por bandeamento G. O objetivo deste projeto é contribuir para a caracterização das alterações genéticas mediadas por ciclina E1 durante a carcinogênese da mama.

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-Graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

O PAPEL DA CICLINA E1 NO ESTRESSE REPLICATIVO E NA INSTABILIDADE GENÔMICA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MAMA

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LUIZA MARCONDES FERRAZ PRIMO

Cyclin E, together with Cdk2, is an important regulator of the G1/S phase transition in the cell cycle, promoting the initiation and progress of DNA synthesis. In some types of cancer, such as breast cancer, cyclin E levels are deregulated, correlating with advanced tumor stage and poor prognosis. High levels of cyclin E interfere with the assembly of pre-replication complexes and slow the progression of replication forks, leading to the phenomenon of replication stress and eventually genomic instability. However, the genomic alterations caused by cyclin E deregulation have not been fully investigated. Previous data from our group demonstrated that high levels of cyclin E1 delay S phase progression, allowing cells to enter into mitosis before completion of DNA replication. Incomplete DNA replication induces chromosomal aberrations in specific genomic regions, such as fragile sites. The aim of this project is to evaluate the effect of cyclin E1 deregulation in genomic instability of mammary epithelial cells along cell proliferation. To establish the replication stress model, immortalized human mammary epithelial cells (HME1) were transduced with control adenovirus (Adv-Control) or with adenovirus encoding the human cyclin E1 cDNA (Adv-Cyclin E). As a positive control, the breast cancer cell lines SUM149PT and MDA-MB-157, which have increased levels of cyclin E1, were used. Here, we show that high levels of cyclin E1 do not interfere with proliferation of HME1 cells. However, flow cytometric analyzes indicate that high levels of cyclin E1 reduce the number of cells in G1 phase, slow progression through S phase, and delay G2/M phase entry over 7 days. Deregulation of cyclin E1 does not induce cell death, but induces polyploidy events. HME1 cells treated with aphidicolin, a DNA polymerase inhibitor, progress more slowly through S phase, but do not show changes in cell death or polyploidy. Furthermore, HME1 cells with cyclin E1 deregulation present chromosome aberrations, such as endoreduplication, chromosome hyperfragmentation, and premature separation of sister chromatids when compared to control cells. At the moment, we are evaluating the instability of specific fragile sites in HME1 cells with high levels of cyclin E1 using Fluorescent In Situ Hybridization (FISH). In addition, HME1 cells with high levels of cyclin E1 will be analyzed through G-banding karyotype. This project aims to contribute for the characterization of cyclin E1-mediated genetic alterations during breast carcinogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

Adv – Adenovírus

APC – Complexo promotor da anafáse

ATM – Mutação de ataxia telangiectasia

ATR – Relacionado a ataxia telangiectasia e Rad3

BIR – Replicação induzida por quebras

BRCA1 – Câncer de mama 1

BRCA2 – Câncer de mama 2

BrdU – Bromodeoxiuridina

BSA – Albumina do soro bovino

CBP – Proteína de ligação a CREB

CCNE1 – Ciclina E1

CCNE2 – Ciclina E2

CDC – Ciclo de divisão celular

CDK – Cinase dependente de ciclina

CDKN2A – Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A

cDNA – DNA complementar

CDT1 – Fator de replicação do DNA e licenciamento de cromatina 1

CHK1 – Cinase de ponto de checagem 1

CHK2 – Cinase de ponto de checagem 2

CIP/KIP – Proteína de interação com Cdk/Proteína inibitória de cinase

CKI – Inibidor de cinase dependente de ciclina

CLS – Sinal de localização de centrossomo

CP110 – Proteína *coiled-coil* centriolar de 110 kDa

CUL-3 – *Cullin* 3

DAPI – 4´,6-diamidino-2-fenil-indol

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DNA – Ácido desoxiribonucleico

E2F – Fator de ligação ao promotor E2

EDTA – Ácido tetra-acético etilenodiamino

FBXW7 – Proteína 7 que contém repetições F-box/WD-40

FHIT – Tríade de histidina frágil

FOXO – *Forkhead box O (Ordem alfabética)*

FRA – Sítio frágil

G – Intervalo

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HEK293A – Rim embrionário humano 293 para adenovírus

HER2 – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

HME1 – Epitélio da mama humana 1

hTERT – Transcriptase reversa da telomerase humana

INK4 – Inibidores de cdk4

LMWI – Isoformas de baixo peso molecular

M – Mitose

MCM – Manutenção de minicromossomos

MLL – Leucemia de linhagem mista

MSI – Instabilidade de microssatélite

NLS – Sinal de localização nuclear

NPAT – Proteína nuclear co-ativadora de transcrição de histonas

NPM – Nucleofosmina

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORC – Complexo de reconhecimento de origem

ORI – Origem de replicação

PBS – Salina tamponada com fosfato

PP2A – Fosfatase 2A

Pre-RC – Complexo pré-replicativo

R – Restrição

RAD21 – Reparo a radiação 21

RB – Retinoblastoma

RNA – Ácido ribonucleico

S – Síntese

SA – Antígeno estromal

SCF – Complexo que contém Skp/Cullin/F-box

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFC – Sítio frágil comum

SGO1 – *Shugoshin 1*

SMC – Manutenção estrutural de cromossomos

TBS – Salina tamponada com Tris

TGF-β – Fator de crescimento transformante beta

WWOX – Oxiredutase que contém domínio WW

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. As fases e o controle do ciclo celular.....9

Figura 1.2. Estrutura protéica de ciclina E1.....11

Figura 1.3. Principais funções de ciclina E.....12

Figura 1.4. Fontes de estresse replicativo.....14

Figura 1.5. Mecanismos de indução de instabilidade genômica por ciclina E-Cdk2.19

Figura 4.1. Indução dos níveis de ciclina E1 em células HME1 é similar aos níveis observados em linhagens de câncer de mama.....31

Figura 4.2. Níveis protéicos de ciclina E1 em células HME1 atingem um pico de síntese em 18-24 horas após a transdução com adenovírus.....33

Figura 4.3. Altos níveis de ciclina E1 não alteram o número de células HME1 ao longo de 7 dias.....36

Figura 4.4. Altos níveis de ciclina E1 induzem alteração na progressão do ciclo celular de células HME1.....39

Figura 4.5. Altos níveis de ciclina E1 não alteram a frequência de células HME1 com conteúdo de DNA Sub-G0 mas induzem poliploidia.....43

Figura 4.6. Altos níveis de ciclina E1 retardam a progressão pela fases e a entrada nas fases G2/M o ciclo celular.....50

Figura 4.7. Afidicolina induz estresse replicativo em células HME1.....53

Figura 4.8. Altos níveis de ciclina E1 induzem alterações cromossômicas em células HME1.....55

Figura 4.9. Células HME1 apresentam dois sinais específicos para cada um dos sítios frágeis FRA3B e FRA16D.....62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1. Câncer de mama..... 1
1.2. Mecanismos de carcinogênese..... 4
1.3. Instabilidade genômica..... 4
1.4. Ciclo celular..... 6
1.5. Ciclina E..... 10
1.6. Estresse replicativo..... 13
1.7. Sítios Frágeis Comuns..... 15
1.8. Ciclina E, estresse replicativo e instabilidade genômica..... 17

2. OBJETIVOS..... 21
2.1. Objetivo principal..... 21
2.2. Objetivos específicos..... 21

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 22
3.1. Linhagens celulares..... 22
3.2. Amplificação adenoviral..... 23
3.3. Transdução adenoviral..... 24
3.4. *Western blot*..... 24
3.5. Contagem de células..... 25
3.6. Citometria de fluxo..... 25
3.7. Preparação de cromossomos metafásicos..... 27
3.8. Coloração com Giemsa..... 28
3.9. *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH)..... 28
3.10. Análise estatística..... 28

4. RESULTADOS..... 30
4.1. Indução dos níveis de ciclina E1 em células HME1 através de transdução com adenovírus..... 30
4.2. Avaliação dos níveis protéicos de ciclina E1 em células HME1 ao longo do tempo..... 32
4.3. Avaliação da proliferação de células HME1 com altos níveis de ciclina E1..... 35
4.4. Avaliação da progressão do ciclo celular em células HME1 com altos níveis de ciclina E1..... 37
4.5. Avaliação da morte celular e poliploidia em células HME1 com altos níveis de ciclina E1..... 42
4.6. Sincronização de células HME1 ao longo do ciclo celular..... 48
4.7. Caracterização do estresse replicativo induzido por afidicolina em células HME1..... 52
4.8. Avaliação de aberrações cromossômicas induzidas por altos níveis de ciclina E1 em células HME1..... 55
4.9. Avaliação dos sítios frágeis comuns FRA3B e FRA16D em células HME1... 61

5. DISCUSSÃO..... 63

6. CONCLUSÃO..... 70

7. PERSPECTIVAS..... 71

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer é uma doença heterogênea, isto é, há diferenças entre tumores de diferentes tecidos ao mesmo tempo em que células de um mesmo tipo tumoral podem responder de formas variadas, o que pode refletir na eficácia do tratamento da doença. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. A maioria dos tipos de tumor possuir uma heterogeneidade intratumoral que pode ser genética ou não (MARUSYK *et al*., 2012).

Dentre as principais características do processo de tumorigênese estão a proliferação celular, a invasão e a metástase. Um fator importante no prognóstico de pacientes com câncer é a sequência de eventos que podem levar ao desenvolvimento de invasão do tumor e à metástase. A metástase leva à formação de tumores secundários em órgãos distantes e está frequentemente associada a um pior prognóstico (MARTIN & JIANG, 2009). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública e, a cada ano, 8,8 milhões de pessoas morrem de câncer. No ano de 2012, aproximadamente 60% de novos casos ocorreram em países em desenvolvimento e mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos. Dados do INCA indicam que a estimativa de incidência de câncer no Brasil em 2016 foi, em média, de 596 mil novos casos. Entre os homens, foram esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.800 para o ano de 2016.

A etiologia do câncer abrange fatores internos e externos ao organismo. Segundo o INCA, dentre os fatores externos estão causas relacionadas ao meio ambiente e hábitos sociais e culturais. Os fatores ambientes estão envolvidos em 80-90% dos cânceres, como tabagismo, álcool e exposição excessiva ao sol. Dentre os fatores internos estão causas geneticamente herdáveis e, dependendo da alteração genética, podem tornar um indivíduo mais propenso ao desenvolvimento do câncer.

Os tipos de câncer mais incidentes na população são: pulmão, intestino, próstata e mama. O câncer de mama pode ser definido como um grupo heterogêneo de células com crescimento anormal provenientes do tecido da mama (POLYAK, 2011). Dados do INCA indicam que o câncer de mama é o tipo de câncer com a

maior incidência e a maior mortalidade em mulheres no mundo e no Brasil, com exceção do câncer de pele não melanoma. A estimativa para o ano de 2016 foi de 57.690 novos casos de câncer de mama. Dentre os fatores de risco para o câncer de mama estão fatores endócrinos ou comportamentais, além de fatores genéticos.

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, mais de 180.000 mulheres descobrem um tumor de mama nos Estados Unidos a cada ano. Aproximadamente 80% dos tumores de mama invasivos são carcinomas ductais, enquanto 10% representam o carcinoma lobular. O carcinoma ductal e o lobular da mama são os tipos mais comuns de câncer de mama, sendo o carcinoma ductal o tipo mais frequente em 80% das mulheres, enquanto o lobular, 15% dos tumores de mama invasivos (KORKOLA *et al.,* 2003). Os dois tipos de tumor de mama são diferenciados de acordo com sua histologia, uma vez que os tumores ductais possuem tendência em formar estruturas glandulares, enquanto os tumores lobulares são originados dos lóbulos mamários e tendem a invadir os tecidos da mama.

O carcinoma nos ductos mamários pode ser classificado como *in situ* (ou seja, no tecido) ou invasivo. O carcinoma ductal *in situ* é o tipo mais comum de câncer de mama não invasivo, restrito aos ductos mamários. Por sua vez, o carcinoma ductal invasivo possui a capacidade de invadir outros tecidos e é o tipo mais comum de câncer de mama. Dados da Sociedade Americana de Câncer indicam que 2/3 das mulheres diagnosticadas com tumors de mama invasivos possuem 55 anos de idade ou mais.

O tumor de mama pode ser classificado histopatologicamente em quatro subtipos, de acordo com o receptor presente nas células transformadas. São eles: luminal A, luminal B, HER2 e basal. O tipo luminal A possui em suas células o receptor de estrogênio e/ou receptor de progesterona e é considerado o subtipo menos agressivo, uma vez que seu crescimento é lento. O luminal B é também caracterizado pela presença de pelo menos um dos receptores hormonais e pode ter a superexpressão do oncogene HER2 ou não, além de ter um maior risco de recorrência quando comparado ao subtipo luminal A. O subtipo HER2, como o próprio nome sugere, apresenta elevado conteúdo proteico de HER2, é negativo para receptores hormonais e representa o segundo pior prognóstico, uma vez que possui crescimento mais rápido que os tumores do tipo luminal. O subtipo basal não apresenta nenhum dos receptores na superfície de células tumorais e é o subtipo mais agressivo, sendo mais comum em mulheres com mutações no gene BRCA1 e

superexpressão do oncogene ciclina E.

O câncer de mama pode ser classificado em 4 estágios, variando de 0 a IV. A lesão pré-cancerosa da mama (estágio 0) pode ser um carcinoma *in situ* ductal ou lobular. Os estágios de 1 a 3 caracterizam-se pela presença de células transformadas na mama ou em linfonodos próximos, enquanto o estágio 4 caracteriza-se pelo câncer que já invadiu outros tecidos, ou seja, ocorreu o processo de metástase. Já o sistema de classificação TNM do câncer de mama avalia características como o tamanho (T), os linfonodos envolvidos (N) e onde houve a ocorrência de metástase (M). As classificações do tumor de mama auxiliam no estadiamento da doença e permitem que o paciente tenha o tratamento mais adequado.

Diversas alterações genéticas são encontradas no câncer de mama, como por exemplo, mutações pontuais, amplificações, deleções e rearranjos. No câncer de mama hereditário, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 conferem um risco de aproximadamente 50% para o desenvolvimento da doença até os 70 anos de idade (ANTONIOU *et al*., 2003). Os genes BRCA1 e BRCA2 estão envolvidos no reparo da molécula de DNA através de recombinação homóloga, contribuindo para a manutenção da integridade do genoma (PRAKASH *et al*., 2015). O gene p53 é o mais frequentemente mutado em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. A perda de heterozigosidade de p53 é um evento comum em estágios iniciais da carcinogênese da mama (DAVIDOFF *et al*., 1991). O gene HER2 também se encontra alterado no câncer de mama. O gene HER2 pertence à família de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e se encontra amplificado ou superexpresso em aproximadamente 30% de casos de câncer de mama (SLAMON *et al*., 1987). Recentemente, foi feita uma análise do genoma inteiro de 560 tipos de câncer de mama e o gene CCNE1 de ciclina E1 apresentou uma alta frequência de mutações nessas amostras (NIK-ZAINAL *et al*., 2016). A ciclina E está envolvida na transição das fases G1/S do ciclo celular e altos níveis desta proteína correlacionam com um pior prognóstico e maior agressividade da doença em pacientes com câncer de mama (KEYOMARSI *et al*., 2002). Diferentes genes se encontram alterados em diferentes tipos de tumor e, portanto, a elucidação dos mecanismos desencadeados por essas alterações é de grande importância para o melhor entendimento do câncer.

1.2. Mecanismos de carcinogênese

As células tumorais são caracterizadas por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que podem induzir capacidades e vantagens seletivas às células tumorais, contribuindo para o surgimento do câncer. No ano 2000, foram eleitos os chamados pilares do câncer, que são alterações importantes para o processo de carcinogênese na maioria dos tumores (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Assim, as seis capacidades adquiridas pelos diferentes tipos de câncer são: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento; 2) insensibilidade a sinais inibidores de crescimento; 3) evasão da apoptose; 4) potencial replicativo ilimitado; 5) invasão tecidual e 6) metástase e angiogênese sustentada. Em 2011, foram propostos dois novos fatores determinantes para o surgimento do câncer: a capacidade de alteração do metabolismo energético celular e o escape do sistema imune (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

Além disso, a instabilidade genômica e a inflamação proveniente do microambiente tumoral foram propostos como características importantes para o processo de carcinogênese. A falha na manutenção da integridade do genoma devido a diversos fatores como, por exemplo, erros em vias de reparo da molécula de DNA, é o grande desencadeador do processo de tumorigênese. A instabilidade genômica pode levar ao aparecimento de todas as outras capacidades adquiridas de uma célula transformada, levando à progressão tumoral.

1.3. Instabilidade Genômica

A instabilidade genômica pode ser definida como o aumento da capacidade de acumular alterações genéticas ao longo do ciclo de vida de uma célula (SHEN, 2011). Assim, a deficiência de uma célula em eventos do ciclo celular ou no reparo de lesões na molécula de DNA pode levar à instabilidade genômica, dentre outras causas. A falha na duplicação fiel do genoma e na distribuição deste material genético às células filhas está intimamente relacionada à instabilidade genômica. No ano de 2011, a instabilidade genômica foi classificada como uma característica capaz de induzir o aumento da geração de alterações genéticas ao longo do processo de carcinogênese (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

O processo de tumorigênese está intimamente relacionado ao fenômeno de instabilidade genômica. A célula transformada pode apresentar rearranjos

cromossômicos, além da perda ou ganho de cromossomos inteiros, gerando instabilidade cromossômica e contribuindo para a progressão tumoral. O estresse replicativo, ou seja, a condição na qual a forquilha de replicação progride lentamente pode ser uma das causas de instabilidade genômica. A superexpressão de oncogenes, a perda de genes supressores de tumor ou a desregulação de genes envolvidos com a via de sinalização ao dano na molécula de DNA podem levar a uma condição de estresse replicativo que pode interferir com a integridade do genoma e contribuir para o processo de tumorigênese (BARTKOVA *et al*., 2005; GORGOULIS *et al*., 2005).

Mutações pontuais em genes envolvidos com o reparo do DNA são frequentemente observadas em diferentes tipos de câncer e podem levar à instabilidade genômica. O gene supressor tumoral BRCA1, por exemplo, se encontra frequentemente mutado em câncer de mama e ovário e participa da via de sinalização de dano ao DNA induzido por quebra de fita dupla (NEGRINI *et al*., 2010). Além disso, mutações no gene supressor tumoral p53 podem interferir com a manutenção da divisão celular, interferindo com a integridade do genoma e aumentando a capacidade de formação de tumor (HANEL & MOLL, 2012).

Alterações no número de cópias, como amplificações ou deleções gênicas, também podem ser causadores da instabilidade genômica. A amplificação do gene CCNE1 interfere com o processo de síntese do DNA, sendo capaz de induzir um estresse replicativo permanente e interferir com a integridade do genoma (AKLI & KEYOMARSI, 2003). A deleção do gene CDKN2A também é bastante comum em tumores, podendo levar à instabilidade genômica, uma vez que este gene codifica para proteínas de inibidores de Cdks como membros da família INK4 e, portanto, a ausência deste supressor tumoral pode interferir com a regulação do ciclo celular (NEGRINI *et al*., 2010).

A instabilidade de microssatélite (MSI) é também um evento genético que pode comprometer a estabilidade do genoma. O fenômeno de MSI é caracterizado por mutações genéticas que resultam em sequências repetitivas (microssatélites), principalmente repetições do tipo CA, presentes em aproximadamente 15% de pacientes com câncer colorretal esporádico (THIBODEAU *et al*., 1993). O evento de MSI pode ser causado por defeitos na síntese do DNA ou no reparo ao dano na molécula de DNA (NEGRINI *et al*., 2010).

A aneuploidia, ou seja, a perda ou ganho de cromossomos inteiros ou ainda alterações na estrutura dos cromossomos podem ser causadas a partir de erros

durante a segregação dos cromossomos (DRAVIAN *et al*., 2004). Essas alterações no número ou estrutura dos cromossomos caracterizam a instabilidade cromossômica, que é definida como uma alta frequência de erros durante a segregação dos cromossomos durante a mitose, resultando na falha da manutenção correta dos cromossomos (THOMPSON *et al*., 2010).

A cromotripsia pode ser definida como um evento onde um ou poucos cromossomos sofrem rearranjos múltiplos em células tumorais. Durante o desenvolvimento tumoral, regiões cromossômicas podem ser fragmentadas em diversas partes que são posteriormente reunidas devido a defeitos em mecanismos de reparo de DNA (FORMENT *et al*., 2012). Assim, o fenômeno de cromotripsia pode contribuir para a pulverização de cromossomos, levando a perdas e/ou ganhos de pedaços cromossômicos e a formação de micronúcleos ao longo da fase de mitose. Dessa forma, a cromotripsia pode contribuir para a instabilidade genômica, uma vez que eleva os níveis de instabilidade em células transformadas (CRASTA *et al*., 2012).

Todavia, diversos mecanismos celulares são capazes de evitar a instabilidade genômica, como o reparo ao dano no DNA, a apoptose, a senescência e a catástrofe mitótica. O reparo ao dano no DNA atua na manutenção da estabilidade do genoma quando há eventuais erros. Entretanto, mutações em genes que participam das vias de sinalização do reparo ao dano ao DNA, como ATM, ATR e p53 podem levar ao fenômeno de instabilidade genômica e, consequentemente, ao desenvolvimento do câncer (MOTOYAMA & NAKA, 2004).

Um outro mecanismo de prevenção de instabilidade genômica é a catástrofe mitótica, que pode ser definida como um mecanismo oncosupressor que precede a morte celular, necrose ou senescência. As causas deste evento podem estar associadas à condensação prematura dos cromossomos e à presença de células com múltiplos micronúcleos (INAZINI & MACKEY, 1997). Além disso, a entrada precoce ou inapropriada em mitose também podem levar ao fenômeno de catástrofe mitótica (VITALE *et al*., 2011).

1.4. Ciclo celular

O ciclo celular é um evento fundamental para a preservação da integridade genômica de uma célula para as células filhas. A fase de síntese (fase S) é uma das

principais fases do ciclo celular, onde ocorre a duplicação do material genético, sendo alternada pelas fases *gap* 1 (G1) e *gap* 2 (G2). Essas três etapas compreendem o período de intérfase, necessário para o crescimento em tamanho e número de organelas da célula. A fase de mitose (fase M), outro importante momento do ciclo de vida da célula, se caracteriza pela divisão igualitária do material genético entre as células filhas.

A fase G1 é o momento do ciclo celular onde é verificada a disponibilidade de sinais extracelulares, como fatores de crescimento, e onde ocorre a preparação para o ingresso na fase S. Ao longo da fase G1, a célula passa pelo chamado ponto restrição (ponto R), momento onde a célula não mais necessita de estímulos mitogênicos extracelulares para garantir a divisão celular. Durante a fase G1, a célula também pode entrar em um estado quiescente, chamado fase G0 (PARDEE, 1974; MALUMBRES & BARBACID, 2009). Durante esse período, a célula interrompe sua capacidade proliferativa, embora mantenha o metabolismo ativo, podendo retornar ao ciclo celular a qualquer momento, dependendo de sinais extracelulares.

A fase G2 é necessária para averiguar se o DNA foi duplicado corretamente e garantir que a célula possa progredir para a mitose ou fase M. A fase M é constituída por cinco etapas da mitose (prófase, prometáfase, metáfase, telófase e anáfase) e a etapa de divisão celular ou citocinese. Durante a prófase, a cromatina, até então difusa na intérfase, começa a se condensar em cromossomos, os quais foram duplicados anteriormente na fase S (STILLMAN, 1996; KOPS *et al*., 2005). Ainda nessa fase, há o início da formação do eixo mitótico, o qual é composto de microtúbulos e proteínas associadas. Durante a prometáfase, há o rompimento da membrana nuclear e, na fase seguinte ou metáfase, os cromossomos são alinhados no plano equatorial da célula. O ponto de checagem de montagem do fuso mitótico monitora a ligação dos cromossomos ao fuso mitótico, prevenindo que os cromossomos ainda duplicados sejam separados precocemente (HOYT, TOTIS & ROBERTS, 1991; MUSACCHIO, 2015).

O atraso da fase de anáfase garante que as cromátides irmãs estejam corretamente ligadas ao fuso mitótico, onde há a separação das cromátides irmãs para os polos opostos da célula a partir da movimentação do fuso mitótico. Ao longo da telófase, última etapa da mitose, os cromossomos separados chegam aos pólos da célula. Nesta etapa, um novo envelope nuclear é formado ao redor de cada grupo de cromossomos e a cromatina é descondensada. Por fim, a citocinese é

caracterizada pela formação de um anel contrátil composto por filamentos proteicos que promove o estrangulamento do citoplasma, culminando com a divisão celular propriamente dita (BARR & GRUNEBERG, 2007).

O controle da progressão do ciclo celular é caracterizado por diversos pontos de checagem. Esse controle garante que o início de um novo evento no ciclo celular ocorra após o término das etapas anteriores (HARTWELL & WEINERT, 1989; ELLEDGE, 1996). Um dos principais reguladores da progressão pelas diferentes fases do ciclo celular é a família de cinases dependentes de ciclinas (Cdks). A atividade de Cdks depende da ligação a proteínas chamadas ciclinas, que são sintetizadas e degradadas em momentos específicos do ciclo celular (Figura 1.1) (MORGAN, 1997; MURRAY 2000). As ciclinas são capazes de controlar a atividade cinase e especificidade das Cdks ao substrato. A formação de complexos ciclina-Cdk específicos permite a ativação de Cdks específicas em diferentes fases do ciclo celular. Assim, o complexo ciclina-Cdk é responsável pela fosforilação em resíduos de Serina e Treonina de substratos importantes durante todo o ciclo.

A partir de estímulos mitogênicos extracelulares que irão induzir a expressão de ciclina D, as cinases Cdk4 e Cdk6 são ativadas ao se ligarem a esta ciclina durante a fase G1, onde a proteína retinoblastoma (RB) é fosforilada e inativada (MORGAN, 1997; SHEER & ROBERTS, 1999; MURRAY, 2000). A fosforilação de Rb libera o fator de transcrição E2F que, por sua vez, induz a transcrição de genes envolvidos com a fase S como, por exemplo, ciclina E (SEARS & NEVINS, 2002; STEVAUX & DYSON, 2002). O complexo ciclina E-Cdk2 está presente na transição das fases G1-S, fosforilando substratos importantes para a fase de duplicação do DNA, como proteínas envolvidas com o disparo de origens de replicação. Ainda durante a fase S, o complexo ciclina A-Cdk2 fosforila proteínas importantes para o término e saída da fase S, como por exemplo, Cdc6, alternando sua localização subcelular e impedindo que ocorra rereplicação da molécula de DNA. Neste momento, ciclina A associa-se a Cdk1, continuando a fosforilação de substratos de fase S, além de fosforilar substratos durante a fase G2. Ao longo da fase G2, ciclina A é degradada e ocorre um aumento da síntese de ciclina B, que atinge um pico de síntese no início da fase M, quando se associa com Cdk1 para regular a progressão pela fase M.

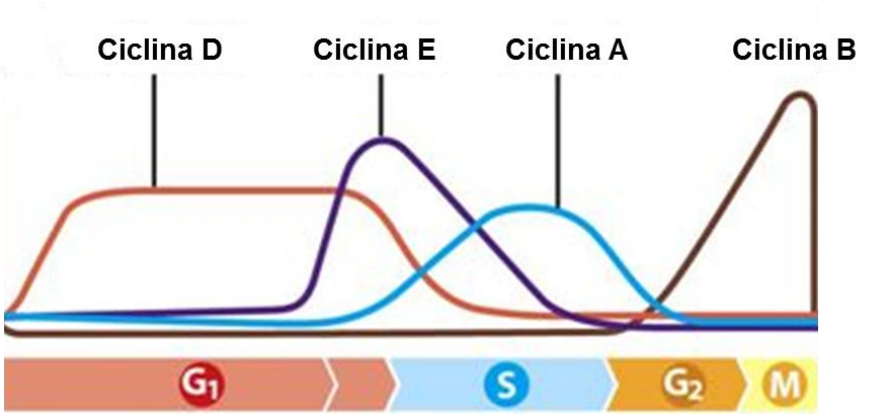


Figura 1.1. Fases e controle do ciclo celular. O ciclo celular é composto pelas fases G1, S, G2 e M. As fases S (síntese do DNA) e M (divisão celular) são alternadas pelas fases G1 e G2. O controle do ciclo celular é realizado por cinases dependentes de ciclinas (Cdks) e suas respectivas ciclinas. As ciclinas apresentam um pico de expressão em fases específicas, permitindo a progressão do ciclo celular (Modificado de WEINBERG, 2007).

Ao final da fase de mitose, ocorre a degradação de ciclina B que leva a diminuição da atividade de Cdk1, não havendo atividade de Cdk detectável e permite que as proteínas do chamado complexo pré-replicativo (pre-RC) sejam recrutadas para as origens de replicação (ORIs). Para que a duplicação do material genético aconteça, é necessário que ocorra o licenciamento do DNA, que acontece durante o final da fase M e início da fase G1. Esse evento envolve o recrutamento sequencial das proteínas do pre-RC, composto especialmente pelas proteínas ORC, Cdc6, Cdt1 e MCMs (STILLMAN, 1996).

Dessa forma, as ciclinas atuam como ativadoras do ciclo celular e sua síntese é necessária para a atividade de Cdks específicas. Por outro lado, os inibidores de Cdks (CKIs) impedem a formação de complexos ciclina-Cdk ou inibem a atividade de complexos formados previamente. A regulação negativa de Cdks é realizada pelas famílias de CKIs INK4 e Cip/Kip. A família INK4 é composta por p15, p16, p18 e p19, enquanto a família Cip/Kip é composta por p21, p27 e p57 (MALUMBRES & BARBACID, 2005). A família INK4 se liga e inibe especificamente as Cdks da fase G1, Cdk4 e Cdk6, impedindo sua associação com ciclinas específicas e/ou inibindo a atividade dos complexos formados (HIRAI *et al*., 1995). Por sua vez, a família Cip/Kip tem poder inibitório tanto sobre ciclinas como Cdks, atuando preferencialmente sobre complexos envolvendo Cdk2 e Cdk1 (SHERR & ROBERTS, 1999). Dessa forma, os CKIs atuam na regulação do ciclo celular em momentos de condições desfavoráveis, contribuindo para a manutenção da homeostase celular.

1.5. Ciclina E

A proteína nuclear ciclina E1 foi primeiramente descrita em 1991 (LEW D & REED S, 1991; KOFF *et al*., 1991). A ciclina E1 é codificada pelo gene CCNE1 que está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q12). A proteína ciclina E1 contém 409 aminoácidos e domínios específicos: um domínio do tipo *cyclin box,* um sinal de localização nuclear (NLS) e um sinal de localização de centrossomo (CLS) (Figura 1.2) (MATSUMOTO & MALLER, 2004). O domínio *cyclin box* de ciclina E é uma região de homologia entre todas as ciclinas (NUGENT *et al*., 1991) e é necessário para a associação entre ciclinas e Cdks, promovendo a regulação da atividade das cinases (MURRAY, 2004). O RNA mensageiro de ciclina E1 é regulado por *splicing* alternativo e foram identificados 9 diferentes produtos de processamento. Além disso, formas de baixo peso molecular (LMWI) são formadas a partir da clivagem proteolítica de ciclina E, apresentando tamanhos entre 45 a 33 kDa (OHTSUBO *et al*., 1995; PORTER & KEYOMARSI, 2000). A proteína completa de ciclina E pode ser clivada em dois sítios diferentes na porção amino terminal, gerando 5 diferentes isoformas (AKLI *et al*., 2004). A ciclina E2 foi a segunda ciclina do tipo E a ser descrita, no final da década de 90 (LAUPER *et al.,* 1998; ZARIWALA *et al*., 1998; GUDAS *et al*., 1999). A ciclina E2 é codificada pelo gene CCNE2 que está localizado no braço longo do cromossomo 18 (18q22.1), possui 404 aminoácidos e sequência e funções similares a ciclina E1 (CALDON & MUSGROVE, 2010).

Durante o ciclo celular, o pico de síntese de ciclina E ocorre na transição das fases G1/S, onde proteínas importantes para a regulação da fase de síntese de DNA são fosforiladas. Ao longo da duplicação do DNA, os níveis de ciclina E reduzem até se tornarem inexistentes ao final da fase S (EKHOLM *et al*., 2001). A degradação de ciclina E envolve duas vias distintas de ubiquitinação. O complexo SCF^{Fbxw7} é uma ubiquitina-ligase responsável pela degradação de proteínas envolvidas com o ciclo celular (PATTON *et al*., 1998). O complexo ciclina E-Cdk2 precisa ser fosforilado para, em seguida, ser ubiquitinado pelo complexo SFC^{Fbxw7} e degradado via proteassoma (CLURMAN *et al*., 1996; WON & REED, 1996;). As proteínas do tipo F-box funcionam como adaptadoras de substratos de complexos SCF (SKOWYRA *et al*., 1997). Dentre as proteínas que compõem o complexo SCF, Fbxw7 é capaz de se ligar e ubiquitinar ciclina E em seu estado fosforilado (MOBERG *et al.*, 2001; STROHMAIER *et al*., 2001;). Por outro lado, quando ciclina E se encontra em sua

forma monomérica, sua degradação ocorre preferencialmente via Cul-3, uma ubiquitina ligase que permite o endereçamento de ciclina E para degradação via proteassoma (SINGER *et al*., 1999). Dessa forma, SFC^{Fbxw7} e Cul-3 são reguladores importantes dos níveis de ciclina E e da progressão do ciclo celular.

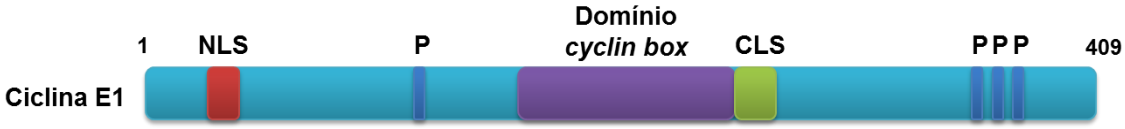


Figura 1.2. Estrutura protéica de ciclina E1. A proteína ciclina E1 possui 409 aminoácidos e é composta por um sinal de localização nuclear (NLS), um domínio *cyclin box* e um sinal de localização de centrossomo (CLS). As barras azuis (P) representam sítios de fosforilação necessários para a degradação de ciclina E1 através do sistema ubiquitina-proteassomo.

A ciclina E, complexada com Cdk2, é responsável pela fosforilação de substratos importantes para a duplicação da molécula de DNA (Figura 1.3). A proteína Cdc6, juntamente com ciclina E permite que ocorra a montagem do pre-RC, tornando a cromatina competente para a etapa de replicação (COVERLEY *et al*., 2002; MAILAND & DIFFLEY, 2005). Além disso, o complexo ciclina E-Cdk2 também está envolvido na duplicação do centrossomo por meio da fosforilação de CP110 (CHEN *et al*., 2002). Essa proteína está localizada nos centrossomos e sua expressão é induzida na transição das fases G1/S, momento em que a duplicação dos centrossomos acontece. A proteína nucleofosmina (NPM) está associada ao centrossomo antes que ele seja duplicado e também pode ser fosforilada por ciclina E, levando a liberação de NPM do centrossomo e permitindo sua duplicação (OKUDA *et al*., 2000).

O complexo ciclina E-Cdk2 também está envolvido na fosforilação de substratos relevantes para a biossíntese de histonas, como o fator de transcrição NPAT/p220 e a histona acetiltransferase CBP/p300. A fosforilação de CBP induz um aumento na sua atividade acetiltransferase, enquanto a fosforilação de NPAT induz um aumento na transcrição gênica de histonas (AIT-SI-ALI *et al*., 1998; ZHAO *et al*.; MA *et al*., 2000). Ambos os eventos são fundamentais para que a duplicação da molécula de DNA ocorra normalmente em fase S.

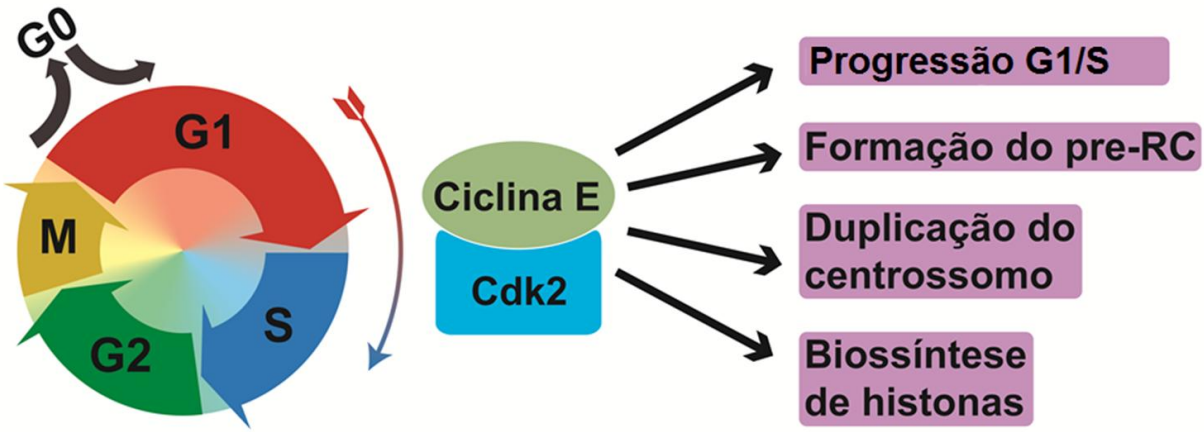


Figura 1.3. Principais funções de ciclina E. O complexo ciclina E-Cdk2 possui atividade na transição das fases G1/S, fosforilando substratos envolvidos com a etapa de síntese do DNA. Dentre as principais funções do complexo ciclina E-Cdk2 estão o controle da transição G1/S, a formação do complexo pré-replicativo (pre-RC), a duplicação do centrossomo e a biossíntese de histonas. Figura elaborada por Douglas Faget.

A proteína Rb é um dos substratos mais importantes do complexo ciclina E-Cdk2. A hiperfosforilação e inativação de Rb por ciclina E-Cdk2 libera os fatores de transcrição da família E2F, permitindo que promovam a expressão de genes envolvidos com a entrada em fase S (DeGREGORI *et al*., 1995). A ciclina E é um dos próprios alvos dos fatores de transcrição da família E2F, induzindo um *feedback* positivo na expressão de ciclina E

O complexo ciclina E-Cdk2 é capaz de fosforilar os inibidores de Cdks $p21^{Cip1}$ e $p27^{Kip1}$ (GU *et al*., 1993; HARPER *et al*., 1993; POLYAK *et al*., 1994; TOYOSHIMA & HUNTER, 1994; XIONG *et al*., 1994; SHEAFF *et al*., 1997;. A fosforilação destes CDKIs catalisa a degradação a partir da ubiquitina ligase SCF^{Skp2} (CARRANO *et al*., 1999; BORNSTEIN *et al*., 2006).

Em células normais, o complexo ciclina E-Cdk2 mantém um pico de atividade na transição das fases G1/S. Por outro lado, em células tumorais, a atividade de complexo ciclina E-Cdk2 pode se manter ativa ao longo de todo o ciclo celular em células tumorais (KEYOMARSI *et al*., 1995). A amplificação gênica ou a superexpressão de ciclina E está associada a diversos tipos tumorais, como por exemplo ovário, leucemia, linfoma, gástrico, pulmão e mama (SCUDERI *et al*., 1996; PORTER *et al*., 1997; ERLANSON *et al*., 1998; FUKUSE *et al*., 2000; KEYOMARSI *et al*., 2002; BANI-HANI *et al*., 2005; ROSEN *et al*., 2006). Altos níveis de ciclina E1 correlacionam com um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama

(KEYOMARSI *et al*., 2002), podendo ser observada já em lesões pré-malignas (SHAYE *et al*., 2009). Os resultados desses trabalhos demonstraram que os pacientes que apresentavam altos níveis de ciclina E1 foram a óbito em até cinco anos após o diagnóstico.

O primeiro modelo murino transgênico de ciclina E demonstrou que altos níveis de ciclina E1 induzem hiperplasia da glândula mamária e desenvolvimento de carcinoma de mama (BORTNER & ROSENGER, 1997). Do mesmo modo, altos níveis de ciclina E1 podem induzir instabilidade genômica em modelos murinos heterizogotos para p53, levando a perda deste supressor de tumor e contribuindo para a tumorigênese da mama (SMITH *et al*., 2006). Portanto, em diversos tipos e modelos tumorais, a desregulação de ciclina E pode levar a desregulação do ciclo celular, a instabilidade genômica e ao desenvolvimento do câncer.

1.6. Estresse Replicativo

A replicação do DNA é uma etapa fundamental do ciclo celular. Para isso, o DNA precisa ser duplicado corretamente a fim de manter a integridade do genoma para as células filhas. Neste processo, origens de replicação são inicialmente licenciadas em pre-RCs e posteriormente disparadas para a progressão das forquilhas de replicação de forma bidirecional durante a síntese de uma nova fita de DNA. As origens de replicação são disparadas em momentos diferentes, podendo ser ativadas no início, meio e fim da fase de síntese do DNA (RHIND & GILBERT, 2013). Assim, o licenciamento e o disparo das origens de replicação precisam ser regulados fielmente durante o ciclo celular para a manutenção da estabilidade genômica. Inúmeros fatores podem interferir com o processo de replicação do DNA, levando ao fenômeno de estresse replicativo. Esse fenômeno pode ser definido como a progressão lenta ou a total parada da forquilha de replicação durante a síntese de DNA, levando ao retardo na progressão por fase S (MACHERET & HALAZONETIS, 2015).

O estresse replicativo pode ser gerado por diversas fontes, como por exemplo, intervalos e lesões na molécula de DNA, limitação de fatores de replicação, incorporação de ribonucleotídeos em vez de deoxiribonucleotídeos (Figura 1.4) (ZEMAN & CIMPRICH, 2014). Além disso, a formação de estruturas secundárias na molécula de DNA devido a repetições de nucleotídeos pode ser

outro obstáculo que leva à parada da forquilha de replicação (OZERI-GALAI *et al*., 2011). A colisão entre as maquinarias de replicação e transcrição também pode causar o estresse replicativo, especialmente em regiões do DNA que contém genes enormes (HELMIRICH *et al*., 2011).

A disponibilidade de nucleotídeos é determinante para o processo de duplicação do DNA. A proliferação celular exacerbada causada pela superexpressão de determinados oncogenes pode induzir uma entrada em fase S de forma descontrolada. A duplicação do DNA em excesso pode reduzir a disponibilidade de nucleotídeos, diminuindo a velocidade de progressão das forquilhas de replicação (BESTER *et al*., 2011). Outro fator que pode levar ao estresse replicativo é a baixa disponibilidade de origens de replicação, induzindo as forquilhas de replicação a viajarem por distâncias mais longas e aumentando a probabilidade de parada (LETESSIER *et al*., 2011) Além disso, o uso reduzido de origens de replicação e a diminuição na progressão da velocidade da forquilha pode permitir com que células entrem na fase de mitose sem terem replicado completamente o DNA. Nessas situações, origens de replicação dormentes podem ser disparadas para compensar a parada de determinadas forquilhas, permitindo que a replicação do DNA seja completada (WOODWARD *et al*. 2006; GE *et al*., 2007; IBARRA *et al*., 2008).

Por outro lado, a alteração do tempo de disparo das origens de replicação pode levar a uma segunda rodada de replicação em um único ciclo celular, fenômeno denominado de re-replicação. A superexpressão das proteínas Cdt1 e Cdc6, que participam do licenciamento do DNA, já foram relacionadas com o processo de re-replicação e níveis aumentados dessas proteínas estão presentes em lesões epiteliais pré-malignas (LIONTOS *et al*., 2007).

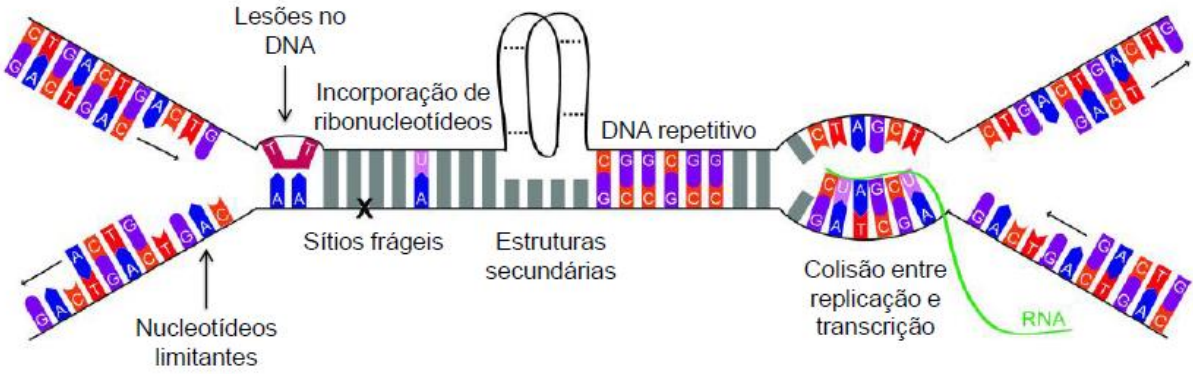


Figura 1.4. Fontes de estresse replicativo. A interferência na progressão da forquilha de replicação pode ocorrer devido a lesões na molécula de DNA, a incorporação de ribonucleotídeos, a repetições no DNA, a colisão entre as

maquinarias de replicação e transcrição, a presença de estruturas, a regiões de sítios frágeis comuns e a limitação de nucleotídeos. A resolução desses obstáculos pode permitir que a forquilha de replicação volte a progredir, dando continuidade ao processo normal de duplicação do DNA (Modificado de ZEMAN & CIMPRICH, 2014).

Quando a progressão das forquilhas de replicação é mais lenta ou está parada, regiões genômicas específicas podem se tornar propensas a quebras ou interrupções cromossômicas devido, por exemplo, a escassez de origens de replicação, a formação de estruturas secundárias ou a possibilidade de colisão entre as maquinarias de transcrição e replicação na região de fragilidade (DEBATISSE *et al*., 2012). A deleção de regiões genômicas contendo sítios frágeis está diretamente relacionada ao processo de carcinogênese, visto que alguns desses sítios englobam genes supressores de tumor (ILIOUPOULOS *et al*., 2006).

1.7. Sítios Frágeis Comuns

Os sítios frágeis podem ser definidos como regiões genômicas susceptíveis a quebras ou interrupções cromossômicas em situação de estresse replicativo, e podem ser classificados como sítios frágeis raros ou comuns (LE TALLEC *et al*., 2014). Os sítios frágeis raros são encontrados em menos de 5% da população e são representados em grande parte pela sensibilidade ao folato (DURKIN & GLOVER, 2007). Esses sítios normalmente apresentam expansão de repetições do tipo CGG, podendo formar estruturas secundárias que comprometem a etapa de síntese do DNA (SCHWARTZ *et al*., 2006). Por sua vez, os sítios frágeis comuns (SFCs) estão presentes em todos os indivíduos e a expressão destes sítios, ou seja, a presença de quebras ou interrupções cromossômicas é comumente estudada na presença de afidicolina, um inibidor de DNA polimerase (GLOVER *et al*., 1984).

Grande parte dos SFCs tem como característica a replicação tardia em fase S e, portanto, uma chance aumentada da duplicação do genoma não ser completada nessas regiões (DURKIN & GLOVER, 2007). Outra característica dos SFCs é a presença de sequências repetitivas do tipo AT, privilegiando a formação de estruturas secundárias (LAIRD *et al*., 1987; LE BEAU *et al*., 1998). Além disso, os SFCs estão presentes em regiões genômicas que contém genes enormes, acima de 700 kb. Interessantemente, muitos dos genes encontrados em regiões de SFCs já foram descritos como supressores de tumor. Nesses casos, a região de fragilidade

está relacionada a colisões entre as maquinarias de transcrição e replicação, uma vez que a etapa de transcrição pode levar mais tempo do que um ciclo celular inteiro para ser completada, favorecendo a aproximação entre as duas maquinarias (HELMRICH *et al*., 2011).

A instabilidade de sítios frágeis pode ser observada em lesões pré-malignas em diferentes tumores, sendo uma das causas de instabilidade genômica que contribuem para o processo de tumorigênese (TSANTOULIS *et al*., 2008). A redução na velocidade da progressão da forquilha de replicação leva ao recrutamento à cromatina de membros da via de resposta ao dano de DNA, especialmente ATR (KOUNDRIOKOUFF *et al*., 2013). Além disso, a regulação da via de ATR é de extrema importância para a manutenção da estabilidade de sítios frágeis. Forquilhas de replicação defeituosas que escapam do checkpoint de replicação mediado por ATR podem parar de progredir, permitindo que regiões genômicas específicas não sejam completamente replicadas (CASPER *et al*., 2002). CHK1, um dos substratos de ATR, também está relacionado com a estabilidade de SFCs, uma vez que células deficientes para CHK1 apresentam alta frequência de fragmentação cromossômica, especialmente nos sítios frágeis FRA3B e FRA16D (DURKIN *et al*., 2006). Portanto, a ativação desta via é fundamental para a manutenção da estabilidade de SFCs.

Os SFCs FRA3B e FRA16D são os sítios mais frequentemente afetados em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (LUKUSA & FRYNS, 2008). FRA3B está localizado no cromossomo 3, na posição 3p14.2 e é o SFC mais ativo em linfócitos humanos. O gene FHIT, que apresenta um tamanho de aproximadamente 1.5 Mb, está localizado na região do sítio FRA3B e foi descrito como um gene supressor tumoral (HUEBNER & CROCE, 2003). Algumas linhagens tumorais apresentam deleção do gene FHIT em vários tipos de câncer, como por exemplo o câncer de pulmão, apresentando conteúdo proteico de FHIT reduzido ou inexistente (SOZZI *et al*., 1997). A região de maior instabilidade de FRA3B contém, aproximadamente, 700 kb e é uma região genômica pobre em eventos de iniciação de replicação (LETESSIER *et al*., 2011). Assim, a escassez de origens de replicação nessa região induz as forquilhas de replicação a viajarem por longas distâncias para completarem a síntese do DNA, contribuindo para a fragilidade deste locus.

Por sua vez, o SFC FRA16D se localiza no cromossomo 16, na posição 16q23.3-24.1. O gene WWOX se encontra neste sítio frágil e, assim como o gene FHIT, também foi caracterizado como um supressor tumoral (MANGELSDORF *et al*., 2000). O mecanismo de supressão tumoral induzido por WWOX envolve a ativação

de vias de apoptose e a modulação da matriz extracelular e do metabolismo energético da célula (AQIELAN *et al*., 2004; GOURLEY *et al*., 2009; ABU-REIMALEH & AQIELAN, 2014). Além disso, WWOX está envolvido com a via de sinalização ao dano de DNA, especificamente ATM (ABU-ODEH *et al*., 2014). Em situações de dano ao DNA, WWOX se acumula no núcleo e interage com ATM, aumentando sua atividade e contribuindo para a estabilidade do genoma.

Portanto, os SFCs são regiões genômicas frequentemente afetadas em câncer e correlacionam com pontos de quebra observados no genoma de diferentes tumores. Além disso, os SFCs estão envolvidos com a perda de supressores tumorais e eventualmente com amplificação de oncogenes (HELLMAN *et al*.; 2002; BIGNELL *et al*., 2010). Entretanto, como discutido anteriormente, a expressão de sítios frágeis específicos está relacionada com o tipo celular e o tipo de insulto replicativo, criando um repertório único de sítios frágeis em diferentes tecidos sob diferentes insultos (MIRON *et al*., 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

1.8. Ciclina E, estresse replicativo e instabilidade genômica

O complexo ciclina E-Cdk2 se encontra desregulado em diversos tipos de tumores, contribuindo para o processo de carcinogênese. A primeira evidência indicativa de que altos níveis de ciclina E interferem com a progressão normal do ciclo celular foi documentada no início da década de 90. Neste trabalho, foi demonstrado que a superexpressão de ciclina E1 em fibroblastos IMR-90 promove uma saída rápida da fase G1 e uma progressão mais lenta das células por fase S (OHTSUBO & ROBERTS, 1995).

Altos níveis de ciclina E1 também interferem com a montagem do pre-RC, especificamente com o recrutamento para a cromatina das subunidades MCM2, 4 e 7 da família de helicases MCMs (Figura 1.5) (EKHOLM-REED *et al*., 2004). A impossibilidade do recrutamento de proteínas do pre-RC para a cromatina impede o licenciamento do complexo e o início da síntese de DNA. Ainda neste trabalho, foi observado que altos níveis de ciclina E1 levam a redução no número de origens de replicação, possivelmente relacionados à dificuldade na iniciação da replicação. Em extratos de *Xenopus,* a ligação da subunidade MCM3 à cromatina também é prejudicada por altos níveis de ciclina E1, dificultando o início da replicação do DNA nesse modelo (HUA *et al*., 1997), indicando uma conservação dos processos entre

diferentes espécies.

A desregulação de ciclina E1 também impede a progressão inicial pelas fases da mitose, induzindo uma parada das células em prometáfase e metáfase (KECK *et al*., 2007). Neste trabalho, foi demonstrado que a superexpressão de ciclina E1 é capaz de inibir o complexo ubiquitina-ligase do complexo promotor da anáfase (APC), bloqueando a progressão da metáfase para anáfase. Dessa forma, a entrada em anáfase se torna dificultada, levando eventualmente à poliploidia, devido à ausência de citocinese.

Os altos níveis de ciclina E1 levam ao estresse replicativo, indicado pelo término precoce de forquilhas de replicação, podendo gerar colapso das forquilhas e quebra da fita dupla de DNA (BARTKOVA *et al*., 2006). O estresse replicativo induzido por oncogenes, como por exemplo ciclina E pode atuar como uma barreira contra a progressão tumoral, uma vez que leva a ativação de vias de sinalização ao dano de DNA e à senescência celular em lesões pré-malignas (BARTKOVA *et al*., 2005; GORGOULIS *et al*., 2005; BARTKOVA *et al*., 2006; DI MICCO *et al*., 2006).

Além disso, a superexpressão de ciclina E1 interfere com a progressão da forquilha de replicação através da redução da disponibilidade de nucleotídeos, interferindo com a síntese do DNA (BESTER *et al*., 2011). No entanto, esse trabalho demonstrou que a suplementação com nucleosídeos é capaz de reverter o estresse replicativo induzido por oncogenes, além de redução no dano ao DNA. Recentemente, foi demonstrado que o colapso de forquilhas de replicação induzido pela superexpressão de ciclina E1 pode ser reparado por recombinação homóloga, especificamente, pelo reparo de replicação induzido por quebras (BIR), levando a alterações no número de cópias e contribuindo para a instabilidade genômica (COSTANTINO *et al*., 2014).

Além da interferência no início da replicação, o estresse replicativo oriundo da desregulação de ciclina E1 em células de ostesarcoma U2OS pode ser causado pela colisão entre as maquinarias de replicação e transcrição, podendo levar à formação de estruturas híbridas de RNA-DNA (JONES *et al*., 2012). Entretanto, esse trabalho também demonstrou que a inibição do alongamento da transcrição reduz o estresse replicativo e o dano ao DNA em células com superexpressão de ciclina E1. De fato, altos níveis de ciclina E1 correlacionam com o aparecimento de estruturas intermediárias de replicação, especificamente, forquilhas reversas que podem induzir a formação de lesões no DNA (NEELSEN *et al*., 2013).

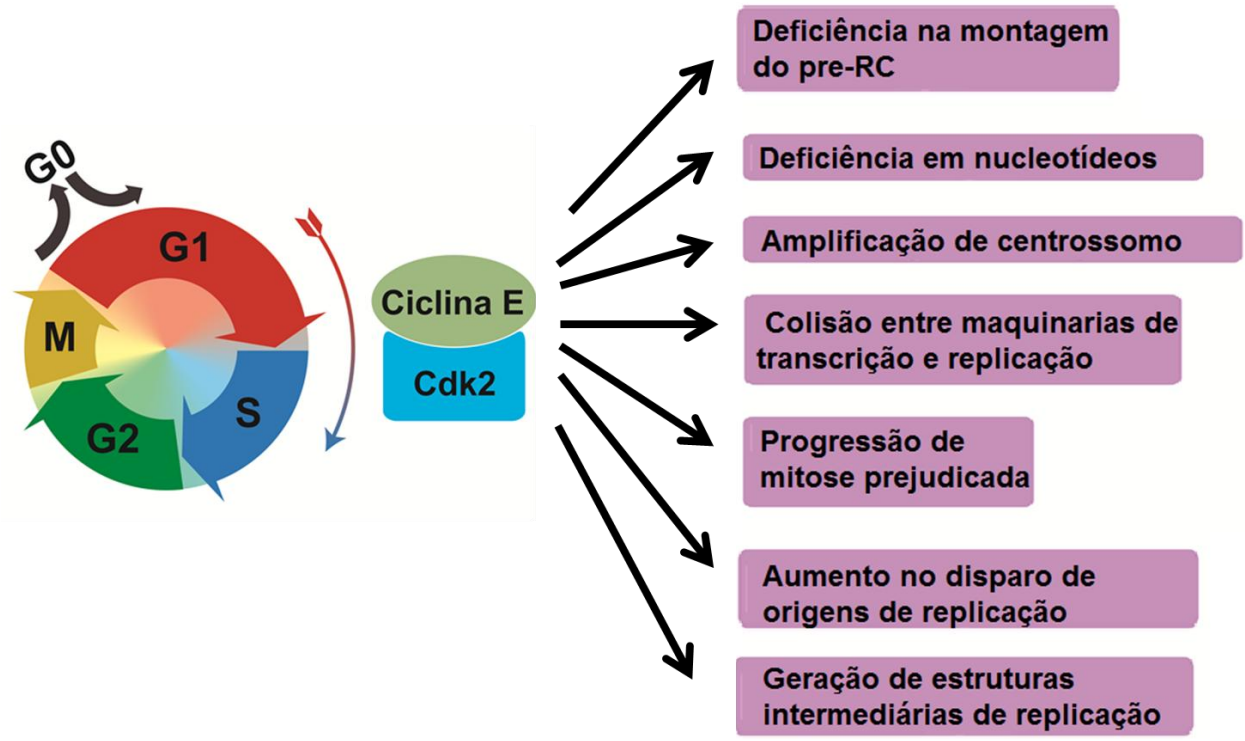


Figura 1.5. Mecanismos de indução de instabilidade genômica por ciclina E-Cdk2. A desregulação de ciclina E está envolvida com diversas causas de instabilidade genômica, contribuindo para o processo de tumorigênese. Entre elas estão a deficiência em nucleotídeos, colisões entre as maquinarias de replicação e transcrição da molécula de DNA, amplificação de centrossomos, dificuldades na progressão pela fase de mitose, aumento no disparo de origens de replicação.

A desregulação de ciclina E1 leva a quebras cromossômicas em regiões de sítios frágeis, gerando um repertório específico de fragilidade dependente do tipo celular estudado (MIRON *et al*., 2015; TEIXEIRA *et al*., 2015). A superexpressão de ciclina E1 em fibroblastos humanos BJ levou à quebras cromossômicas de sítios frágeis. No entanto, o repertório de sítios frágeis comuns pode variar dependendo do insulto oncogênico, do tipo celular ou do tratamento com inibidores de DNA polimerase, como afidicolina (MIRON *et al.,* 2015). Da mesma forma, células do epitélio da glândula mamária humana com altos níveis de ciclina E1 apresentam replicação do DNA incompleta em regiões genômicas de sítios frágeis (TEIXEIRA *et al*., 2015. Nesse trabalho, foi demonstrado que o oncogene ciclina E1 permite que células entrem na fase de mitose sem terem completado a etapa de síntese do DNA, levando a aberrações cromossômicas em regiões genômicas contendo sítios frágeis (TEIXEIRA *et al*., 2015).

A instabilidade cromossômica é uma forma de instabilidade genômica e pode ser definida como uma alta frequência de perdas ou ganhos de cromossomos inteiros ou parte deles. A superexpressão de ciclina E1 em fibroblastos de rato (REFs) e células epiteliais da mama induz instabilidade cromossômica, desviando do número normal de cromossomos dessas linhagens (SPRUCK *et al*., 1999; RAJAGOPALAN *et al*., 2004). A aneuploidia observada foi resultante de perdas e ganhos de cromossomos inteiros, indicando que a desregulação de ciclina E1 pode interferir com a fidelidade de transmissão dos cromossomos. O gene FBXW7/CDC4 codifica para a proteína F-box, responsável pela degradação de ciclina E-Cdk2 via ubiquitinação através do complexo SCF^{Fbxw7} (CLURMAN *et al.,* 1996; WON & REED, 1996; STROHMAIER *et al*., 2001). A mutação de FBXW7/CDC4 em tumores primários leva a desregulação de ciclina E, se mostrando como um fator importante na regulação do ciclo celular por ciclina E (EKHOLM-REED *et al*., 2004). De fato, o acúmulo devido a inativação de FBXW7/CDC4 induz a formação de micronúcleos, levando à instabilidade cromossômica (RAJAGOPALAN *et al*., 2004).

A amplificação de centrossomos também pode gerar aneuploidias e aberrações cromossômicas (GHADIMI *et al*., 2000). Altos níveis de ciclina E associados a perda de p53 levam a amplificação de centrossomos e à instabilidade cromossômica (KAWAMURA e*t al*., 2004). Além disso, a superexpressão das isoformas de baixo peso molecular (LMWI) de ciclina E1 também pode levar à amplificação de centrossomos em células de câncer de mama (BAGHERI-YARMAND *et al*., 2010).

Portanto, uma vez que o estresse replicativo está associado com a tumorigênese, é de grande importância estabelecer uma direta correlação entre o estresse e a instabilidade genômica, bem como os mecanismos que ligam esses dois fenômenos. Além disso, a elucidação dos mecanismos de fragilidade e sua relação com o estresse replicativo e a instabilidade genômica em diferentes tipos tumorais é de fundamental importância para o melhor entendimento do processo de tumorigênense. Dessa forma, a desregulação de ciclina E1 mostra-se cada vez mais relacionadas aos processos de estresse replicativo e instabilidade genômica, embora os mecanismos para que isso aconteça ainda não estão totalmente elucidados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar o efeito da desregulação de ciclina E1 no estresse replicativo e na instabilidade genômica em células do epitélio da glândula mamária humana durante a proliferação celular.

2.2. Objetivos específicos

1. Induzir altos níveis de ciclina E1 em células do epitélio da glândula mamária humana HME1 através de transdução com adenovírus;

2. Avaliar a proliferação de células HME1 com altos níveis de ciclina E1;

3. Avaliar a progressão do ciclo celular, a indução de morte celular e a poliploidia em células HME1 com altos níveis de ciclina E1;

4. Avaliar o estresse replicativo em células HME1 com altos níveis de ciclina E1;

5. Avaliar o efeito da afidicolina na indução do estresse replicativo em células HME1;

6. Avaliar as alterações cromossômicas induzidas por altos níveis de ciclina E1 em células HME1;

7. Avaliar a presença dos sítios frágeis comuns FRA3B e FRA16D em células HME1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

As linhagens celulares obtidas de epitélio da glândula mamária humana utilizadas neste estudo foram hTERT-HME1, MDA-MB-157 e SUM149PT. A linhagem hTERT-HME1 (*hTERT-Human Mammary Ephitelium 1*, ATCC, CRL-4010) foi obtida de uma paciente saudável, por meio de uma cirurgia de mamoplastia e imortalizada *in vitro* através de transdução com retrovírus contendo o cDNA de hTERT. A linhagem MDA-MB-157 (ATCC, HTB-24) foi obtida de uma paciente com carcinoma medular. A linhagem SUM149PT (Asterand) foi obtida de uma paciente com carcinoma ductal invasivo. A linhagem HEK293A (Invitrogen) foi obtida de uma cultura primária de hepatócitos humanos embrionários transformados *in vitro.* Todas as linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Dr. Steven I. Reed (*The Scripps Research Institute*, California, EUA) e caracterizadas como livres de *Mycoplasma* através do kit *MycoAlert Plus* (Lonza, LT07-710), de acordo com as especificações do fabricante.

A linhagem hTERT-HME1 foi cultivada em meio MCDB 131 (Gibco, 10372-019), suplementado com extrato pituitário bovino (30 ng/mL, Hammond Cell Tech), fator de crescimento epidérmico (10 ng/mL, Gibco), hidrocortisona (0,5 µg/mL, Sigma), insulina (5 µg/mL, Sigma), holotransferrina (50 µg/mL, Sigma), soro fetal bovino (1%, Gibco), glutamina (29,2 mg/mL, Gibco), estreptomicina (100 µg/mL, Gibco) e penicilina (100 U/mL, Gibco). A linhagem SUM149PT foi cultivada em meio F-12 Ham´s (Gibco, 31765-035), suplementado com soro fetal bovino (5%, Gibco), hidrocortisona (0,5 µg/mL, Sigma), insulina (10 µg/mL, Sigma), penicilina (100 U/mL, Gibco) e estreptomicina (100 µg/mL, Gibco). A linhagem MDA-MB-157 foi cultivada em meio Leibovitz´s L-15 (Gibco, 11415-064), suplementado com soro fetal bovino (10%, Gibco), estreptomicina (100 µg/mL, Gibco) e penicilina (100 U/mL, Gibco). A linhagem HEK293A foi cultivada em meio DMEM (Gibco, 12100-046), suplementado com soro fetal bovino (10%, Gibco), estreptomicina (100 µg/mL, Gibco) e penicilina (100 U/mL, Gibco). As linhagens celulares foram mantidas a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO_2, com exceção da linhagem MDA-MB-157, que foi mantida a 37°C em ar atmosférico.

3.2. Amplificação adenoviral

As células empacotadoras HEK293A foram utilizadas para a amplificação de adenovírus contendo o cDNA humano de β-globina (Adv-Controle) ou o cDNA humano de ciclina E1 (Adv-Ciclina E1) (EKHOLM-REED *et al*., 2004). Ambas partículas adenovirais foram gentilmente cedidas pelo Dr. Steven I. Reed (*The Scripps Research Institute*, California, EUA). Células HEK293A (3 garrafas de 175 cm^2) foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 (3 x 10^9 partículas virais/garrafa) em 12 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino por 2 horas. Após as 2 horas, o meio de cultura contendo as partículas virais foi retirado e foi adicionado meio de cultura completo. Por volta de 40 horas após a transdução, as células foram recuperadas através de pipetagem e centrifugadas durante 3 minutos a 184 g. O sobrenadante foi dispensado e as células foram ressuspendidas em 400 µL de solução Tris-$MgCl_2$ (10 mM Tris pH 8,0; 10 mM $MgCl_2$), imediatamente congeladas a -196°C e armazenadas a -80°C. As células contendo as partículas virais foram lisadas 3 vezes em banho a 37°C seguido de congelamento a -196°C. Em seguida, o lisado foi centrifugado por 10 minutos a 16.800 g a 4°C. As partículas virais foram recuperadas no sobrenadante e utilizadas para a segunda rodada de amplificação adenoviral. As células HEK293A (15 garrafas de 175 cm^2) foram novamente transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. Após aproximadamente 40 horas da transdução, as células foram recuperadas e centrifugadas como descrito anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 5 mL de solução Tris-$MgCl_2$, congeladas a -196°C e armazenadas a -80°C. Posteriormente, as partículas virais de Adv-Controle e Adv-Ciclina E1 foram purificadas através do kit A*deno-X Maxi Purification* (Clontech, 631032), de acordo com as especificações do fabricante. O título viral foi determinado a partir da quantificação dos ácidos nucleicos presentes nas partículas virais em solução PBS-SDS (1X PBS pH 7,2; 0,1% SDS) e analisadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) a 260 nm. O título viral foi calculado através da fórmula: A_{260} x Fator de diluição x 10^{12} = número de partículas virais/mL, onde A_{260} representa absorbância a 260nm (HITT *et al*., 1998).

3.3. Transdução adenoviral

Para a transdução adenoviral, células HME1 (3 x 10^5) foram plaqueadas em placas de 10 cm de diâmetro (Nunc). Após 24 horas, as células foram transduzidas por 2 horas com Adv-Controle (7,6 x 10^9 partículas virais) ou Adv-Ciclina E1 (3,8 x 10^9 partículas virais) em 3 mL de meio de cultura completo e as placas foram homogeneizadas a cada 30 minutos. Em seguida, o meio de cultura contendo as partículas virais foi retirado e foram adicionados 10 mL de meio de cultura completo a cada placa. As células foram mantidas pelos tempos indicados em cada experimento.

3.4. *Western Blot*

Para a extração de proteínas, as células (3 x 10^6) foram recuperadas através de adição de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco, 25200-072), lavadas em 1X PBS e centrifugadas por 30 segundos a 8.600 g. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspendidas em tampão de lise (50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1% Triton X-100; 0,5% Deoxicolato de Sódio; 0,1% SDS; 10 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4; 1 µg/mL pepstatina A) e inibidores de protease (*Complete protease inhibitor cocktail*, Roche, 04693 124 001), de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram imediatamente congeladas a -196°C e armazenadas a -80°C. Após esse processo, os extratos proteicos foram descongelados em gelo durante 30 minutos e sonicados durante 5 segundos a 30% de amplitude (*Ultrassonic processor GEX 130P, Cole Parmer*). Em seguida, os extratos proteicos foram centrifugados por 10 minutos a 16.800 g a 4°C. Posteriormente, foi adicionado o tampão de amostra 4X (50 mM Tris pH 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 0,0025% azul de bromofenol; 2,5% β-mercaptoetanol) a 1/3 do volume de amostra. As amostras foram incubadas a 100°C durante 5 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 16.800 g.

Os extratos proteicos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE Acrilamida:Bisacrilamida (29:1, Bio-Rad, 161-0156) a 25V por 16 horas em tampão de eletroforese (25 mM Tris; 20 mM glicina; 0,1% SDS). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µM, GE *Healthcare,* 10600003) utilizando o sistema de transferência semi-seco *Owl* HEP-1 (Thermo Scientific) durante 2 horas a 45 mA em tampão de transferência (50 mM

Tris; 25 mM glicina; 0,037% SDS, 10% metanol). Posteriormente, a membrana foi bloqueada com 1X TBS-T pH 7,5 (20 mM Tris; 500 mM NaCl; 0,02% Triton X-100) e 5% de leite ao longo de 1 hora sob agitação branda e temperatura ambiente. Para a detecção das proteínas de interesse, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-ciclina E1 (HE-12, 1:2.000, gentilmente cedido pelo Dr. Steven I. Reed), anti-Cdk1 (Cell Signaling, 9112, 1:1.000) e anti-GAPDH (Santa Cruz, sc-32233, 1:2.000) em 1X TBS-T e 5% de leite por 16 horas a 4°C sob agitação branda. As membranas foram lavadas 3 vezes durante 15 minutos sob agitação branda com 1X TBS-T e incubadas com anticorpos secundários específicos (Pierce, 1:10.000) em 1X TBS-T e 5% de leite por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação branda. As membranas foram novamente lavadas 6 vezes durante 15 minutos com 1X TBS-T e reveladas através de ensaios de quimioluminescência (ECL, Pierce). Por fim, as membranas foram expostas por diferentes períodos de tempo em filmes de raio X (GE *Healthcare*) e revelados em processadora automática (Kodak, Macrotec MX-2).

3.5. Contagem de células

Para a contagem celular, células HME1 ($2,8 \times 10^5$) foram plaqueadas e após 24 horas foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1, conforme descrito no item 3.3. Nos tempos indicados em cada experimento, as células foram recuperadas e centrifugadas a 184 g durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de 1X PBS pH 7,2. As células foram incubadas em 0,2% de Azul de Trypan e imediatamente contadas com auxílio de uma Câmara de Neubauer em microscópio óptico (Olympus CKX31).

3.6. Citometria de fluxo

Para a análise da progressão em ciclo celular, células HME1 (3×10^5) foram plaqueadas e transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 conforme descrito no item 3.3. ---Excluir várias frases aqui!--- Após os tempos indicados em cada experimento, as células foram pulsadas com 2 µM de BrdU (Sigma, B5002) por 30

minutos a 37°C, recuperadas, fixadas em 70% etanol e armazenadas a -20°C por 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 8.600 g por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em 1X PBS pH 7,2; 1% BSA e incubadas sob agitação branda durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em 1 mL de solução desnaturante (2N HCl; 0,5% Triton X-100) e incubadas durante 30 minutos sob agitação branda a temperatura ambiente. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de solução 0,1 M Borax. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de 1X PBS pH 7.2; 1% BSA e incubadas durante 5 minutos sob agitação branda a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas, ressuspendidas em 60 µL de solução 1X PBS pH 7,2; 1% BSA; 0,5% Tween-20 contendo anticorpo anti-BrdU (1:15, *Phoenix Flow Systems*, ABFM18) e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente no escuro. Por fim, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em 1 mL de 1X PBS; 1% BSA, novamente centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de solução de iodeto de propídeo (iodeto de propídeo, 1mg/mL; solução de RNAse: NaCl 5M, Tris 1M, RNAse 2mg/mL; 1X PBS pH 7,2 0,1% Triton X-100). As amostras foram incubadas a 4°C por 16 horas no escuro e analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience).

Para a análise de células com conteúdo de DNA Sub-G0 e poliplóide, células HME1 (3×10^5) foram plaqueadas e transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1, conforme descrito no item 3.3. Após os tempos indicados em cada experimento, as células foram recuperadas, fixadas em 70% etanol e armazenadas a -20°C por 16 horas. As células foram ressuspendidas em 1 mL de 1X PBS pH 7,2; 1% BSA e incubadas sob agitação branda a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de solução de iodeto de propídeo, conforme descrito anteriormente.

Para a sincronização celular, células HME1 (3×10^5) foram plaqueadas e tratadas com 2 mM de timidina (Calbiochem, 6060) por 18 horas. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com 10 mL de meio de cultura cada, liberadas em ciclo celular por 8 horas e pulsadas novamente com 2 mM de timidina por um período de 16 horas. As células foram novamente lavadas e liberadas em ciclo celular por 4, 8 e 12 horas. As células foram recuperadas e fixadas em 70% etanol e armazenadas a -20°C por 16 horas. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 1 mL de solução de iodeto de propídeo por 16 horas a 4ºC e analisadas por

citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience). Para os experimentos de transdução adenoviral em células sincronizadas, células HME1 foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 logo após as lavagens do primeiro bloqueio com timidina.

Para a análise dos efeitos de afidicolina, células HME1 (2,5 x 10^5) foram plaqueadas em placas de 10 cm de diâmetro (Nunc). Após 24 horas, as células foram tratadas com DMSO (Sigma) ou diferentes doses de afidicolina (0,2 ou 0,4 µM, Sigma, A0781) durante 24 ou 48 horas. Após esses intervalos de tempo, as células foram pulsadas com 2 µM de BrdU (Sigma) por 30 minutos, fixadas em 70% etanol a -20°C e marcadas com anticorpo anti-BrdU (*Phoenix Flow Systems*) e iodeto de propídeo (Sigma) conforme descrito anteriormente. Todos os resultados de citometria de fluxo foram analisados no programa *Cell Quest Pro* (BD Biosciences).

3.7. Preparação de cromossomos metafásicos

Para análise dos cromossomos metafásicos, células HME1 (2,8 x 10^5) foram plaqueadas e após 24 horas foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1, conforme descrito no item 3.3. Após 3 dias da transdução, as células foram tratadas com 0,05 µg/mL de solução de colcemide (Roche, 10 295 892 001) durante 2 horas a 37°C. Em seguida, as células foram recuperadas, centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em líquido residual. As células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura:água (1:3) e incubadas durante 15 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram centrifugadas por 30 segundos a 8.600 g, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 1 mL de solução fixadora metanol:etanol (3:1) a 4°C. As células foram centrifugadas e lavadas outras 2 vezes com solução fixadora e armazenadas a -20°C.

Para o espalhamento dos cromossomos metafásicos, lâminas (Produtos Citológicos Soldan) foram lavadas sequencialmente com detergente neutro, água e 100% etanol e armazenadas em água a 4°C. As células fixadas foram distribuídas nas lâminas com auxílio de pipeta Pasteur e as lâminas foram incubadas a 70°C durante 1 minuto. O espalhamento dos cromossomos metafásicos foi avaliado em microscópio óptico (Olympus BX53).

3.8. Coloração com Giemsa

Para a contagem do número de cromossomos e a avaliação de aberrações cromossômicas, as lâminas foram armazenadas a temperatura ambiente por 3 dias após o espalhamento e foram coradas com solução de 4% Giemsa (Merck, 1 09204 1000) durante 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada, secadas e analisadas em microscópio óptico (Olympus BX53) através do programa *Case Data Manager* (*Applied Spectral Imaging, Genasis*).

3.9. *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH)

Células HME1 foram tratadas com solução de colcemide, espalhadas em lâminas e armazenadas a temperatura ambiente como descrito anteriormente. Após 24 horas, as lâminas foram incubadas em solução 2X SSC pH 7,0 durante 2 minutos a temperatura ambiente e desidratadas em séries de etanol de 70, 85 e 100% durante 1 minuto cada. Em seguida, as sondas comerciais para os sítios frágeis FRA3B (BAC 641C17, TAMRA) e FRA16D (BAC 264L1, TAMRA) e o tampão de hibridização foram equilibrados a temperatura ambiente e a mistura foi preparada de acordo com as especificações do fabricante (Empire Genomics). Em seguida, as sondas foram adicionadas às lâminas, seguido de adição de lamínulas seladas com *rubber cement*. As lâminas foram aquecidas a 73°C durante 5 minutos, seguido de incubação a 37°C por 16 horas em Thermobrite (Abbott). Após a hibridação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram lavadas em solução I (0,4X SSC pH 7,0; 0,3% NP-40) a 73°C por 2 minutos e solução II (2X SSC pH 7,0; 0,1% NP-40) a temperatura ambiente por 1 minuto. Posteriormente, os núcleos foram corados com solução de DAPI (60 nM, Invitrogen) e as lamínulas foram seladas com esmalte incolor. Os núcleos foram analisados em microscópio de fluorescência (Olympus BX 53) através do programa *Case Data Manager* (*Applied Spectral Imaging, Genasis*).

3.10. Análise estatística

A análise estatística dos valores observados na contagem de células, na citometria de fluxo e no espalhamento de metáfases entre as células controle e as células com altos níveis de ciclina E1 foi determinada por meio do teste de *Student* (teste t) para comparações simples. As análises estatísticas foram realizadas no

programa *QuickCalcs* (GraphPad Software) e os gráficos foram construídos no programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Indução dos níveis de ciclina E1 em células HME1 através de transdução com adenovírus

Para o estabelecimento do modelo de estresse replicativo, células HME1 foram transduzidas por 2 horas com adenovírus controle (Adv-Controle) ou com concentrações crescentes de adenovírus contendo o cDNA humano de ciclina E1 (Adv-Ciclina E1). Como controle positivo, foram utilizadas as linhagens celulares SUM149PT, que apresenta níveis aumentados de ciclina E1 devido à mutação do gene *Cdc4/Fbxw7* (gene que codifica para um dos componentes do complexo ubiquitina-ligase responsável pela degradação de ciclina E1) e MDA-MB-157, que apresenta amplificação gênica de ciclina E1.

Após 24 horas da transdução, o extrato total de proteínas foi obtido e os níveis de ciclina E1 foram avaliados por *Western blot*. Os resultados indicam que células HME1 transduzidas com concentrações crescentes de Adv-Ciclina E1 apresentam um aumento nos níveis de ciclina E1, enquanto células transduzidas com Adv-Controle não apresentam níveis detectáveis de ciclina E1 (Figura 4.1). As células HME1 foram transduzidas com concentrações baixa ($1,2 \times 10^9$ partículas virais), intermediária (3×10^9 partículas virais) e alta (6×10^9 partículas virais). As concentrações intermediária e alta de ciclina E1 foram similares às das obtidas das linhagens de câncer de mama MDA-MB-157 e SUM149PT. O resultado de *Western blot* indicou a existência de duas bandas de Adv-Ciclina E1. A presença destas duas bandas ocorre devido à clivagem proteolítica de ciclina E1 em formas de baixo peso molecular. A concentração intermediária de Adv-Ciclina E1 (3×10^9 partículas virais) titulada nesse experimento foi utilizada em todos os experimentos subsequentes.

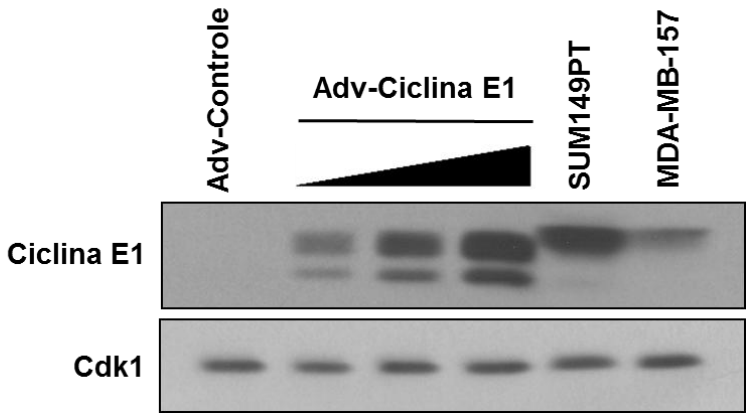


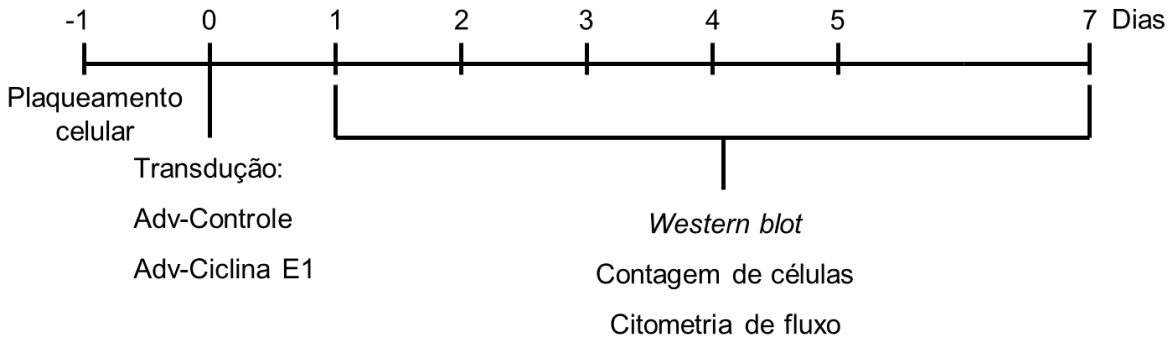
Figura 4.1. Indução dos níveis de ciclina E1 em células HME1 é similar aos níveis observados em linhagens de câncer de mama. Células HME1 foram plaqueadas e transduzidas com Adv-Controle (6 x 10^9 partículas virais) ou com concentrações crescentes de Adv-Ciclina E1 (1,2, 3 e 6 x 10^9 partículas virais) por 2 horas. Após 24 horas de transdução, os extratos protéicos foram obtidos com tampão de lise e separados em gel SDS-PAGE a 10%. Os extratos protéicos das linhagens celulares SUM149PT e MDA-MB-157 foram utilizados como controles positivos para altos níveis de ciclina E1 em câncer de mama. Os níveis de ciclina E1 (49 kDa) foram normalizados através dos níveis de Cdk1 (34 kDa). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.2. Avaliação dos níveis protéicos de ciclina E1 em células HME1 ao longo do tempo

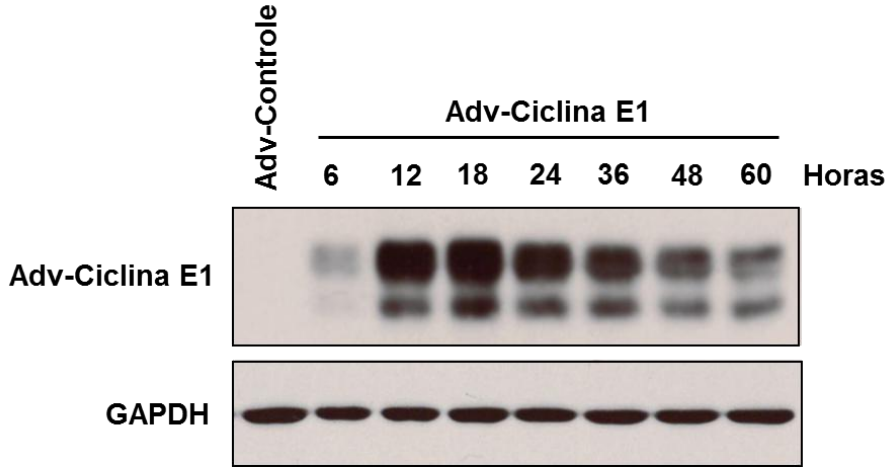
Para avaliar os níveis protéicos de ciclina E1 ao longo do tempo, células HME1 foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 conforme descrito anteriormente, e as células foram analisadas após 1, 2, 3, 4, 5 e 7 dias (Figura 4.2A). Nos tempos indicados, os extratos protéicos foram obtidos e avaliados por *Western blot*. Ao longo do experimento, as células foram repicadas a cada 2-3 dias para manutenção do crescimento celular em condições de sub-confluência.

A análise dos resultados indicou que os níveis proteicos de ciclina E1 atingem um pico de síntese por volta de 18 a 24 horas após a transdução (Figura 4.2B). Os níveis de ciclina E1 diminuem após 48 horas de transdução (Figura 4.2B-C) e se tornam cada vez menores ao longo do tempo, culminando com a redução quase total em 7 dias (Figura 4.2D). O complexo ubiquitina-ligase SCF^{Fbxw7}, possivelmente, atua como responsável pela degradação de ciclina E1 ao longo do tempo (CLURMAN *et al*., 1996; WON & REED, 1996). O sistema de transdução com adenovírus não é capaz de se integrar no genoma celular e, portanto, a expressão do gene de interesse é transiente. Os resultados sugerem que os níveis de ciclina E1 atingem rapidamente um pico de síntese protéica após a transdução com adenovírus e são quase totalmente degradados após 7 dias da transdução.

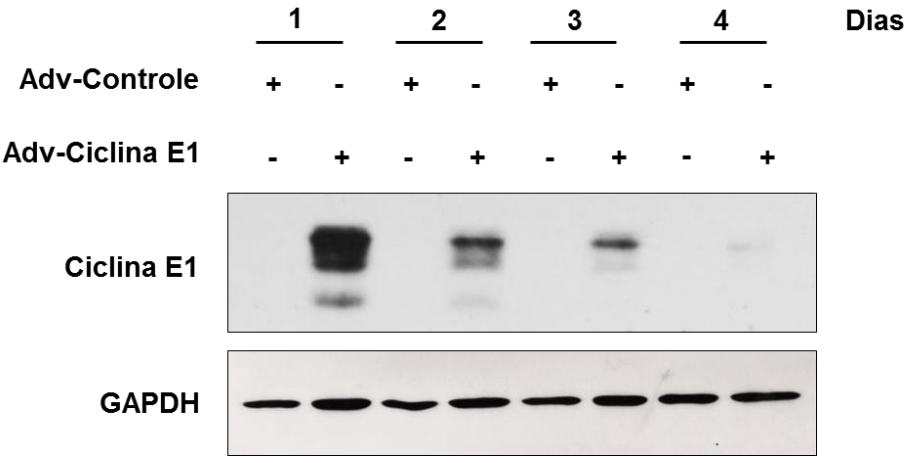
A


-1
0
1
2
3
4
5
7 Dias
Plaqueamento celular
Transdução:
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
Western blot
Contagem de células
Citometria de fluxo

B


Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
6 12 18 24 36 48 60 Horas
Adv-Ciclina E1
GAPDH

C


1 2 3 4 Dias
Adv-Controle + - + - + - + -
Adv-Ciclina E1 - + - + - + - +
Ciclina E1
GAPDH

D

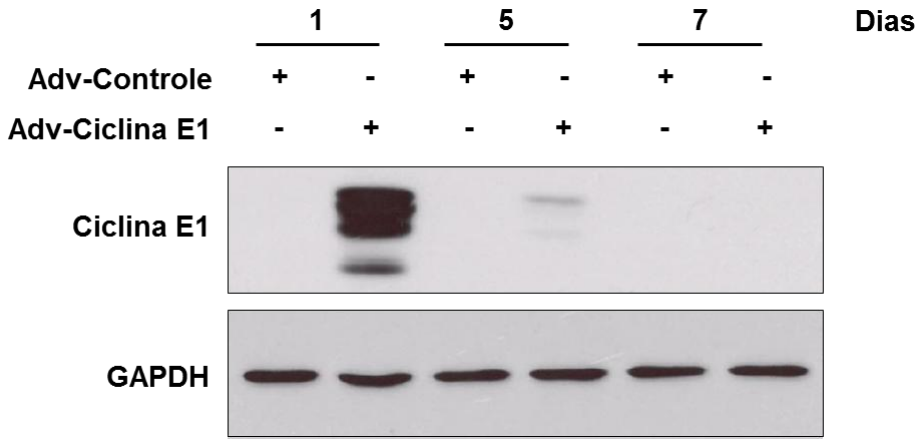


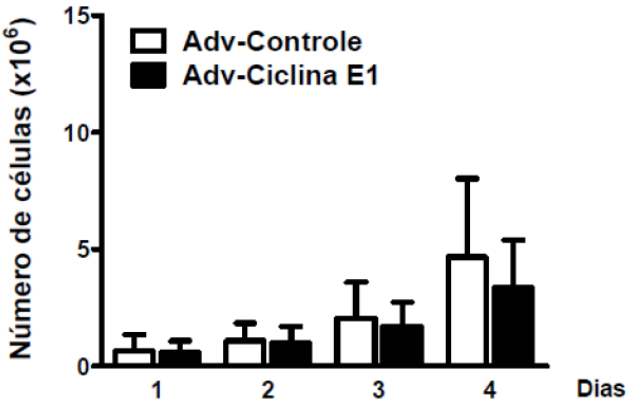
Figura 4.2. Níveis protéicos de ciclina E1 em células HME1 atingem um pico de síntese em 18-24 horas após a transdução com adenovírus. A) Representação esquemática do protocolo de transdução de células HME1 com adenovírus e extração de proteínas para avaliação por *Western blot.* Células HME1 foram plaqueadas e transduzidas por 2 horas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 após 24 horas. Em seguida, as células foram mantidas em cultura e os extratos protéicos foram obtidos nos tempos indicados. B, C e D) Análise dos níveis de ciclina E1 em células HME1 transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 entre 6-60 horas (B), 1-4 dias (C) e 1-7 dias (D) após a transdução. Os extratos protéicos foram obtidos com tampão de lise e separados em gel SDS-PAGE a 10%. Os níveis de ciclina E1 (49 kDa) foram normalizados através dos níveis de GAPDH (37 kDa). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.3. Avaliação da proliferação de células HME1 com altos níveis de ciclina E1

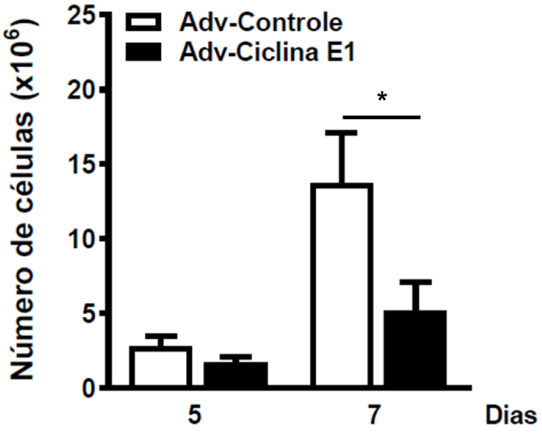
Para determinar se os altos níveis de ciclina E1 interferem com a proliferação celular, células HME1 foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1, conforme descrito anteriormente (Figura 4.2A). Nos tempos indicados, as células foram recuperadas e contadas por meio de coloração com azul de Trypan em câmara de Neubauer. Os resultados demonstram que os altos níveis de ciclina E1 parecem não interferir com o número de células HME1 ao longo de 1-4 dias quando comparadas com células controle (Figura 4.3A).

Da mesma forma, não foi observada uma diferença significativa no número de células HME1 controle ou com altos níveis de ciclina E1 em tempos mais tardios, apesar de haver uma tendência à redução no número de células com altos níveis de ciclina E1 (Figura 4.3B). Em todos os tempos analisados, a frequência de células coradas com azul de Trypan foi menor do que 9%, tanto em células HME1 controle como em células com altos níveis de ciclina E1 (dados não mostrados).

A



B



4.3. Altos níveis de ciclina E1 não alteram o número de células HME1 ao longo de 7 dias. A e B) Células HME1 foram plaqueadas e transduzidas com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas) conforme descrito anteriomente. Após os tempos indicados, o número de células foi avaliado por coloração com azul de Trypan e contagem em câmara de Neubauer. Os resultados representam as médias ± desvio padrão de três experimentos independentes. Frequência de número de células em 1-4 dias (A) e 5 e 7 dias (B) após a transdução com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas). Os valores representam as médias ± desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. Os valores em cada uma das fases do ciclo celular foram comparados pelo teste t *de Student.* O asterisco (*) representa $p < 0,05$.

4.4. Avaliação da progressão do ciclo celular em células HME1 com altos níveis de ciclina E1

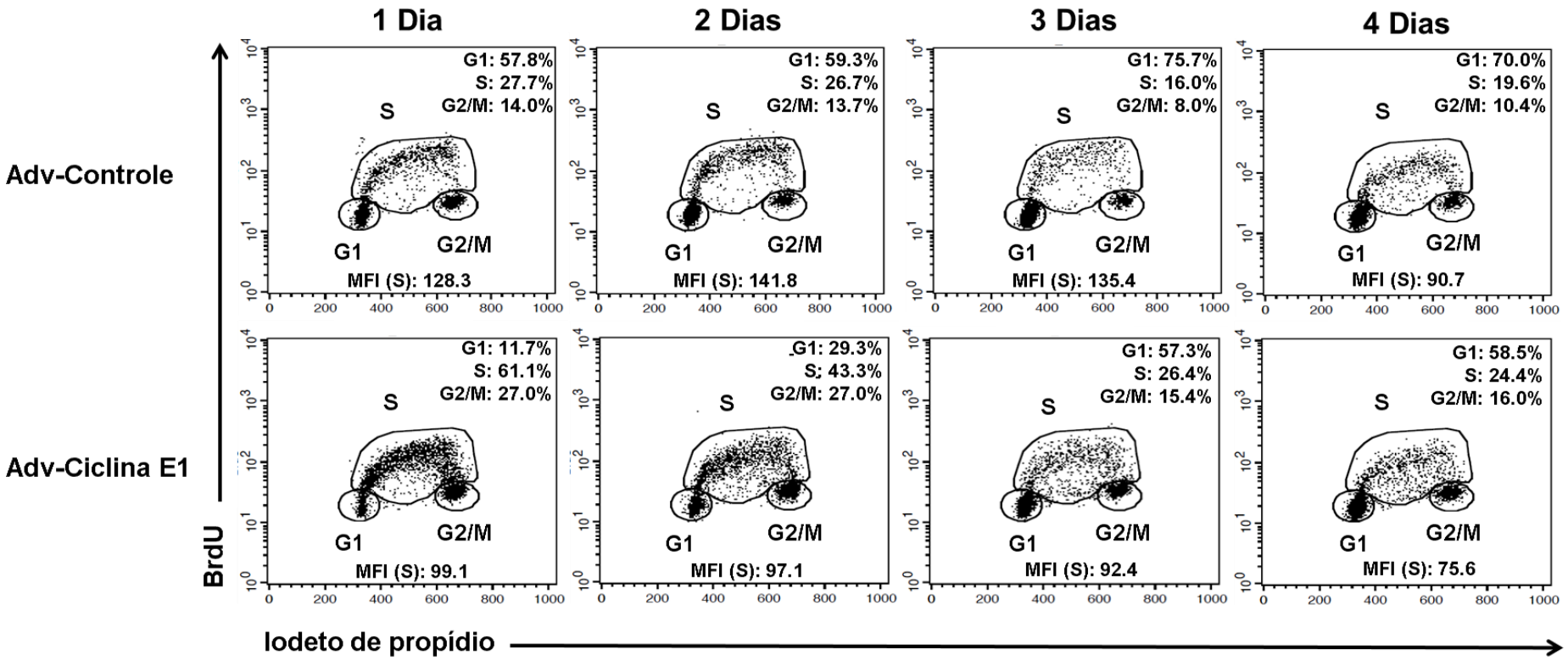
Altos níveis de ciclina E1 já foram descritos por alterarem a dinâmica de progressão do ciclo celular, induzindo uma rápida passagem pela fase G1 e prolongando a fase S, quando comparadas a células controle (OHTSUBO & ROBERTS, 1993). Além disso, altos níveis de ciclina E1 levam ao fenômeno de estresse replicativo, caracterizado por uma progressão lenta da forquilha de replicação (BESTER *et al*., 2011). Para avaliar se a desregulação dos níveis de ciclina E1 em células HME1 é capaz de induzir esses efeitos biológicos, células HME1 foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 conforme descrito anteriormente (Figura 4.2A). Após os tempos indicados, as células foram fixadas e a progressão pelas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio, utilizado como marcador do conteúdo de DNA, e anticorpo anti-BrdU para verificação de células com síntese ativa da molécula de DNA.

A análise por citometria de fluxo indicou que as células HME1 transduzidas com Adv-Ciclina E1 apresentam uma progressão mais rápida pela fase G1 do ciclo celular (11,7%) quando comparadas às células transduzidas com Adv-Controle (57,8%) após 1 dia de transdução (Figura 4.4A). Além disso, células HME1 com altos níveis de ciclina E1 apresentaram uma frequência maior de células em fase S (61.1%) quando comparadas às células Adv-Controle (27.7%) após 1 dia da transdução. Em tempos mais tardios, esta proporção é mantida, porém as diferenças nas frequências das células Adv-Controle e Adv-Ciclina E1 são menores após 7 dias de transdução, tanto em células em fase G1 (59,6% versus 42,2%) como em fase S (30,1% versus 39,3%) do ciclo celular (Figura 4.4B). As células HME1 com altos níveis de ciclina E1 também apresentaram menor incorporação de BrdU, um análogo de timidina, que permite avaliar a frequência de células com replicação ativa da molécula de DNA. A intensidade média de fluorescência (MFI) em fase S de células HME1 transduzidas com Adv-Ciclina E1 foi consistentemente menor do que células HME1 transduzidas com Adv-Controle em fase S do ciclo celular ao longo dos 7 dias após a transdução (Figura 4.4A-B).

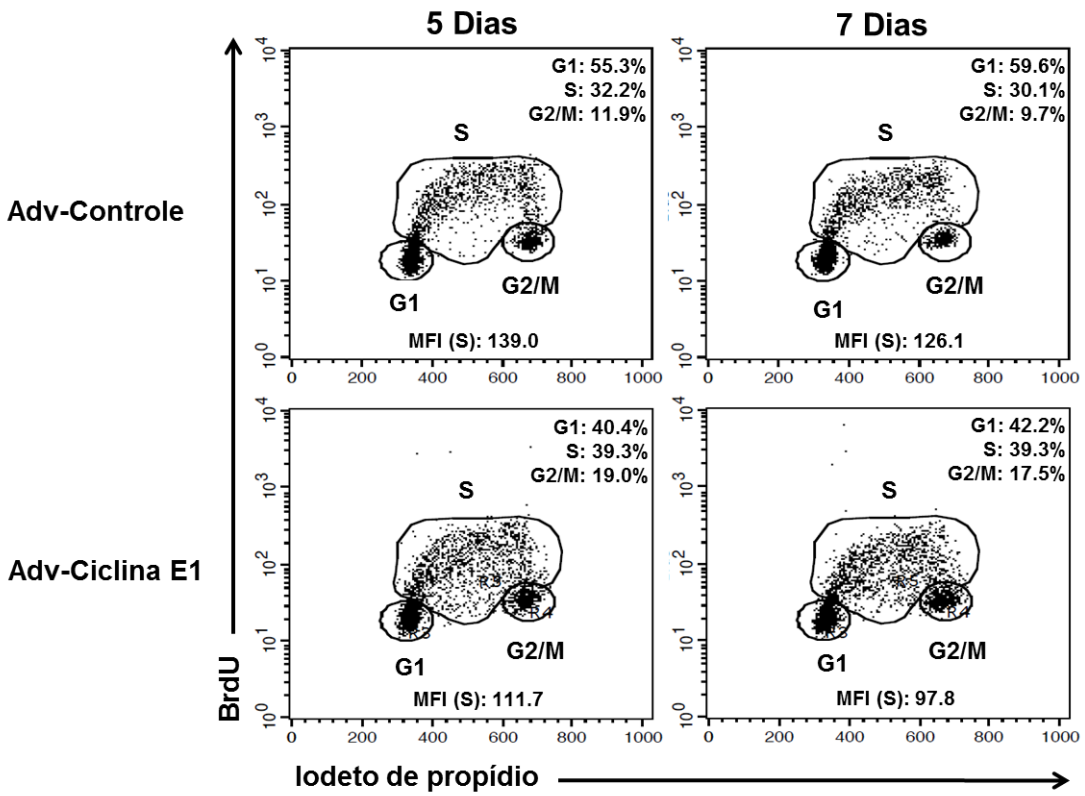
Os resultados obtidos corroboram os resultados descritos na literatura, uma vez que observamos que a desregulação de ciclina E1 reduz a frequência de células em fase G1 e aumenta a frequência de células em fase S, além de diminuir a

incorporação de BrdU, sugerindo a ocorrência de estresse replicativo, especialmente nos primeiros dias após a transdução com adenovírus.

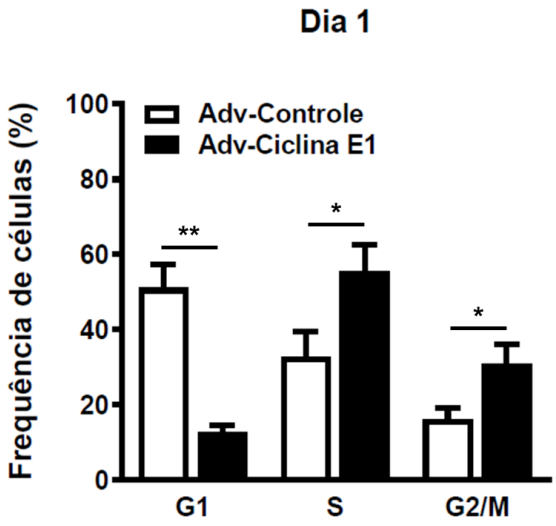
A


1 Dia
2 Dias
3 Dias
4 Dias
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
BrdU
Iodeto de propídio
G1: 57.8%
S: 27.7%
G2/M: 14.0%
MFI (S): 128.3
G1: 59.3%
S: 26.7%
G2/M: 13.7%
MFI (S): 141.8
G1: 75.7%
S: 16.0%
G2/M: 8.0%
MFI (S): 135.4
G1: 70.0%
S: 19.6%
G2/M: 10.4%
MFI (S): 90.7
G1: 11.7%
S: 61.1%
G2/M: 27.0%
MFI (S): 99.1
G1: 29.3%
S: 43.3%
G2/M: 27.0%
MFI (S): 97.1
G1: 57.3%
S: 26.4%
G2/M: 15.4%
MFI (S): 92.4
G1: 58.5%
S: 24.4%
G2/M: 16.0%
MFI (S): 75.6
S
G1
G2/M

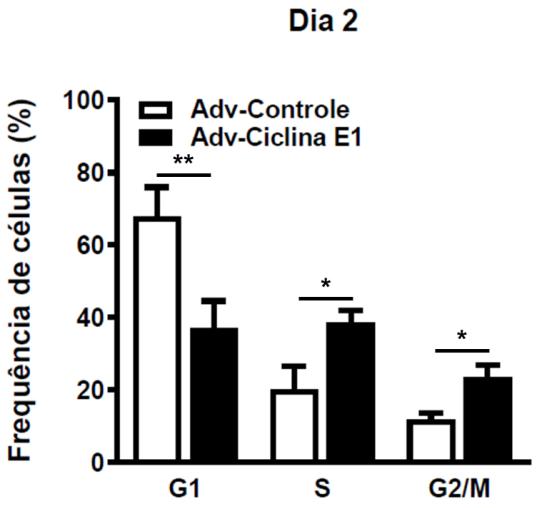
B


5 Dias
7 Dias
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
G1: 55.3%
S: 32.2%
G2/M: 11.9%
MFI (S): 139.0
G1: 59.6%
S: 30.1%
G2/M: 9.7%
MFI (S): 126.1
G1: 40.4%
S: 39.3%
G2/M: 19.0%
MFI (S): 111.7
G1: 42.2%
S: 39.3%
G2/M: 17.5%
MFI (S): 97.8
S
G1
G2/M
BrdU
Iodeto de propídio

C


Dia 1
Frequência de células (%)
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
**
*
*
G1
S
G2/M

D


Dia 2
Frequência de células (%)
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
**
*
*
G1
S
G2/M

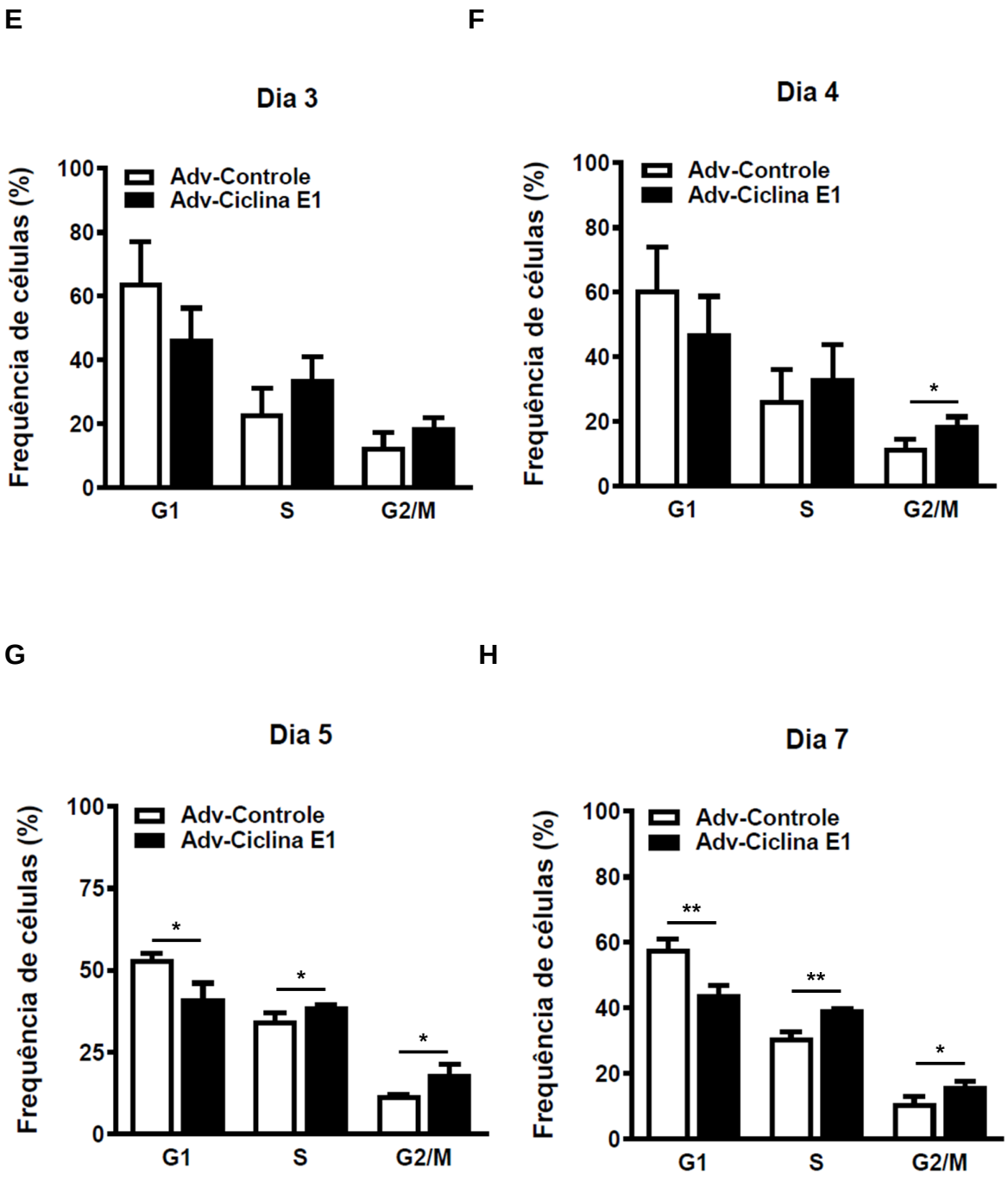


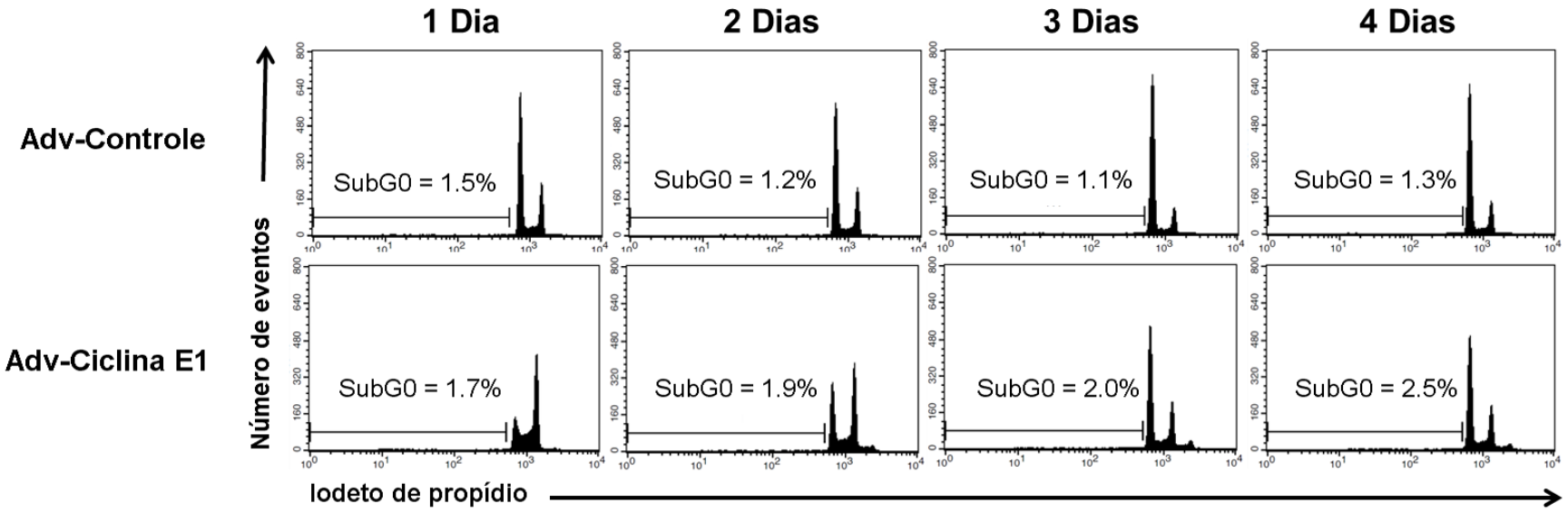
Figura 4.4. Altos níveis de ciclina E1 induzem alteração na progressão do ciclo celular de células HME1. A e B) Células HME1 foram plaqueadas, transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 e mantidas em cultura pelos tempos indicados. Em seguida, as células foram pulsadas com BrdU por 30 minutos, fixadas em 70% etanol à -20°C, marcadas com iodeto de propídio e anticorpo anti-BrdU e analisadas por citometria de fluxo. As frequências das populações celulares nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular e as intensidades médias de fluorescência (MFI) de células em fase S estão representadas dentro de cada gráfico. C-H) Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular em 1-4 dias (C-F) e 5-7 dias (G e H) após a transdução com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. Os valores em cada uma das fases do ciclo celular foram comparados pelo teste t *de Student.* Os asteriscos (* ou **) representam $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, respectivamente.

4.5. Avaliação da morte celular e poliploidia em células HME1 com altos níveis de ciclina E1

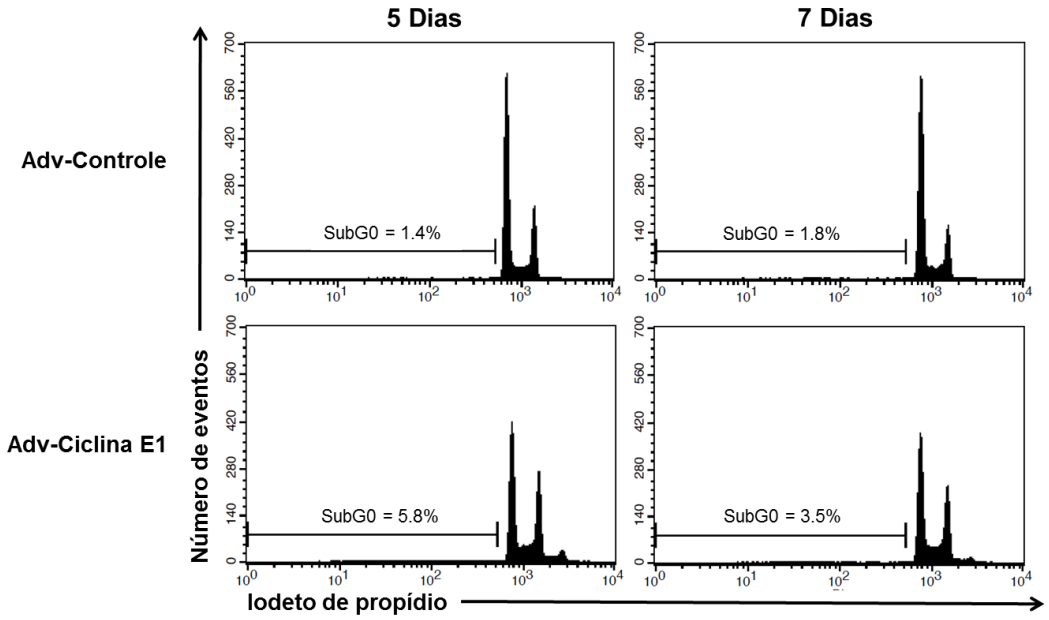
Para avaliar se a desregulação de ciclina E1 é capaz de induzir morte celular, células HME1 foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 conforme descrito anteriormente (Figura 4.2A). Nos tempos indicados, as células foram fixadas e a frequência de células com conteúdo de DNA Sub-G0 (conteúdo de DNA menor do que o observado em células em fase G0/G1 do ciclo celular) foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio. Os resultados indicam que a população de células HME1 com altos níveis de ciclina E1 e conteúdo de DNA Sub-G0 é similar à frequência de células controle em todos os tempos analisados, tanto em tempos iniciais (1,2% Adv-Controle versus 1,9% Adv-Ciclina E1 em 2 dias) como em tempos mais tardios (1,8% Adv-Controle versus 3,5% Adv-Ciclina E1 em 7 dias) (Figuras 4.5A-D).

Da mesma forma, também foi avaliada a frequência de células poliplóides (conteúdo de DNA maior do que o observado em células em fases G2/M do ciclo celular). Os dados indicam que células com desregulação de ciclina E1 apresentam uma frequência de poliploidia significativamente maior quando comparadas às células controle (Figura 4.5E-H). Após 2 dias da transdução, 8,7% das células com altos níveis de ciclina E1 apresentaram conteúdo de DNA poliplóide, enquanto apenas 0,6% das células controle apresentam este fenótipo (Figura 4.5E). Os resultados foram similares em tempos mais tardios. Após 7 dias da transdução, 5,1% das células com altos níveis de ciclina E1 apresentaram conteúdo de DNA poliplóide contra 1,3% das células controle (Figura 4.5F). Esses resultados indicam que altos níveis de ciclina E1 em células HME1 não interferem com a morte celular, mas podem induzir eventos de poliploidia.

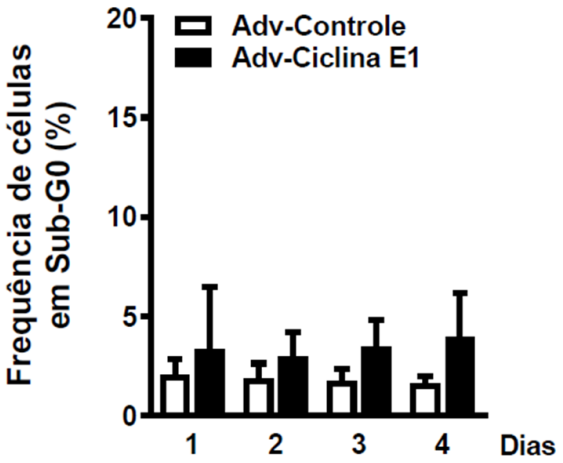
A


1 Dia
2 Dias
3 Dias
4 Dias
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
SubG0 = 1.5%
SubG0 = 1.2%
SubG0 = 1.1%
SubG0 = 1.3%
SubG0 = 1.7%
SubG0 = 1.9%
SubG0 = 2.0%
SubG0 = 2.5%
Número de eventos
Iodeto de propídio

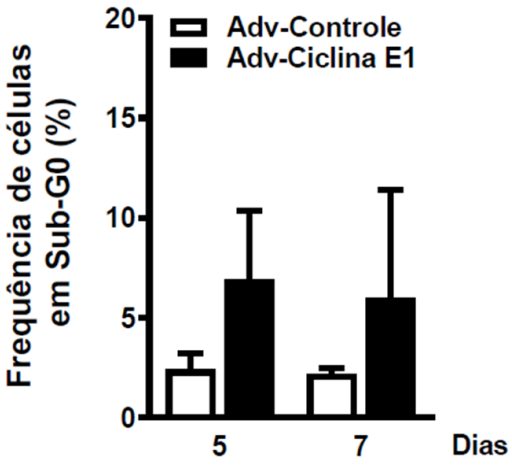
B


5 Dias
7 Dias
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
SubG0 = 1.4%
SubG0 = 1.8%
SubG0 = 5.8%
SubG0 = 3.5%
Número de eventos
Iodeto de propídio

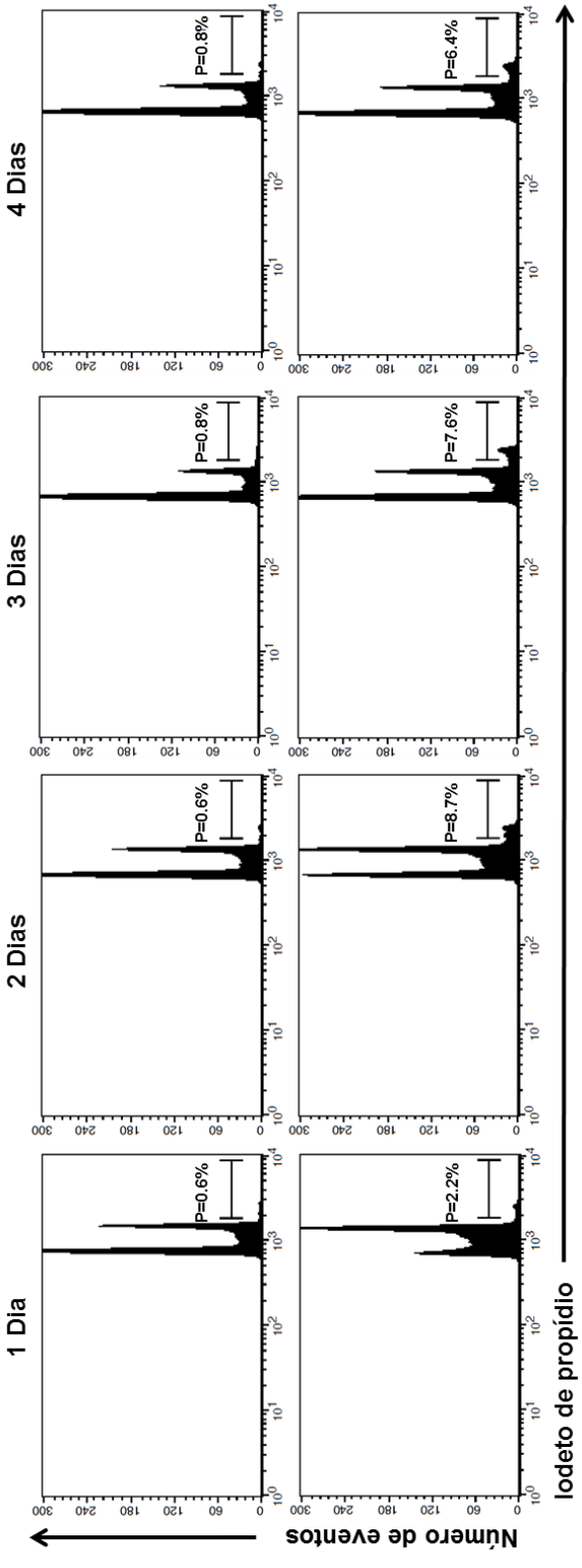
C


Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
Frequência de células em Sub-G0 (%)
Dias

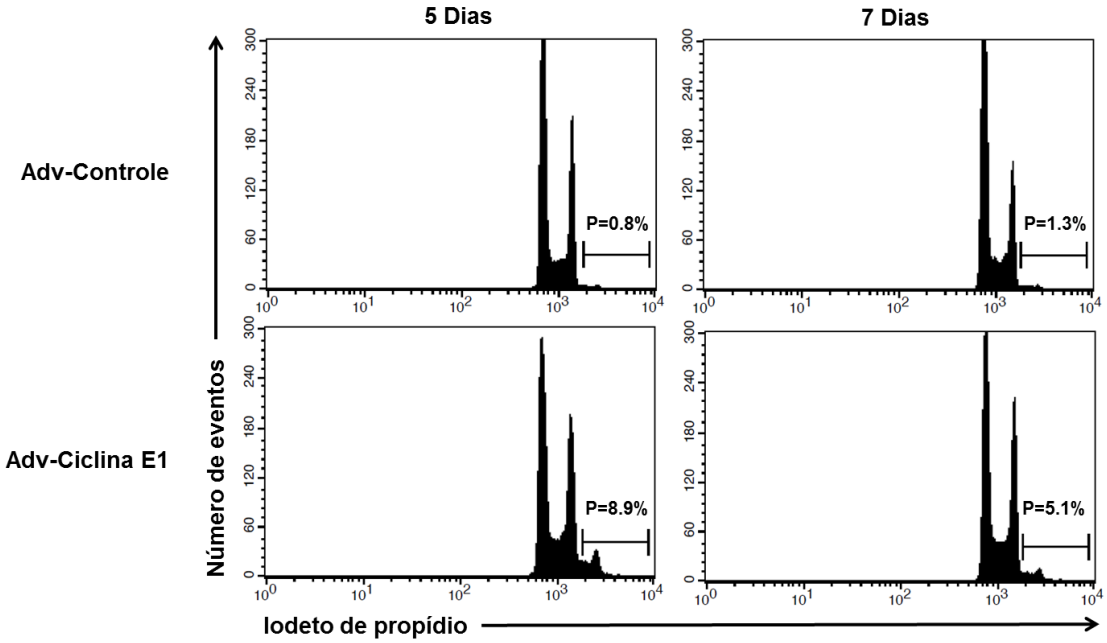
D


Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
Frequência de células em Sub-G0 (%)
Dias

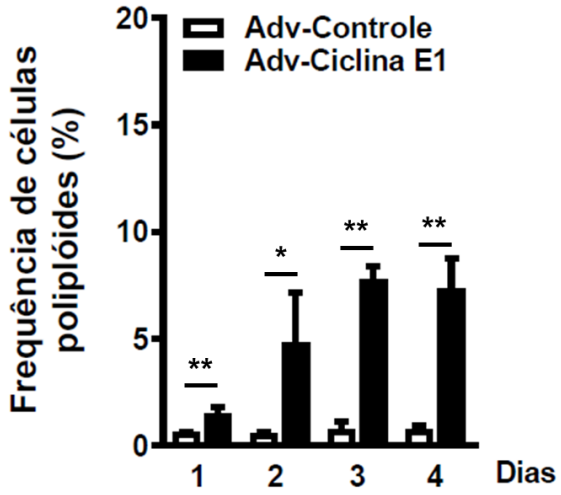
E


1 Dia
2 Dias
3 Dias
4 Dias
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
P=0.6%
P=0.6%
P=0.8%
P=0.8%
P=2.2%
P=8.7%
P=7.6%
P=6.4%
Número de eventos
Iodeto de propídio

F



G



H

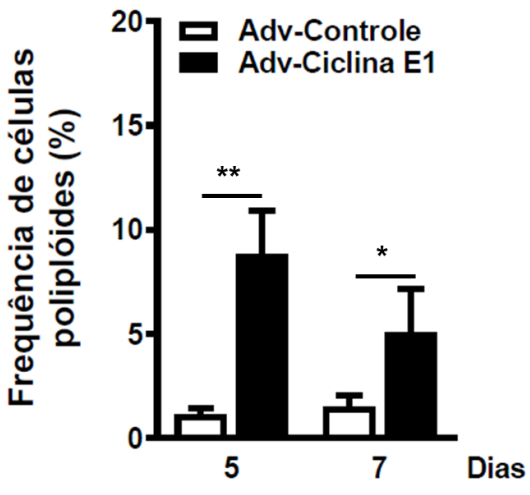


Figura 4.5. Altos níveis de ciclina E1 não alteram a frequência de células HME1 com conteúdo de DNA Sub-G0 mas induzem poliploidia. Células HME1 foram plaqueadas, transduzidas por 2 horas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 e mantidas em cultura pelos tempos indicados. As células foram fixadas em 70% etanol a -20°C, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. A e B) As frequências de células com conteúdo de DNA Sub-G0 estão representadas dentro de cada histograma. C e D) Frequência de células com conteúdo de DNA Sub-G0 em 1-4 dias (C) e 5-7 dias (D) após a transdução com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas). E e F) As frequências de células com conteúdo de DNA poliplóide (P) estão representadas dentro de cada histograma. G e H) Frequência de células com conteúdo de DNA

poliplóide em 1-4 dias (G) e 5-7 dias (H) após a transdução com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas). C, D, G, H) Os valores representam as médias ± desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. Os valores em cada um dos tempos indicados foram comparados pelo teste t *de Student.* Os asteriscos (* ou **) representam $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, respectivamente. As frequências das populações celulares nas fases G1, S e G2/M do ciclo estão representadas dentro de cada gráfico. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

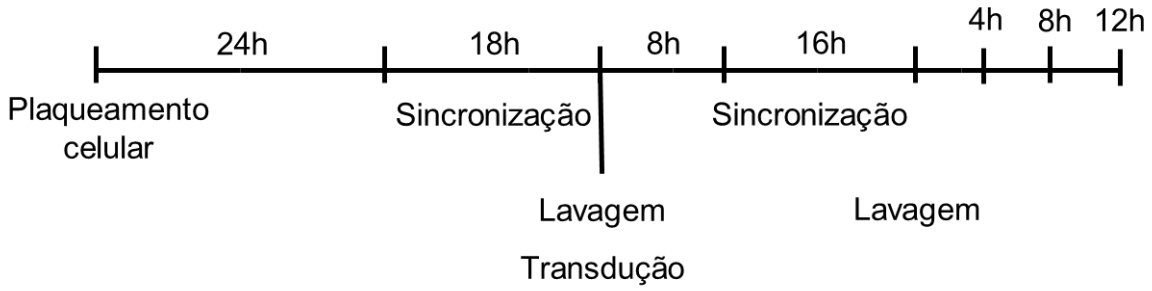
4.6. Sincronização de células HME1 ao longo do ciclo celular

Para a melhor análise do fenômeno de estresse replicativo, células HME1 foram cultivadas e sincronizadas através de bloqueio duplo com timidina, conforme descrito no item 3.6 (Figura 4.6A). Altas concentrações de timidina interferem com a via de biossíntese de desoxirribonucleotídeos, prejudicando a fase de síntese da molécula de DNA (HARPER, 2005). Células HME1 não sincronizadas foram utilizadas como controle. A progressão das células pelas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio, conforme descrito anteriormente. O tratamento das células com timidina por 18 horas induziu a sincronização celular na transição das fases G1/S (Figura 4.6B, Sincronizada 18h). A retirada de timidina do meio de cultura por 8 horas permitiu a progressão das células ao longo do ciclo celular, especificamente para as fases G2/M com, aproximadamente, 66% das células nestas fases (Sincronizada 18h/8h). Em seguida, as células foram sincronizadas novamente na transição das fases G1/S através de tratamento com timidina por 16 horas (Sincronizada 18h/8h/16h). Finalmente, a retirada da timidina do meio de cultura por 4 e 8 horas permitiu a progressão das células de forma sincronizada para as fases S e G2/M, respectivamente (Sincronizada 18h/8h/16h/4h e 18h/8h/16h/8h). Como pode ser observado, aproximadamente 67% das células se encontram em fase S após 4 horas da liberação do segundo bloqueio de timidina (Sincronizada 18h/8h/16h/4h), enquanto aproximadamente 84% das células se encontram nas fases G2/M após 8 horas de liberação do segundo bloqueio (Sincronizada 18h/8h/16h/8h).

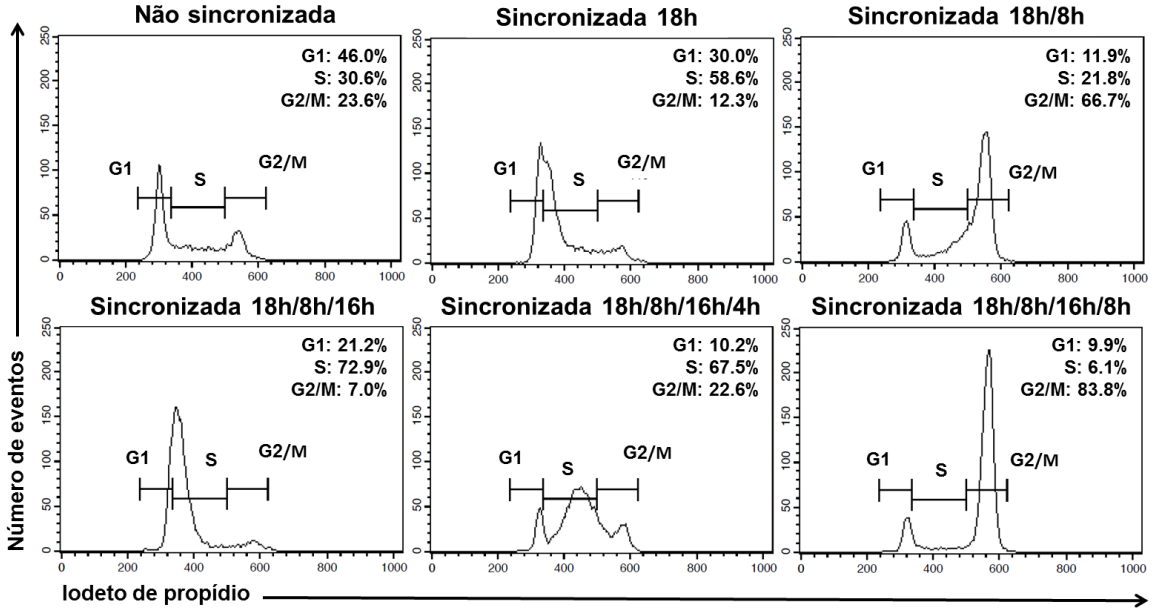
Para melhor análise do fenótipo de estresse replicativo, células HME1 foram sincronizadas com timidina conforme descrito acima e transduzidas por 2 horas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 logo após a liberação do primeiro bloqueio com timidina (Figura 4.6A). Ao final do segundo bloqueio, as células foram liberadas em ciclo celular e pulsadas com BrdU após 4, 8 e 12 horas da retirada de timidina. Os resultados indicam que, após 4 horas da retirada de timidina, a maioria das células com altos níveis de ciclina E1 estão progredindo pela fase S (Figura 4.6C). Além disso, após 4 horas da liberação da timidina, as células HME1 com altos níveis de ciclina E1 incorporaram menos BrdU do que as células controle (MFI de fase S: 76,5versus 97,5, respectivamente). Após 8 horas de retirada da timidina, a maioria das células controle se encontra nas fases G2/M (71%), enquanto somente 50,8% de células com altos níveis de ciclina E1 se encontram nas fases G2/M e 44,6% das

células ainda se encontram em fase S. De forma similar, após 8 horas de liberação da timidina, as células com altos níveis de ciclina E1 incorporaram menos BrdU que as células controle controle (MFI de fase S: 75,2 versus 123,5, respectivamente), e o mesmo. Por fim, após 12 horas de retirada da timidina, a maioria das células controle se encontra na fase G1 (77%) e incorporaram mais BrdU (MFI de fase S: 97,2), enquanto a maioria das células com altos níveis de ciclina E1 ainda se encontra nas fases G2/M (59,9%) e incorporaram menos BrdU (MFI de fase S: 71,0). Estes dados sugerem que as células HME1 podem ser sincronizadas ao longo das diferentes fases do ciclo celular, permitindo a melhor análise do fenômeno de estresse replicativo ao longo da progressão pela fase S.

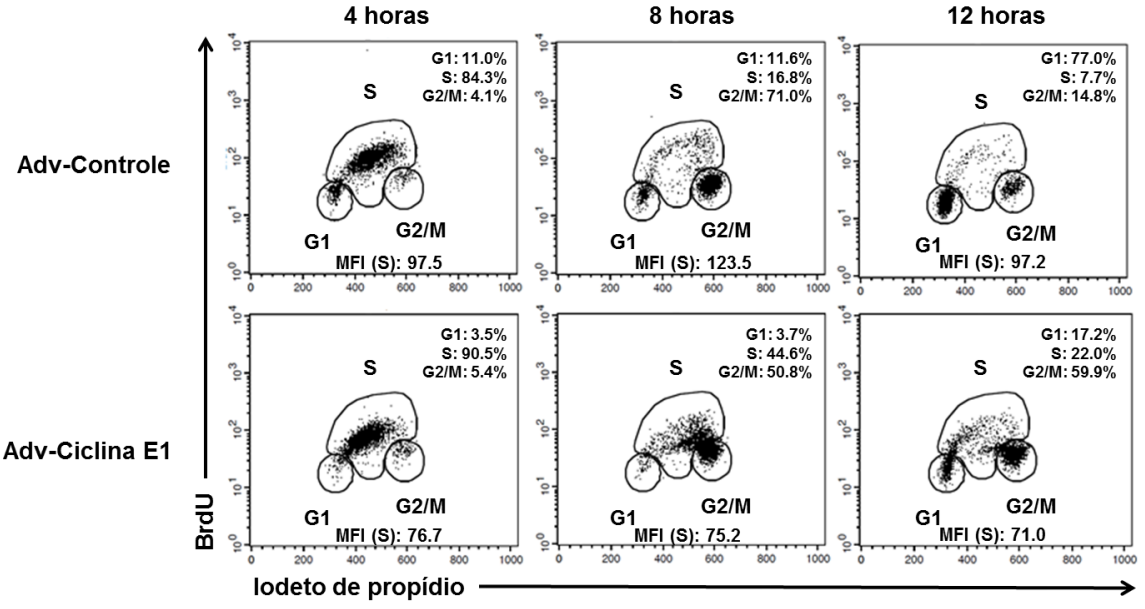
A


24h
18h
8h
16h
4h
8h
12h
Plaqueamento celular
Sincronização
Sincronização
Lavagem
Lavagem
Transdução

B


Não sincronizada
G1: 46.0%
S: 30.6%
G2/M: 23.6%
Sincronizada 18h
G1: 30.0%
S: 58.6%
G2/M: 12.3%
Sincronizada 18h/8h
G1: 11.9%
S: 21.8%
G2/M: 66.7%
Sincronizada 18h/8h/16h
G1: 21.2%
S: 72.9%
G2/M: 7.0%
Sincronizada 18h/8h/16h/4h
G1: 10.2%
S: 67.5%
G2/M: 22.6%
Sincronizada 18h/8h/16h/8h
G1: 9.9%
S: 6.1%
G2/M: 83.8%
G1
S
G2/M
Número de eventos
Iodeto de propídio

C


4 horas
8 horas
12 horas
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
G1: 11.0%
S: 84.3%
G2/M: 4.1%
MFI (S): 97.5
G1: 11.6%
S: 16.8%
G2/M: 71.0%
MFI (S): 123.5
G1: 77.0%
S: 7.7%
G2/M: 14.8%
MFI (S): 97.2
G1: 3.5%
S: 90.5%
G2/M: 5.4%
MFI (S): 76.7
G1: 3.7%
S: 44.6%
G2/M: 50.8%
MFI (S): 75.2
G1: 17.2%
S: 22.0%
G2/M: 59.9%
MFI (S): 71.0
S
G1
G2/M
BrdU
Iodeto de propídio

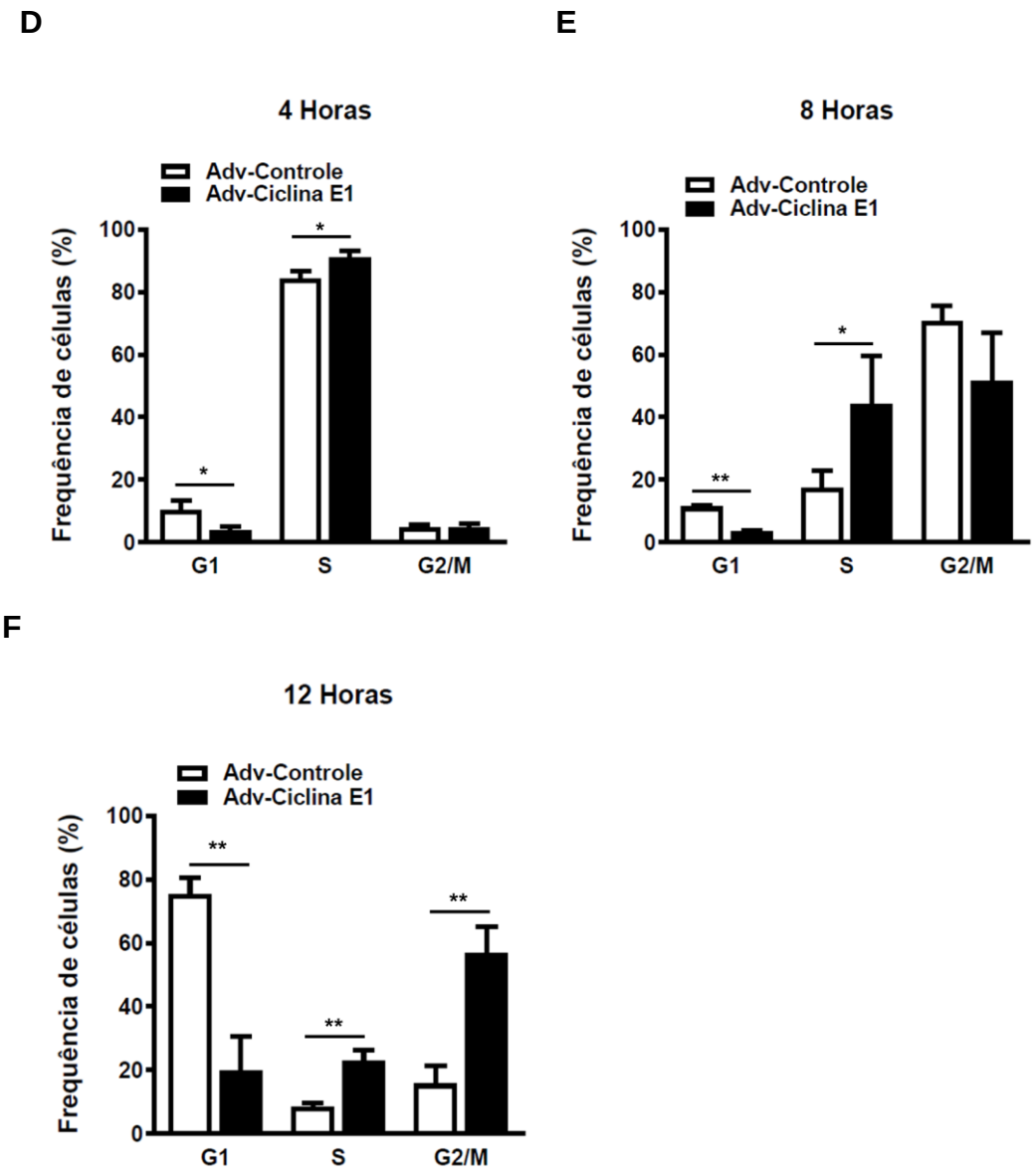


Figura 4.6. Altos níveis de ciclina E1 retardam a progressão pela fases e a entrada nas fases G2/M o ciclo celular. A) Representação esquemática do protocolo de sincronização celular. Células HME1 foram plaqueadas e sincronizadas ou não com bloqueio duplo de timidina, fixadas e marcadas com iodeto de propídio (B) ou sincronizadas com timidina, transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1 e pulsadas com BrdU após 4, 8 e 12 horas de retirada da timidina do meio de cultura (C). Todas as condições foram analisadas por citometria de fluxo. As frequências das populações celulares nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular e as intensidades médias de fluorescência (MFI) de células em fase S estão representadas dentro de cada gráfico. (D-F) Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular após 4 horas (D), 8 horas (E) e 12 horas (F) de liberação do bloqueio duplo de timidina após a transdução com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes. Os valores em cada uma das fases do ciclo celular foram comparados pelo teste t *de Student.* Os asteriscos (* ou **) representam $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, respectivamente. As frequências das populações celulares nas fases G1, S e G2/M do ciclo estão representadas dentro de cada gráfico.

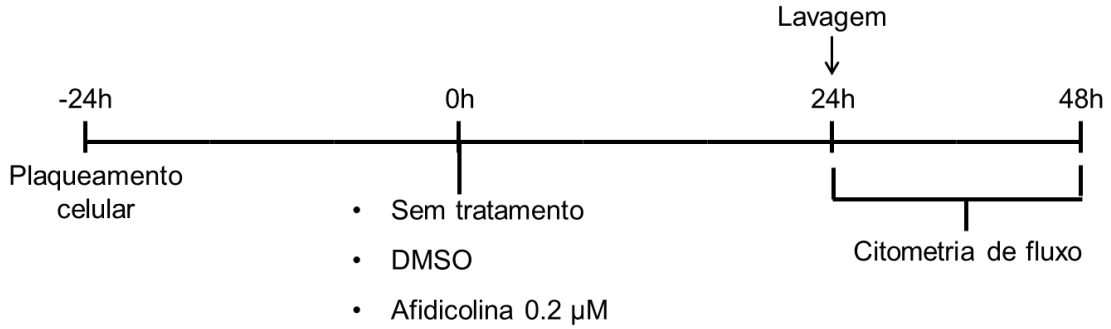
4.7. Caracterização do estresse replicativo induzido por afidicolina em células HME1

A afidicolina é um inibidor de DNA polimerase bastante utilizado para induzir o fenômeno de estresse replicativo (IKEGAMI *et al*., 1978). Para avaliar a capacidade da afidicolina em induzir o estresse replicativo neste modelo, células HME1 foram plaqueadas e tratadas ou não com veículo (DMSO) ou afidicolina (0.2 µM) por 24 horas. Além disso, as células também foram tratadas com afidicolina na condição descrita, lavadas e cultivadas por mais 24 horas. Após estes períodos de tempo, as células foram fixadas e a frequência de células com conteúdo de DNA Sub-G0 ou poliplóide foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio. A progressão das células tratadas ou não com afidicolina foi observada através da marcação com BrdU.

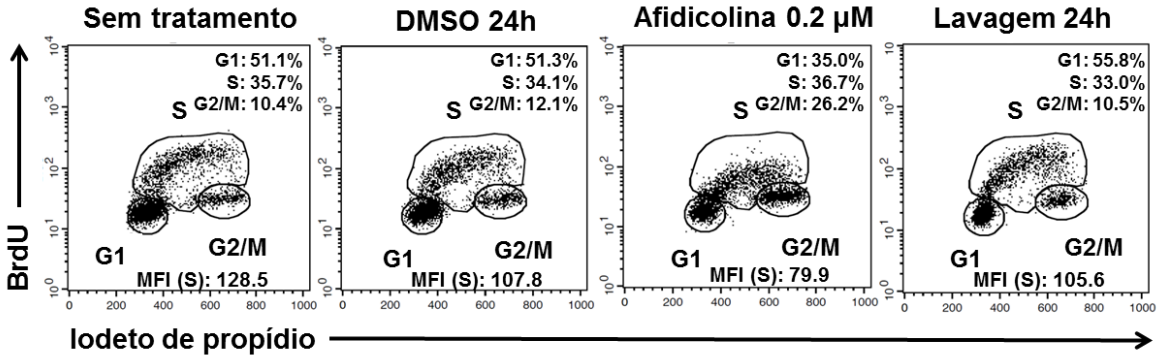
Os resultados obtidos indicam que a frequência de células em fase S tratadas ou não com DMSO é bastante similar (34,1% versus 35,7%, respectivamente) (Figura 4.7B). Da mesma forma, a frequência de células em fase S tratadas com afidicolina é similar a frequência de células tratadas com DMSO (36,7% versus 34,1%). Contudo, as células tratadas com afidicolina incorporaram menos BrdU do que as células tratadas com DMSO (MFI de fase S: 79,9 versus 107,8, respectivamente) (Figura 4.7B). Após 24 horas da lavagem do tratamento com afidicolina, as células em fase S recuperaram a capacidade de incorporação de BrdU, alcançando níveis próximos das condições controle (MFI de fase S: 105,6 versus 107,8, respectivamente).

Além disso, a capacidade de afidicolina induzir morte celular foi avaliada neste modelo. A frequência de células com conteúdo de DNA Sub-G0 tratadas com afidicolina (2,8% e 2,7%) foi similar à frequência de células tratadas ou não com DMSO (1,5% e 1,1%, respectivamente) (Figura 4.7C). A frequência de células tratadas com afidicolina e com conteúdo de DNA poliplóide foi novamente similar às condições controle (1,2% e 1% versus 0,6% e 0,4%, respectivamente) (Figura 4.7D). Em conjunto, esses experimentos sugerem que o tratamento com afidicolina é capaz de induzir o fenômeno de estresse replicativo em células HME1, mas não é capaz de causar morte celular ou induzir eventos de poliploidia nestas células.

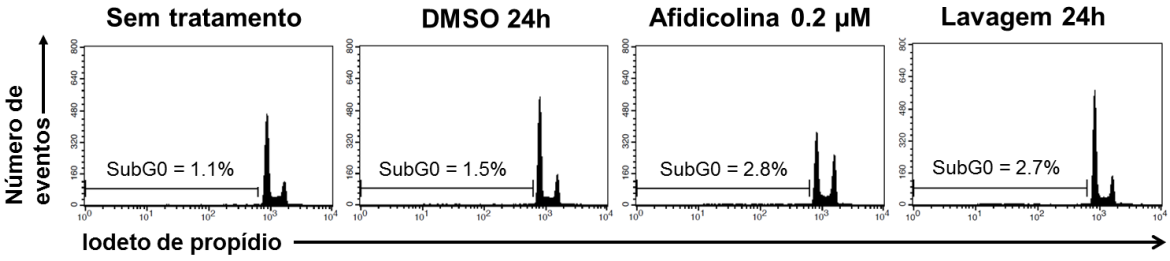
A


Lavagem
-24h
0h
24h
48h
Plaqueamento celular
• Sem tratamento
• DMSO
• Afidicolina 0.2 µM
Citometria de fluxo

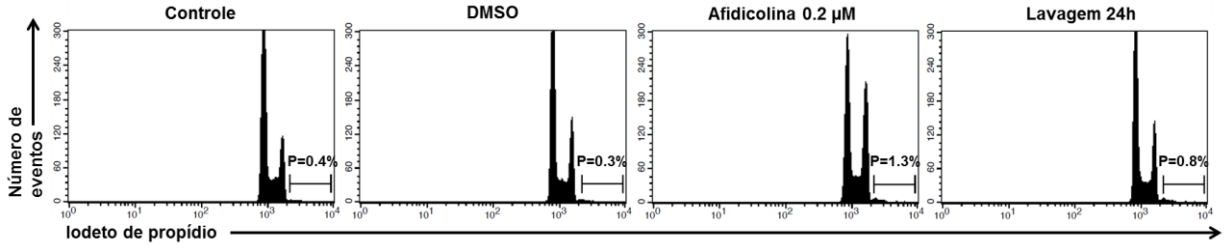
B


Sem tratamento
DMSO 24h
Afidicolina 0.2 µM
Lavagem 24h
G1: 51.1%
S: 35.7%
G2/M: 10.4%
MFI (S): 128.5
G1: 51.3%
S: 34.1%
G2/M: 12.1%
MFI (S): 107.8
G1: 35.0%
S: 36.7%
G2/M: 26.2%
MFI (S): 79.9
G1: 55.8%
S: 33.0%
G2/M: 10.5%
MFI (S): 105.6
BrdU
Iodeto de propídio

C


Sem tratamento
DMSO 24h
Afidicolina 0.2 µM
Lavagem 24h
SubG0 = 1.1%
SubG0 = 1.5%
SubG0 = 2.8%
SubG0 = 2.7%
Número de eventos
Iodeto de propídio

D


Controle
DMSO
Afidicolina 0.2 µM
Lavagem 24h
P=0.4%
P=0.3%
P=1.3%
P=0.8%
Número de eventos
Iodeto de propídio

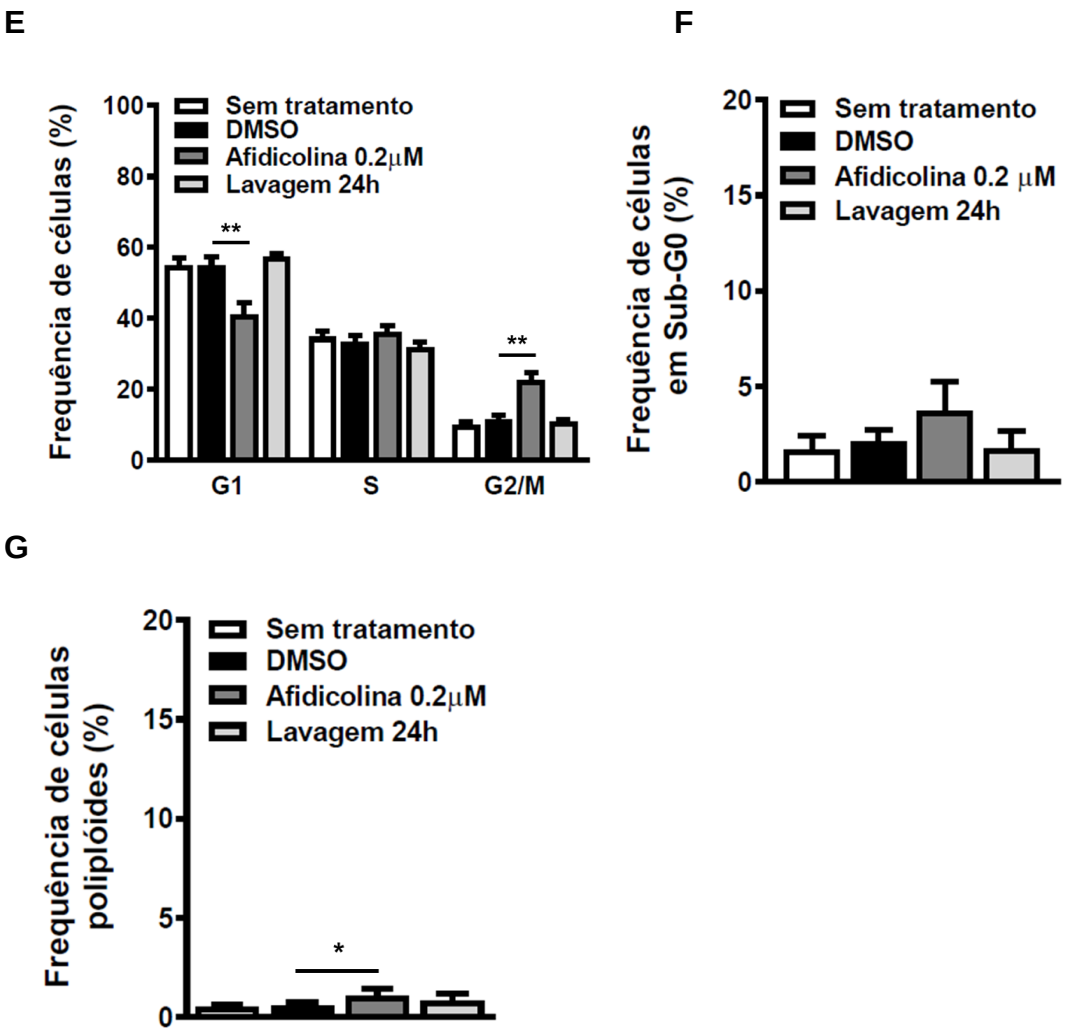


Figura 4.7. Afidicolina induz estresse replicativo em células HME1. A) Representação esquemática do protocolo de tratamento com afidicolina e análise por citometria de fluxo. Células HME1 foram plaqueadas e tratadas ou não com DMSO ou afidicolina (0.2 μM) pelos tempos indicados. Em uma das condições, as células foram tratadas com afidicolina por 24 horas, lavadas com meio de cultura e mantidas em cultura por mais 24 horas (Lavagem 24h). B) Após os tempos indicados, as células foram pulsadas com BrdU (2 μM) por 30 minutos, fixadas em 70% etanol a -20°C, marcadas com iodeto de propídio e anticorpo anti-BrdU e analisadas por citometria de fluxo. As frequências das populações celulares nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular e as intensidades médias de fluorescência (MFI) de células em fase S estão representadas dentro de cada gráfico. C) As células foram fixadas em 70% etanol a -20°C, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. As frequências de células com conteúdo de DNA Sub-G0 estão representadas dentro de cada gráfico. D) As células foram tratadas como em (C) e as frequências de células com conteúdo de DNA poliplóide (P) estão representadas dentro de cada gráfico. (E-G) Frequência de células nas diferentes fases do ciclo celular (E), com conteúdo de DNA Sub-G0 (F) ou com conteúdo de DNA poliplóide (G). Os valores em cada um dos tratamentos indicados foram comparados pelo teste t *de Student.* Os asteriscos (* ou **) representam $p < 0,05$ ou $p < 0,01$, respectivamente. Os resultados são representativos de três experimentos independentes, à exceção das células lavadas após 24 horas do tratamento com afidicolina (n=2).

4.8. Avaliação de aberrações cromossômicas induzidas por altos níveis de ciclina E1 em células HME1

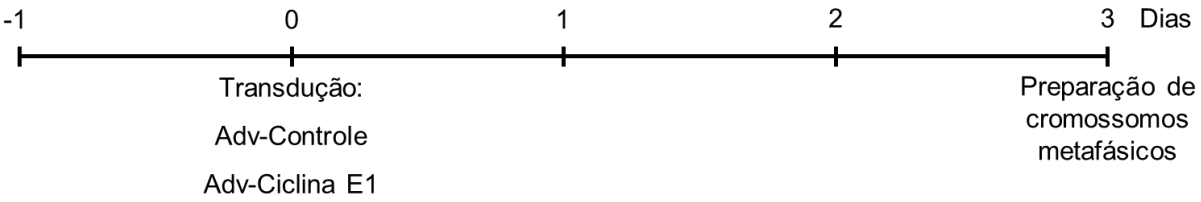
Os altos níveis de ciclina E1 já foram relacionados com a instabilidade cromossômica, levando a perdas e ganhos de cromossomos (SPRUCK *et al.*, 1999). Para avaliar a capacidade de ciclina E1 induzir alterações cromossômicas, células HME1 foram transduzidas com Adv-Controle ou Adv-Ciclina E1, tratadas com colcemide, choque hipotônico e fixadas como descrito anteriormente. Os cromossomos metafásicos foram espalhados em lâminas, corados com corante Giemsa e analisadas através de microscopia (Figura 4.8A).

A análise dos cromossomos metafásicos indicou que células HME1 com altos níveis de ciclina E1 apresentam eventos de aneuploidia, quando comparadas com células controle (Figura 4.8B). As células HME1 com altos níveis de ciclina E1 apresentaram um número significativamente maior de ganho de cromossomos inteiros quando comparadas às células controle (médias de 2,6% versus 14,4%, respectivamente) (Figura 4.8B). Esses dados estão de acordo com os dados de poliploidia obtidos por citometria de fluxo na Figura 4.5E-H. Entretanto, a frequência de perdas no número de cromossomos foi similar tanto em células HME1 transduzidas com Adv-Controle como Adv-Ciclina E1 (médias de 20,3% versus 17,1%), bem como a frequência do número normal de cromossomos (77% verus 67,5%, respectivamente).

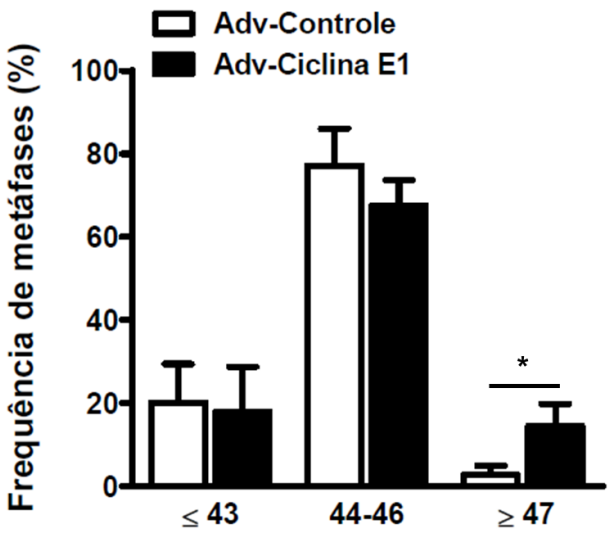
Altos níveis de ciclina E1 induziram em média 5,6% de eventos de endorreplicação em células HME1 quando comparadas às células controle (Figura 4.8C-F). O fenômeno de endorreplicação é caracterizado por uma múltipla passagem pela fase de síntese da molécula de DNA na ausência da fase de mitose e citocinese (ZIELKE *et al*., 2013). Além disso, foi observado que cromátides pertencentes ao mesmo cromossomo estavam separadas prematuramente ainda na fase de metáfase em células HME1 com altos níveis de ciclina E1 em relação às células controle (médias de 17,1% versus 1,1%). Os cromossomos de células com altos níveis de ciclina E1 também apresentaram outras alterações, como fragmentações cromossômicas pontuais (média de 2%) ou hiperfragmentação cromossômica, ambas não observadas em células controle (média de 14%) (Figura 4.8C-F). Em conjunto, esses dados demonstram que a desregulação de ciclina E1 em células HME1 induz eventos de aneuploidia e aberrações cromossômicas como

endorreplicação, separação prematura de cromátides irmãs, fragmentação e hiperfragmentação cromossômicas.

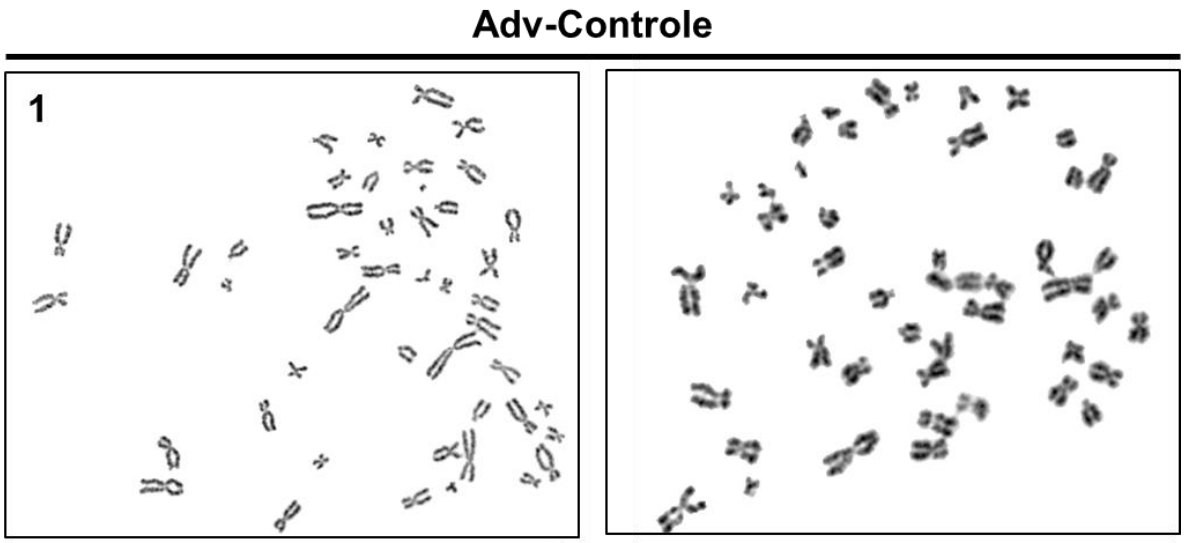
A


-1
0
1
2
3 Dias
Transdução:
Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
Preparação de cromossomos metafásicos

B

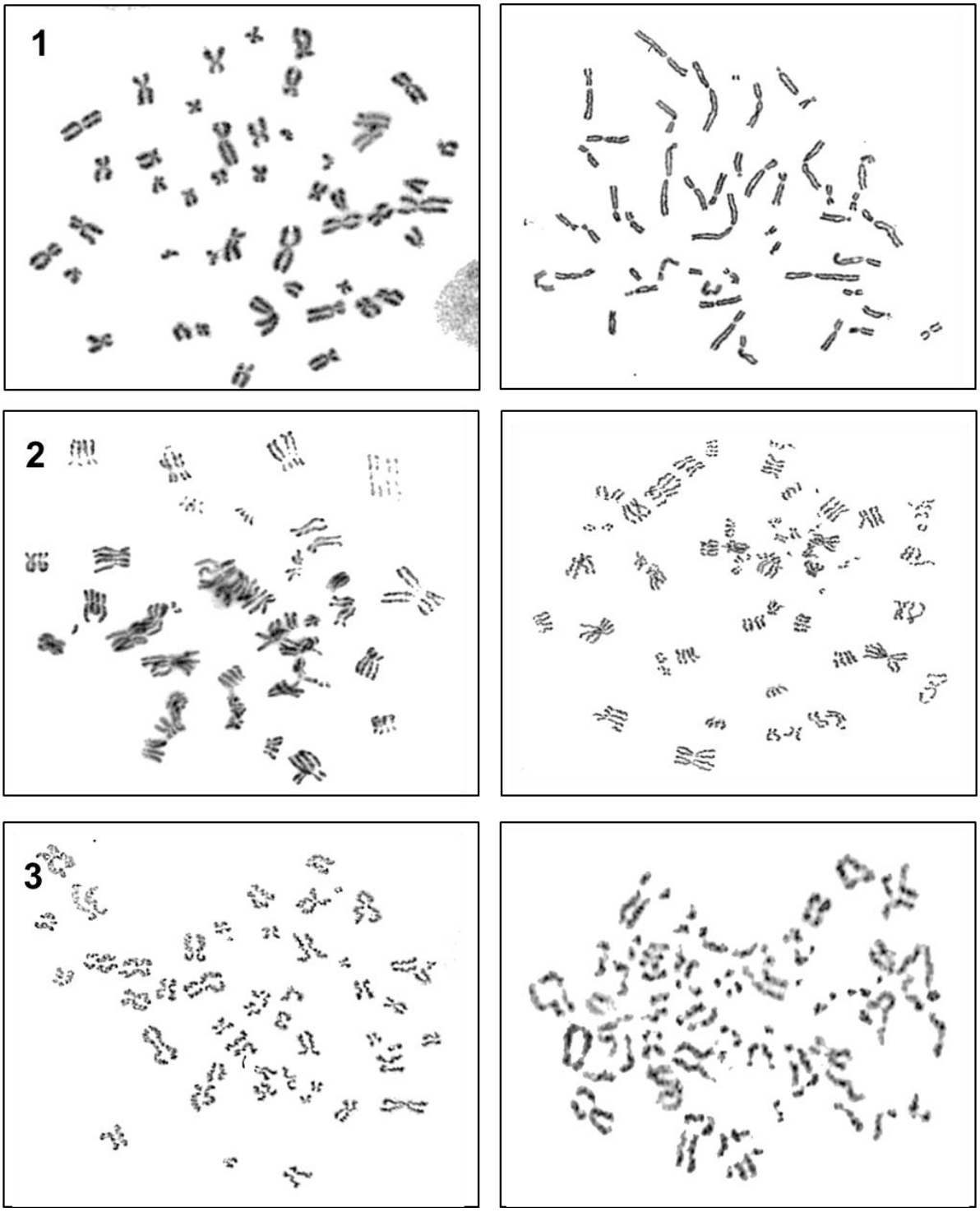

Adv-Controle
Adv-Ciclina E1
Frequência de metáfases (%)
100
80
60
40
20
0
*
≤ 43
44-46
≥ 47

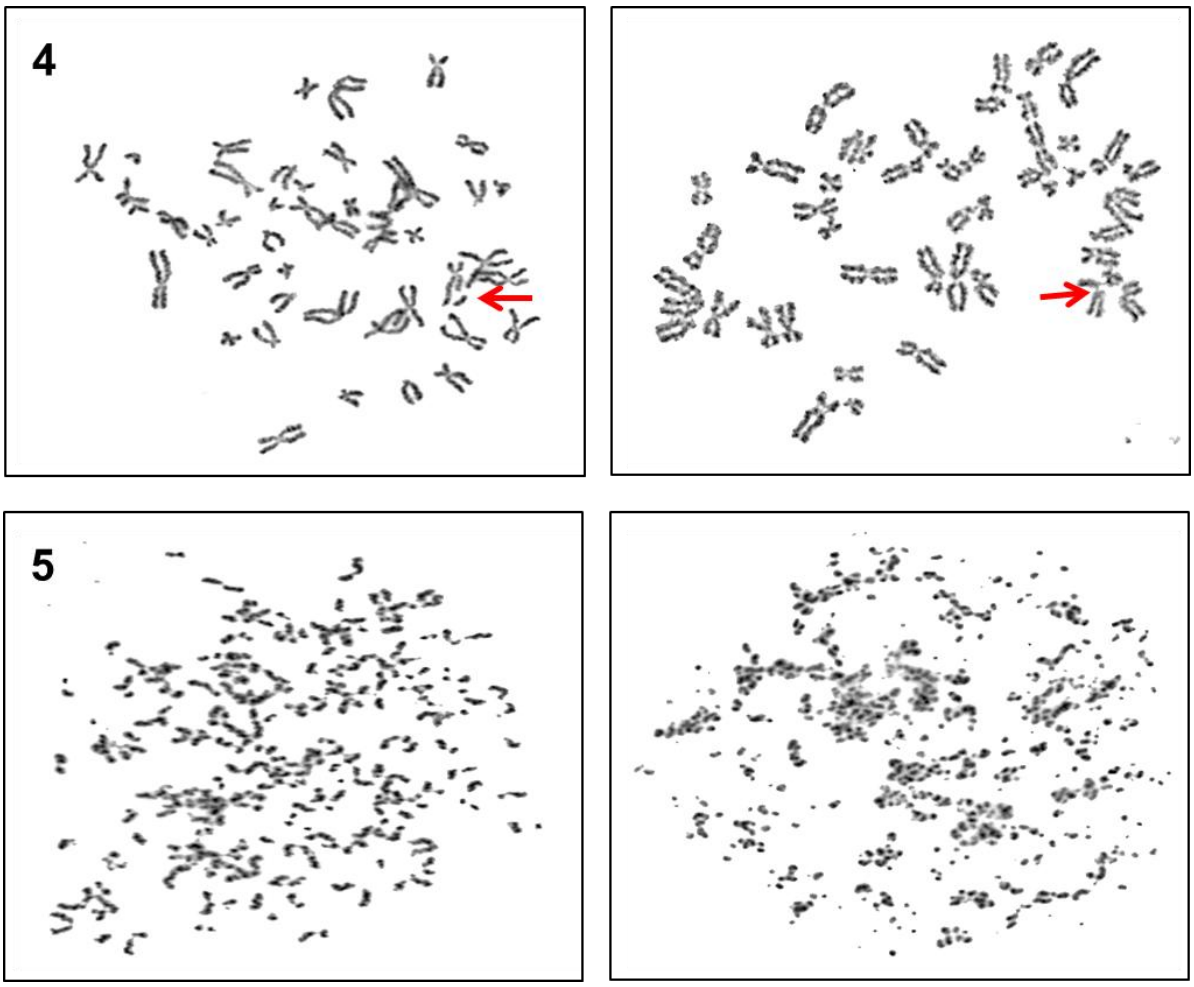
C


Adv-Controle
1

D

Adv-Ciclina E1




4
5

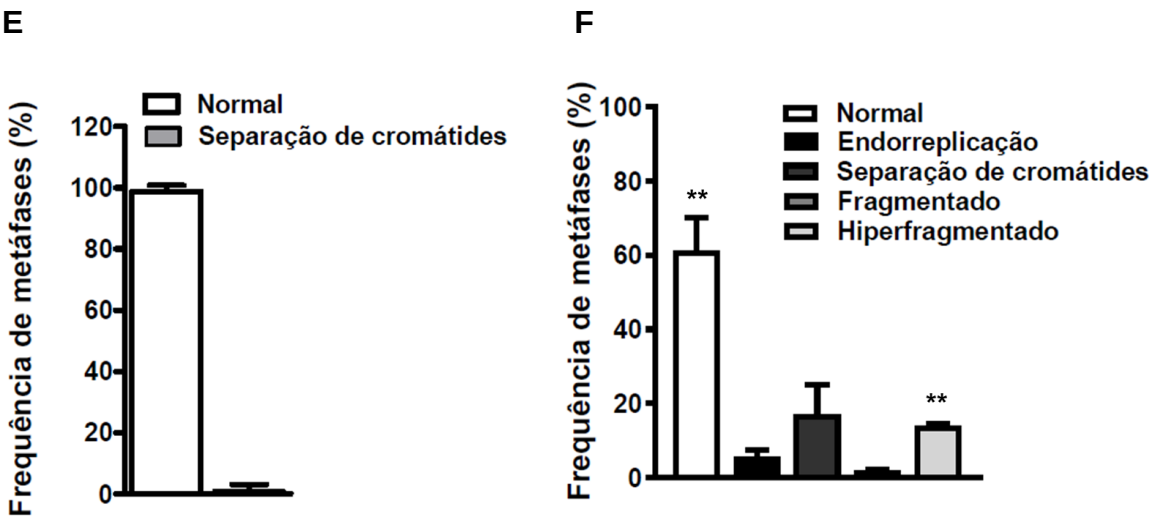
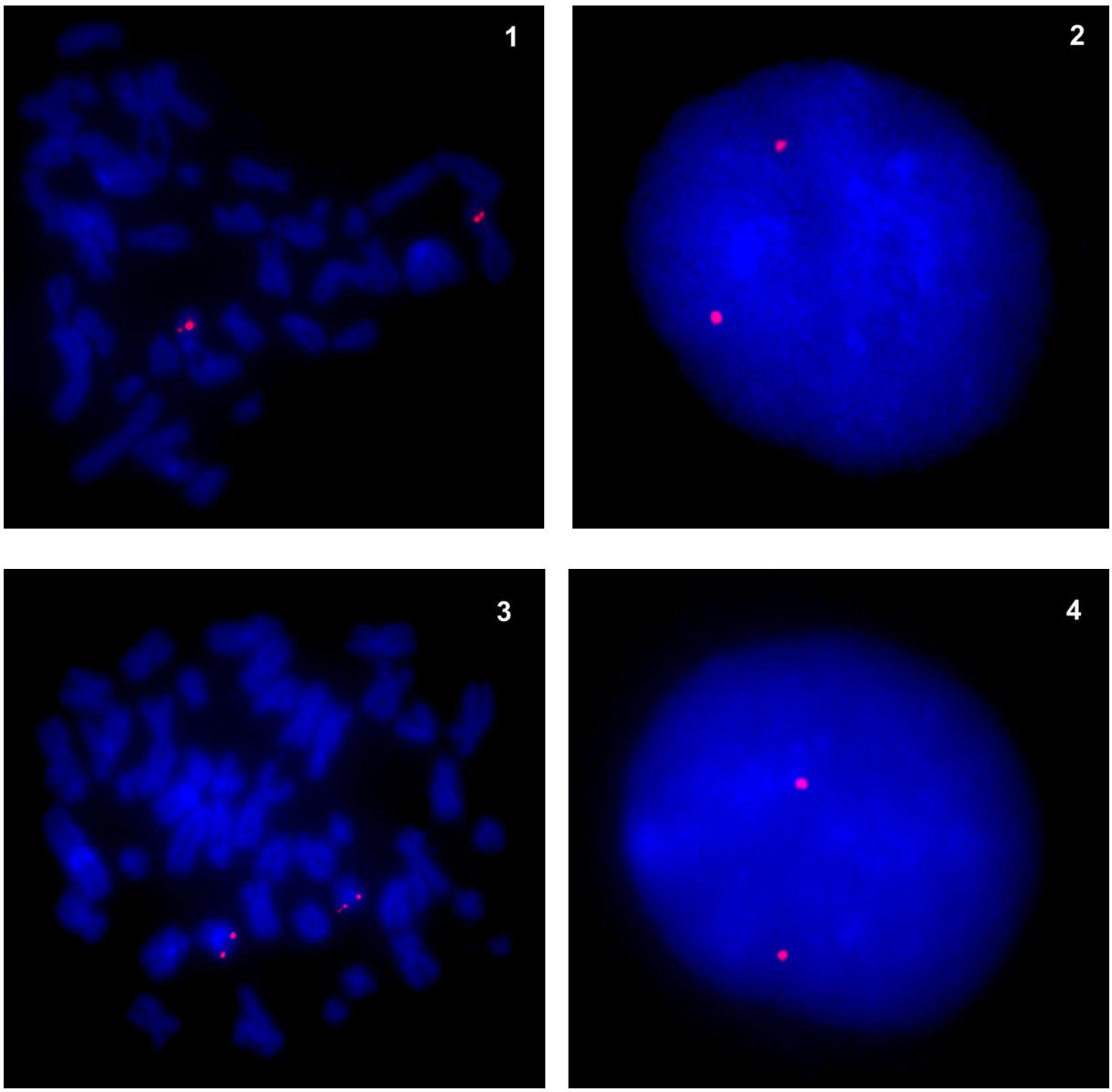


Figura 4.8. Altos níveis de ciclina E1 induzem alterações cromossômicas em células HME1. A) Representação esquemática do protocolo de transdução com adenovírus e análise de cromossomos metafásicos por coloração com Giemsa. As metáfases foram obtidas através de incubação com colcemide. Em seguida, células HME1 foram tratadas com choque hipotônico, seguido de fixação com metanol:ácido acético, como descrito anteriormente. B) Frequência do número de metáfases de células HME1 transduzidas com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas) e os números de cromossomos indicados. C e D) Imagens representativas de cromossomos metafásicos de células HME1 transduzidas com Adv-Controle (C) ou Adv-Ciclina E1 (D) e coradas com Giemsa (magnificância: 100x). As metáfases observadas foram classificadas da seguinte forma: normal (1), fragmentada (2), hiperfragmentada (3), endorreduplicada (4), ou com separação prematura de cromátides (5). As setas vermelhas indicam quebras cromossômicas. E-F) Frequência do número de metáfases classificadas de acordo com as alterações cromosômicas observadas em células HME1 transduzidas com Adv-Controle (barras brancas) ou Adv-Ciclina E1 (barras pretas). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.9. Avaliação dos sítios frágeis comuns FRA3B e FRA16D em células HME1

Os SFCs podem ser definidos como regiões genômicas propensas a quebras ou interrupções cromossômicas em situações de estresse replicativo (LE TALLEC *et al*., 2014). Para avaliar a presença dos sítios frágeis comuns mais frequentemente alterados no genoma humano, FRA3B e FRA16D, células HME1 foram mantidas em cultura, tratadas com colcemide, choque hipotônico e fixadas em metanol:ácido acético. Em seguida, as células foram espalhadas em lâminas, desidratadas sequencialmente em 70%, 85% e 100% etanol e analisadas através da metodologia de FISH. As sondas comerciais específicas para as regiões de fragilidade foram desnaturadas e hibridizadas junto às células HME1, seguido de lavagens, coloração com DAPI e avaliação em microscópio de fluorescência.

Resultados preliminares indicaram que células HME1 apresentam dois sinais locus-específicos para cada um dos SFCs analisados (FRA3B e FRA16D), tanto em núcleos interfásicos como em cromossomos metafásicos (Figura 4.9).



4.9. Células HME1 apresentam dois sinais específicos para cada um dos sítios frágeis FRA3B e FRA16D. Células HME1 foram tratadas com colcemide e choque hipotônico, seguido de fixação com metanol:ácido acético. As células foram desnaturadas e hibridizadas com sondas comerciais específicas para os SFCs de interesse (Empire Genomics). (1-4) Imagens representativas de cromossomos metafásicos (1 e 3) ou núcleos interfásicos (2 e 4) hibridizados com sondas específicas para os sítios frágeis FRA3B (1 e 2) e FRA16D (3 e 4) (magnificância: 100x). Os resultados acima são representativos de um experimento.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a linhagem do epitélio da glândula mamária humana HME1 foi utilizada como modelo de estudo. A linhagem HME1 é proveniente de uma paciente saudável que foi submetida a uma cirurgia de mamoplastia, sem histórico de câncer de mama. Essa linhagem foi imortalizada *in vitro* através de transdução com retrovírus expressando a enzima telomerase, permitindo com que as células HME1 sejam cultivadas por, aproximadamente, 15 passagens sem alterações cromossômicas. As células HME1 foram caracterizadas como uma linhagem pseudodiplóide, com a maioria das células contendo 46 cromossomos (SHAY *et al*., 1993).

Os altos níveis de ciclina E1 foram induzidos por meio de um sistema de expressão através de transdução com adenovírus. A transdução com adenovírus permite uma expressão transiente do transgene de interesse, possibilitando o estudo de eventos iniciais de instabilidade genômica, como no caso da indução dos níveis de ciclina E1 neste trabalho. A transdução com adenovírus não induz a integração do genoma viral no genoma celular, característica fundamental para a realização de estudos de instabilidade genômica, uma vez que não há inserção viral em regiões de sítios frágeis do genoma, por exemplo. Além disso, uma outra vantagem deste sistema é que a transdução com adenovírus permite a titulação precisa da proteína de interesse a níveis relevantes ao fenômeno biológico estudado (HITT *et al.*, 1998).

A associação de ciclina E com a subunidade catalítica Cdk2 é responsável pelo controle do ciclo celular, especificamente da transição das fases G1/S (DULIC *et al*., 1992; KOFF *et al*., 1992). Em situações normais, o complexo ciclina E-Cdk2 é capaz de fosforilar diversos substratos necessários para a duplicação da molécula de DNA, como a proteína RB, proteínas do pre-RC e proteínas envolvidas com a duplicação de centrossomos (HWANG & CLURMAN, 2005). Entretanto, a desregulação dos níveis de ciclina E ao longo do ciclo celular pode levar a uma instabilidade genômica e ao processo de tumorigênese (HWANG & CLURMAN, 2005). Uma das consequências da desregulação dos níveis de ciclina E é a indução do estresse replicativo, frequentemente observado em tumores humanos (HILLS & DIFFLEY, 2014). Esse fenômeno interfere na progressão normal das forquilhas de replicação e, portanto, na síntese da molécula de DNA (ZEMAN & CIMPRICH, 2014).

Nossos resultados indicaram que altos níveis de ciclina E1 em células HME1

induzem uma progressão mais lenta pela fase S do ciclo celular, característica do fenômeno de estresse replicativo (Figuras 4.4 e 4.6). Uma das causas que a desregulação de ciclina E1 pode levar ao estresse replicativo é a interferência com a maquinaria de replicação do DNA, especificamente com a montagem do pre-RC. De fato, foi demonstrado que células KB transduzidas com adenovírus expressando ciclina E1 humana apresentam menor incorporação de BrdU, indicando uma replicação menos ativa do DNA (EKHOLM-REED *et al*., 2004). Os autores também demonstraram que células com altos níveis de ciclina E1 apresentam dificuldade no recrutamento das proteínas MCM4 e MCM7 para a cromatina, proteínas que participam da montagem do pre-RC. Dessa forma, o licenciamento da maquinaria de replicação é comprometido, interferindo, portanto, no disparo de origens de replicação. Nessas situações, origens de replicação dormentes podem ser disparadas para impedir que as forquilhas de replicação viagem por longas distâncias, evitando que ocorra um colapso entre as forquilhas (BLOW *et al*., 2011). Como a desregulação de ciclina E1 interfere diretamente no recrutamento de membros do pre-RC (EKHOLM-REED *et al*., 2004), a disponibilidade de origens de replicação dormentes pode estar comprometida.

Na linhagem de osteosarcoma humano U2OS superexpressando ciclina E1 através de um sistema de transdução retroviral, foi demonstrado que a ciclina E1 induz o fenômeno de estresse replicativo pela interrupção da progressão da forquilha de replicação através de ensaios de fibras de DNA (BARTKOVA *et al*., 2006). Além disso, a superexpressão de ciclina E1 através de transdução retroviral em queratinócitos humanos primários e na linhagem de fibroblastos humanos BJ interferiu com a dinâmica de replicação da molécula de DNA (BESTER *et al*., 2011). Os autores observaram que a superexpressão de ciclina E1 interfere com a disponibilidade de nucleotídeos e reduz a velocidade de progressão da forquilha de replicação, levando ao fenômeno de estresse replicativo.

A desregulação de ciclina E1 também é capaz de induzir o fenômeno de estresse replicativo através da colisão entre as maquinarias de transcrição e replicação na molécula de DNA (JONES *et al*., 2012). Foi demonstrado neste trabalho que a inibição do alongamento da transcrição, através do tratamento com cordicepina, um agente terminador da cadeia de RNA, resgata a velocidade de progressão da forquilha de replicação em células da linhagem de osteosarcoma U2OS com superexpressão de ciclina E1.

O fenômeno de estresse replicativo pode levar à ativação da via de resposta

ao dano de DNA, que atua na manutenção da integridade do genoma (BARTKOVA *et al*., 2005; GORGOULIS *et al*., 2005). O dano na molécula de DNA pode ser gerado por fatores físicos, como luz ultravioleta e radiação ionizante, químicos, como produtos da metabolização do tabaco e álcool e biológicos, como determinados vírus. A consequência final da ação desses fatores é a geração de quebras de fita simples ou dupla na molécula de DNA (CICCIA & ELLEDGE, 2010). Entretanto, para que tais lesões sejam reparadas, é preciso que vias de sinalização intracelulares compostas por proteínas sensoras, mediadoras e efetoras sejam ativadas. Assim, as vias de resposta ao dano no DNA têm como objetivo principal reconhecer o dano na molécula de DNA e transduzir o sinal gerado como forma de proteção à célula (HARPER & ELLEDGE, 2007), coordenando as transições ao longo do ciclo celular e os processos de replicação, reparo do DNA e apoptose (BRANZEI & FOIANI, 2008).

As duas principais vias de resposta de sinalização ao dano no DNA compreendem a via de resposta ao estresse replicativo e a via de resposta à quebra de fita dupla na molécula de DNA (CICCIA & ELLEDGE, 2010). A via de resposta ao estresse replicativo, como o próprio nome sugere, age em consequência da presença de obstáculos durante a replicação da molécula de DNA, resultando em trechos de DNA fita simples. A via de resposta à quebra de fita dupla de DNA é ativada, principalmente, em resposta à radiação ou agentes genotóxicos. Essas vias de transdução de sinal envolvem, respectivamente, duas cinases centrais, ATR e ATM, que irão fosforilar e ativar substratos específicos, como CHK1 e CHK2, respectivamente (MARÉCHAL & ZOU, 2013; ZANNINI *et al*., 2014).

Como discutido acima, a superexpressão de oncogenes, como ciclina E1, pode levar ao estresse replicativo e à formação de quebras de fita dupla na molécula de DNA, especialmente em regiões do genoma mais susceptíveis a erros durante a etapa de replicação (BARTKOVA *et al*., 2005; GORGOULIS *et al*., 2005; BARTKOVA *et al*., 2006; DIMICCO *et al.*, 2006). Na linhagem de osteosarcoma U2OS, foi demonstrado que a superexpressão de ciclina E1 induz a ativação da via de sinalização de reparo ao dano no DNA, com fosforilação da variante de histona H2AX e das proteínas TP53 e CHK1, que são alvos de ATM e ATR (BARTKOVA *et al*., 2005). Dessa forma, foi sugerido que a via de sinalização ao dano na molécula de DNA é ativada por oncogenes e atua como uma barreira anti-tumoral em estágios iniciais do processo de tumorigênese (BARTKOVA *et al*., 2005; GORGOULIS *et al*., 2005; O´CONNOR, 2015).

No presente trabalho, as vias de sinalização em resposta ao dano no DNA em células HME1 com altos níveis de ciclina E1 ainda não foram investigadas. Neste modelo, é possível que a indução de estresse replicativo leve à ativação destas vias, especialmente a ativação de ATR e CHK1, proteínas que são normalmente ativadas em resposta a um estresse durante a replicação da molécula de DNA. Futuramente, pretendemos avaliar os níveis proteicos de CHK1, fosfo-CHK1, CHK2 e fosfo-CHK2 através de *Western blot* e a ativação das vias ATR-CHK1 e/ou ATM-CHK2. Uma eventual falha na ativação dessas vias de transdução de sinal pode comprometer a manutenção da estabilidade do genoma em nosso modelo.

O fenômeno de estresse replicativo pode ser considerado uma das causas da instabilidade genômica que, por sua vez, pode levar ao processo de tumorigênese (AGUILERA & GARCÍA-MUSE, 2013). Dessa forma, o estresse replicativo pode prejudicar a integridade do genoma, levando ao aumento na frequência de mutações pontuais, deleções e amplificações, perda de heterozigosidade, rearranjos cromossomais e perda ou ganho de cromossomos (GAILLARD *et al*., 2015).

Nossos resultados indicaram que células HME1 com altos níveis de ciclina E1 apresentam um ganho no número de cromossomos significativamente maior quando comparados às células controle (Figura 4.8B), sugerindo a geração de células poliplóides. Em acordo, nossos dados de citometria de fluxo também indicaram que células HME1 com altos níveis de ciclina E1 apresentam eventos de poliploidia (Figura 4.5E-H). De fato, a superexpressão de ciclina E em células epiteliais da mama resultou em instabilidade cromossômica (SPRUCK *et al*., 1999). Foi demonstrado que a frequência de células aneuplóides, tanto com perda ou ganho dos cromossomos 11, 17 e 18, é maior em células com superexpressão de ciclina E comparada a células controle.

No presente trabalho, dentre as alterações cromossômicas decorrentes da desregulação de ciclina E1 em células do epitélio da glândula mamária, se destacam a endorreplicação, a fragmentação e hiperfragmentação de cromossomos e a separação prematura de cromátides irmãs (Figura 4.8C-F). A endorreplicação pode ser definida como uma múltipla passagem pela fase de síntese da molécula de DNA (fase S) na ausência da fase de mitose e citocinese (fase M) (ZIELKE *et al*., 2013). A endorreplicação é um processo que pode levar à formação de células gigantes com núcleo poliplóides, como no caso de megacariócitos e trofoblastos, a fim de suportar o crescimento e o desenvolvimento do organismo (LEE *et al*., 2009). Foi demonstrado anteriormente que a ciclina E é necessária para endorreplicação em

megacariócitos e células de trofoblastos, uma vez que camundongos deficientes para as ciclinas E1 e E2 apresentam um comprometimento na endorreplicação em trofoblastos e megacariócitos, levando à letalidade do embrião (PARISI *et al*., 2003; GENG *et al*., 2003).

Além disso, nossos resultados indicaram que altos níveis de ciclina E1 levam à hiperfragmentação de cromossomos em células HME1 (Figura 4.8C-F). Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão de ciclina E1 induz a hiperfragmentação de cromossomos em fibroblastos humanos BJ (MIRON *et al*., 2015). A superexpressão de ciclina E1 foi induzida através de transdução retroviral durante 2 a 8 semanas e os altos níveis de ciclina E1 foram capazes de comprometer a estabilidade cromossômica, levando a diversas quebras em todos os cromossomos de uma mesma metáfase. Recentemente, o fenômeno de cromotripsia foi descrito como uma das causas de instabilidade cromossômica no câncer. Esse fenômeno foi definido como um evento catastrófico de extenso rearranjo genômico restrito a um ou poucos cromossomos (JONES & JALLEPALLI, 2012). É possível que, no presente trabalho, a hiperfragmentação dos cromossomos seja resultado de um extenso dano a molécula de DNA.

Outro fenômeno observado em cromossomos metafásicos neste trabalho foi a separação prematura de cromátides irmãs, possivelmente, indicando defeitos na coesão dos cromossomos (Figura 4.8C-F). O estabelecimento da coesão entre cromátides irmãs ocorre durante a etapa de duplicação do DNA, onde proteínas do complexo de coesinas são recrutadas para a cromatina, se localizando nos centrômeros e ao longo dos braços dos cromossomos até a fase de mitose. Durante a mitose, especificamente na anáfase, as cromátides irmãs se dissociam e são segregadas igualmente entre as novas células filhas (PETERS & NISHYAMA, 2012).

O complexo de coesinas é formado por 4 proteínas que se estruturam ordenadamente na forma de um anel ao redor da cromatina. Dentre elas, estão membros da família de manutenção da estrutura dos cromossomos, denominadas SMCs, especificamente SMC1a e SMC3. Além disso, fazem parte deste complexo as proteínas RAD21 e SA que se associa a RAD21 e é responsável pela coesão nos telômeros e ao longo do braço dos cromossomos (GLIGORIS & LÖWE, 2016).

Ao longo da mitose, a maioria das proteínas do complexo de coesão é gradualmente dissociada da cromatina para permitir a correta segregação das cromátides irmãs durante a anáfase. Entretanto, a proteína SGO1 protege as coesinas que estão localizadas nos centrômeros dos cromossomos da dissociação,

com a ajuda do recrutamento da proteína PP2A para os centrômeros (LIU *et al*., 2013). Assim, as coesinas permanecem ligadas aos centrômeros, permitindo que os cromossomos sejam corretamente alinhados na placa metafásica. Durante a anáfase, com a ativação do complexo promotor da anáfase (APC) e a consequente ativação da enzima separase, ocorre a clivagem de RAD21, permitindo a separação das cromátides irmãs (RANKIN & DAWSON, 2016).

Alterações no complexo coesina podem promover uma segregação defeituosa dos cromossomos, levando à aneuploidia (DUIJF & BENEZRA, 2013). A subunidade SA, por exemplo, é frequentemente mutada em tumores de bexiga (LAWRENCE *et al*., 2014). Em células de câncer colorretal HCT116, foi demonstrado que a instabilidade cromossômica, frequentemente observada nesse tipo de tumor, pode ser resultado de mutações nas proteínas SMC1a e SMC3 que participam do processo de coesão de cromátides irmãs (BARBER *et al*., 2008). Outro membro do complexo de coesão, RAD21, também está envolvido com o processo de tumorigênese. A superexpressão de RAD21 foi observada em pacientes com câncer colorretal e está correlacionada com uma maior agressividade da doença, especialmente nos tumores com mutações em K-RAS (DEB *et al*., 2014). Portanto, eventuais mutações e/ou desregulações das subuinidades do complexo de coesão da cromatina podem levar à instabilidade genômica e contribuir para o desenvolvimento do câncer.

Nossos resultados indicaram um fenótipo similar através de espalhamento de cromossomos metafásicos e coloração com Giemsa (Figura 4.8C-F). A separação prematura de cromátides em células HME1 pode ser causada devido ao estresse replicativo induzido pelos altos níveis de ciclina E1, uma vez que as coesinas são recrutadas para a cromatina durante a fase S e o estresse replicativo gerado por ciclina E1 pode estar prejudicando este recrutamento. Alternativamente, a alta atividade do complexo ciclina E1-Cdk2 pode levar à fosforilação de algumas das proteínas do complexo coesina, comprometendo a função destas proteínas. Futuramente, pretendemos avaliar os níveis das proteínas do complexo de coesão SMC1a, SMC3, RAD21 e SA por *Western blot*.

Altos níveis de ciclina E1 correlacionam com a indução de quebras e/ou deleções cromossômicas em determinadas regiões do genoma em diferentes modelos (MIRON *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al*., 2015). Em fibroblastos humanos BJ, a superexpressão de ciclina E1, associada ao tratamento com afidicolina e cafeína, um inibidor de ATM, levou à expressão de sítios frágeis específicos (MIRON *et al*.,

2015). Dentre as alterações observadas, foram encontradas quebras em regiões centroméricas, além de uma alta frequência de quebras nos cromossomos 1 e 2, especificamente nas regiões 1p32, 1q21, 2q21 e 2q22. Interessantemente, as regiões genômicas alteradas devido ao estresse replicativo induzido pelos altos níveis de ciclina E1 foram diferentes em relação a outros insultos à replicação do DNA como, por exemplo, o inibidor de DNA polimerase afidicolina ou a superexpressão do oncogene H-RAS-V12. Além disso, altos níveis de ciclina E1 em células do epitélio da glândula mamária humana permitiram a entrada das células em mitose antes do término da síntese de DNA (TEIXEIRA *et al*., 2015). Esse fenômeno levou a perdas de regiões genômicas específicas em diversos cromossomos, como no cromossomo 3, regiões 3q11.2 e 3q26.1, cromossomo 11, região 11q23.3, e cromossomo 21, região 21q21.1. Como observado, as regiões genômicas encontradas alteradas em ambos os trabalhos são, em grande maioria, diferentes entre si. Portanto, esses resultados indicam que o repertório de sítios frágeis pode variar dependendo do tipo celular e do insulto oncogênico em diferentes modelos.

Futuramente, pretendemos caracterizar os sítios frágeis induzidos por altos níveis de ciclina E1 em células HME1 através de cariótipo por bandeamento G. Além disso, pretendemos avaliar a expressão dos sítios frágeis FRA3B e FRA16D em consequência dos altos níveis de ciclina E1 em células HME1. Uma vez que o repertório de sítios frágeis pode variar dependendo do tipo celular e do insulto oncogênico, esperamos contribuir para a caracterização das alterações genéticas observadas em consequência da desregulação de ciclina E1 durante a carcinogênese da mama.

6. CONCLUSÕES

- Os níveis de ciclina E1 induzidos em células do epitélio da glândula mamária humana HME1 através do sistema de transdução adenoviral são semelhantes aos níveis de ciclina E1 observados em linhagens celulares de câncer de mama;

- Os níveis de ciclina E1 induzidos em células HME1 atingem um pico de síntese entre 18 e 24 horas e diminuem ao longo de 7 dias da transdução adenoviral;

- A desregulação de ciclina E1 em células HME1 não induz diferenças na proliferação ou morte celular, mas induz eventos de poliploidia;

- Altos níveis de ciclina E1 em células HME1 induzem um aumento na frequência de células em fase S e uma diminuição na incorporação de BrdU quando comparada às células controle, sugerindo a indução do fenômeno de estresse replicativo;

- O tratamento com afidicolina induz o fenômeno de estresse replicativo em células HME1, mas não induz morte celular ou poliploidia;

- A desregulação de ciclina E1 induz alterações cromossômicas em células HME1, como eventos de endorreplicação, fragmentação e hiperfragmentação cromossômica e separação prematura de cromátides irmãs.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a progressão do ciclo celular, a morte celular, a poliploidia e as aberrações cromossômicas em células HME1 com altos níveis de ciclina E1 em 7 e 15 dias após a transdução adenoviral;

- Avaliar os níveis das proteínas da via de sinalização de resposta ao dano no DNA CHK1 e CHK2 em células HME1 com altos níveis de ciclina E1;

- Avaliar os níveis das proteínas do complexo de coesão SMC1a, SMC3, RAD21 e SA em células HME1 com altos níveis de ciclina E1;

- Caracterizar os sítios frágeis em células HME1 com altos níveis de ciclina E1 através de cariótipo por bandeamento G;

- Avaliar a instabilidade dos sítios frágeis comuns FRA3B e FRA16D em células HME1 com altos níveis de ciclina E1 através de FISH.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ODEH M *et al.* (2014). WWOX, the common fragile site FRA16D gene product, regulates ATM activation and the DNA damage response. Proc Natl Acad Sci, 111:4716-4725.

ABU-REMAILEH M & AQEILAN R (2014). Tumor suppressor WWOX regulates glucose metabolism via HIF1alpha modulation. Cell Death Differentiation, 21:1805-1814.

AGUILERA A & GARCÍA-MUSE (2013). Causes of genomic instability. Annual Review Genetics, 47:1-32.

AIT-SI-ALI S *et al.* (1988). Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. Nature, 396:184-6.

AKLI S & KEYOMARSI K (2003). Cyclin E and its low molecular weight forms in human cancer and as targets for cancer therapy. Cancer Biology & Therapy, 2:38-47.

AKLI S, ZHENG P *et al.* (2004). Tumor-Specific Low Molecular Weight Forms of Cyclin E Induce Genomic Instability and Resistance to p21, p27, and Antiestrogens in Breast Cancer. Cancer Research, 64:3198-3208.

ANTONIOU A *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. The American Journal of Human Genetic, 72:1117-1130.

AQIELAN R *et al.* (2004). Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. Proc Natl Acad Sci USA 101:4401–4406.

BAGHERI-YARMAND R *et al*. (2010). Cyclin E deregulation impairs mitotic progression through premature activation of Cdc25C. Cancer Research, 70:5085-5095.

BAKKENIST C & KASTAN M (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature, 421: 499–506.

BANI-HANI K *et al.* (2005). Combined evaluation of expressions of cyclin E and p53 proteins as prognostic factors for patients with gastric cancer. Clin Cancer Res, 11:1447-1453.

BARLOW J *et al.* (2013)Identification of early replicating fragile sites that contribute to genome instability. Cell, 152:620-632.

BARR F & GRUNEBERG U (2007). Cytokinesis: Placing and Making the Final Cut. Cell, 131:847-860.

BARTKOVA J *et al*. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. Nature, 434:864-70 (2005).

BARTKOVA J *et al*. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature, 444:633-7 (2006).

BESTER A *et al*. (2010). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. Cell, 145:435-46 (2011).

BIGNELL G *et al*. (2010). Signatures of mutation and selection in the cancer genome. Nature, 463:893-898 (2010).

BLOW J, GE X, JACKSON D (2011). How dormant origins promote complete genome replication. Trends in Biochemical Sciences, 36:405-415.

BORNSTEIN G *et al*. (2003). Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase.J Biol Chem, 278:25752-7 (2003).

BORTNER D & ROSENBERG M (1997). Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. Mol Cell Biol, 17:453-9.

BRANZEI D & FOIANI M (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9:297-308.

CALDON C & MUSGROVE E (2010). Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer. Cell Division, 17:5-2.

CAMPANER S *et al.* (2010). Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. Nat Cell Biol, 12:54-9.

CARRANO A *et al*. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. Nat Cell Biol, 1:193-9.

CASPER A *et al*. (2002). ATR regulates fragile site stability. Cell, 111:779-789.

CHEN Z et al. (2002). CP110, a cell cycle-dependent CDK substrate, regulates centrosome duplication in human cells. Dev Cell, 3:339-50.

CICCIA A & ELLEDGE S (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. Molecular Cell, 40:179-204.

CLURMAN B *et al*. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. Genes Dev, 10:1979-90.

COSTANTINO L *et a*l. (2014). Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. Science, 343:88-91.

COVERLEY D, LAMAN H, LASKEY R (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. Nat Cell Biol, 4:523-8.

CRASTA K *et al*. (2012). DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. Nature, 482::53-58.

DARWICHE N, FREEMAN L, STRUNNIKOV A (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. Gene, 233:39–47.

DAVIDOFF A *et al*. (1991). Genetic basis for p53 overexpression in human breast cancer. PNAS, 88:5006-5010.

DEB S *et al*. (2014). RAD21 cohesin overexpression is a prognostic and predictive marker exacerbating poor prognosis in KRAS mutant colorectal carcinomas. British Journal of Cancer, 110:1606-1613.

DEBATISSE M *et al*. (2012). Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. Trends Genet, 28:22-32.

DEGREGORI J, KOWALIK T, NEVINS JR (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S regulatory genes. Mol Cell Biol, 15:4215-24.

DI MICCO et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. Nature, 444:638-642.

DRAVIAM V, XIE S & SORGER P (2004). Chromosome segregation and genomic stability. Current Opinion Genetic Development, 14:120–125.

DUIJF P & BENEZRA R (2013). The cancer biology of whole chromosome instability. Oncogene, 32:4727–4736.

DULIC V, LEES E, REED S (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. Science, 257:1958-1961.

DURKIN S & GLOVER T (2007). Chromosome Fragile Sites. Annual Review of Genetics, 41:169-192.

DURKIN S *et al*. (2006). Depletion of CHK1, but not CHK2, induces chromosomal instability and breaks at common fragile sites. Oncogene, 25:4381-4388.

EASTON D *et al*. (1993). Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet, 52:678-701.

EKHOLM S *et al*. (2001). Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. Mol Cell Biol 21:3256–3265.

EKHOLM-REED S *et al*. (2004). Mutation of hCDC4 leads to cell cycle deregulation of cyclin E in cancer. Cancer Res, 64:795-800.

ELLEDGE S (1996). Cell Cycle Checkpoints: preventing an indentity crisis. Science, 174:1664-1671.

ERLANSON M *et al*. (1998). Expression of Cyclin E and the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27 in Malignant Lymphomas—Prognostic Implications. Blood, 92:770-777.

FANNING E, KLIMOVICH V, NAGER A (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. Nucleic Acids Res, 34:4126-4137.

FORMENT J, KAIDI A, JACKSON S (2012). Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. Nat Rev Cancer, 12:663-670.

FUKUSE T *et al*. (2000). Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected nonsmall cell lung cancer. Cancer Res, 60:242-24.

GAILLARD H, GARCÍA-MUSE T & AGUILERA A (2015). Replication stress and cancer. Nature Cancer Reviews, 15:276-289.

GE X, JACKSON D, BLOW J (2007). Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress. Genes Dev, 21:3331-41.

GENG Y *et al*. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. Cell, 114:431-443.

GHADIMI B *et al*. (2000). Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. Genes Chromosomes Cancer, 27:183-90.

GLIGORIS T & LÖWE J (2016). Structural Insights into Ring Formation of Cohesin and Related Smc Complexes. Trends in Cell Biology, 26:680-693.

GLOVER T *et al*. (1984). DNA polymerase a inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. Hum Genet, 67:136–142.

GORGOULIS V *et* al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature, 434:907-13.

GOURLEY C *et al*. (2009). WWOX gene expression abolishes ovarian cancer tumorigenicity in vivo and decreases attachment to fibronectin via integrin alpha3. Cancer Research, 69:4835–4842 (2009).

GU Y, TURCK C, MORGAN D (1993). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. Nature, 366:707-10.

GUDAS J et al. (1999). Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. Molecular Cell Biology, 19:612-622.

HAERING C *et al*. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. Molecular Cell, 9:773–788.

HANAHAN D & WEINBERG R (2000). The Hallmarks of cancer. Cell, 100:57-60.

HANAHAN D & WEINBERG R (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144:646-674.

HANEL W & MOLL U (2012). Links between mutant p53 and genomic instability. Journal Cell Biochemistry, 113:433-439.

HARPER J & ELLEDGE S (2007). The DNA damage response: ten years after. Mol Cell, 739-745.

HARPER J (2005). Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle. Methods in Molecular Biology, 296:157-166.

HARPER J *et al*. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell, 75:805-16.

HARTWELL L & WEINERT T (1989). Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. Science, 246: 629-634.

HELLMAN A *et al*. (2002). A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes. Cancer Cell, 1:89-97.

HELMRICH A, BALLARINO M & TORA L (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. Molecular Cell, 44:966-977.

HILLS S & DIFFLEY J (2014). DNA replication and oncogene-induced replicative stress. Current Biology, 24:435-444.

HIRAI H *et al*. (1995) Novel INK4 proteins p19 and p18 are specific inhibitors of cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. Molecular and Cellular Biology, 15: 2672–2681.

HOYT M, TOTIS L & ROBERTS B (1991). S.cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. Cell, 66:507–17.

HUA X, YAN H & NEWPORT J (1997). A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle. J Cell Biol, 137:183-92.

HUANG H *et al*. (2006). CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. Science, 314:294-7.

HUEBNER K & CROCE C (2003). Cancer and the FRA3B/FHIT fragile locus: it's a HIT. Br J Cancer, 88:1501–1506.

HUGHES B *et al*. (2013). Essential role for Cdk2 inhibitory phosphorylation during replication stress revealed by a human Cdk2 knockin mutation. Proc Natl Acad Sci, 110:8954-9.

HWANG H & CLURMAN B (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. Oncogene, 24:2776-2786.

HYDBRING P *et al.* (2010). Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. Proc Natl Acad Sci, 107:58-63.

IANZINI F & MACKEY M (1997). Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. Int J Radiat Biol, 72:409–421.

IBARRA A, SCHOWB E & MÉNDEZ J (2007). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. PNAS, 10:425-428.

IKEGAMI S et al. (1978). Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-α. Nature, 275:458–460.

ILIOPOULOS D *et al*. (2006). Roles of FHIT and WWOX fragile genes in cancer. Cancer Letters, 232:27-36.

INGVARSSON S, SIGBJORNSDOTTIR B & HUIPING C (2002). Mutation analysis of the CHK2 gene in breast carcinoma and other cancers. Breast Cancer Res; 4:R4.

JONES M & JALLEPALLI P (2012). Chromothripsis: chromosomes in crisis. Developmental Cell, 23:908-917.

JONES R *et al*. (2013). Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress. Oncogene, 32:3744-53.

KAWAMURA K *et al.* (2004). Induction of centrosome amplification and chromosome instability in human bladder cancer cells by p53 mutation and cyclin E overexpression. Cancer Res, 64:4800-9.

KECK J *et al*. (2007). Cyclin E overexpression impairs progression through mitosis by inhibiting APC(Cdh1). J Cell Biol, 178:371-85.

KEYOMARSI K *et al.* (1995). Deregulation of cyclin E in breast cancer. Oncogene, 11:941-950.

KEYOMARSI K *et al*. (2002). Cyclin E and survival in patients with breast cancer. N Engl J Med, 347:1566-75.

KIM S, XU B & KASTAN M (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. Genes Dev, 16:560-570.

KINZLER K & VOGELSTEIN B (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 386:761–763.

KOFF A *et al.* (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. Cell, 66:1217-1228.

KOFF A *et al.* (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. Science, 257:1689-1694.

KOPS G, WEAVER B & CLEVELAND D (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. Nature Reviews Cancer, 5:773-785.

LAIRD C *et a*l. (1987). Fragile sites in human chromosomes as regions of late-replicating DNA. Trends in Genetics, 3:274.

LAUPER N *et al*. (1998). Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. Oncogene, 17:2637-2643.

LAWRENCE M *et al*. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. Nature, 505:495–501.

LE BEAU M *et al*. (1998). Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction. Hum Mol Genet, 7:755-761.

LE TALLEC B *et a*l. (2014). Updating the mechanisms of common fragile site instability: how to reconcile the different views?. Cellular and Molecular Life Sciences, 71:4489-4494.

LEE H, DAVIDSON J & DURONIO R (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. Genes & Development, 23:2461-2477.

LETESSIER A et al. (2011). Cell-type-specific replication initiation programs set fragility of the FRA3B fragile site. Nature, 470:120-3.

LEW D & REED S (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. Cell, 66:1197-206.

LIONTOS M *et al*. (2007). Deregulated overexpression of hCdt1 and hCdc6 promotes malignant behavior. Cancer Res, 67:10899-909.

LIU E *et al*. (2004). Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. J Biol Chem, 279:17283-8.

LIU H, RANKIN S & YU H (2013). Phosphorylation-enabled binding of SGO1-PP2A to cohesin protects sororin and centromeric cohesion during mitosis. Nature Cell Biology, 15:40–49.

LIU Q *et al*. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. Genes Dev, 14:1448-1459.

LOEB L (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. Cancer Res, 51:3075–3079.

LUKUSA T & FRYNS J (2008). Human Chromosome Fragility. Biochimica et Biophysica Acta, 1779:3-16.

MA T *et al*. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. Genes Dev, 14:2298-313.

MACHERET M & HALAZONETIS T (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. Annual Review of Pathology, 10:425-48.

MAILAND N & DIFFLEY J (2005). CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. Cell, 122:915-26.

MALUMBRES M & BARBACID M (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem. Sci. 30:630-641.

MALUMBRES M & BARBACID M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer, 9:153-167.

MANGELSDORF M *et al*. (2000). Chromosomal fragile site FRA16D and DNA instability in cancer, Cancer Res. 60:1683–1689.

MARÉCHAL A & ZOU L (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5:1-18.

MATSUMOTO Y, MALLER J (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. Science, 306:885-888.

MATSUURA I *et al*. (2004). Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. Nature, 430:226-31.

MAYA-MENDOZA A *et al*. (2007). Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. Embo J, 26:2719-2731.

MINELLA A *et al*. (2002) p53 and p21 form an inducible barrier that protects cells against cyclin E-cdk2 deregulation. Curr Biol, 12:1817-27.

MIRON K *et al*. (2015). Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. Nat Commun, 6:7094.

MOBERG K *et al*. (2001). Archipelago regulates Cyclin E levels in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. Nature, 413:311-6.

MORGAN D (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 13:261-291.

MOTOYAMA N & NAKA K (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. Current Opinion in Genetics & Development, 14:11-16.

MURRAY A (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell, 116:221–34.

MUSACCHIO A (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. Current Biology, 25:1002-1018.

NASMYTH K & HAERING C (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. Annual Review Biochemistry. 74:595–648.

NEGRINI S, GOURGOLIS V & HALAZONETIS T (2010). Genomic instability: an evolving hallmark of cancer. Mol Cell Biol, 3:220-228.

NISHIYAMA T *et al*. (2010). Sororin mediates sister chromatid cohesion by antagonizing Wapl. Cell, 143:737-749.

NUGENT J *et al*. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. Journal Cell Science, 99:669-674.

O´CONNOR M (2015). Targeting the DNA damage response in cancer. Molecular Cell, 4:547-560.

OHTSUBO M & ROBERTS J(1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. Science, 259-1908-12.

OHTSUBO M *et al*. (1995). Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. Mol Cell Biol, 15:2612-24.

OKUDA M *et al*. (2000). Cell. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. Cell, 103:127-40.

OZERI-GALAI et al. (2011). Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites. Molecular Cell, 43:122-131.

PARDEE, A (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Natl Acad Sci, USA, 71:1286-1290.

PARISI T *et al*. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. EMBO Journal, 22:4794-4803.

PATTON E, WILLEMS A & TYERS M (1998). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. Trends Genet, 14:236-43.

PAULSEN R, CIMPRICH K (2007). The ATR pathway: fine-tuning the fork. DNA Repair, 6:953–966.

PETERS J & NISHIYAMA M (2012). Sister chromatid cohesion. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4:1-19.

POLYAK K *et al.* (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell, 78:59-66.

PORTER DC & KEYOMARSI K (2000). Novel splice variants of cyclin E with altered substrate specificity. Nucleic Acids Res, 28:E101.

PORTER P *et al*. (1997). Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. Nature Medicine, 3:222-225.

PRAKASH R *et al*. (2015). Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 7.

RAJAGOPALAN H *et al*. (2004). Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. Nature, 428:77-81.

RANKIN S & DAWSON D (2016). Recent advances in cohesion biology. F1000 Research, 5:1-8.

RHIND N & GILBERT D. (2013).DNA replication timing. Cold Spring Harbor. Perspectives in Medince, 3:1–26.

ROSEN D *et al*. (2006). Cyclin E expression is correlated with tumor progression and predicts a poor prognosis in patients with ovarian carcinoma. Cancer, 106:1925-1932.

RUFFNER H *et al*. (1999). BRCA1 is phosphorylated at serine 1497 in vivo at a cyclin-dependent kinase 2 phosphorylation site. Mol Cell Biol, 19:4843-54.

SCHWARTZ M, ZLOTORYNSKI E & KEREM B (2006). The molecular basis of common and rare fragile sites. Cancer Letters, 232:13-26.

SCUDERI R *et al*. (1996). Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. Blood, 87:3360-3367.

SEARS R & NEVINS J (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. J. Biol. Chem. 277:11617-11620.

SHAY J *et al*. (1993). E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. Oncogene, 8:1407-1413.

SHAYE A *et al.* (2009). Cyclin E deregulation is an early event in the development of breast. Breast Cancer Res, 115:651-659.

SHEAFF R *et al*. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. Genes Dev, 11:1464-78.

SHEN Z (2011). Genomic instability and cancer: an introduction. Journal of Molecular Cell Biology, 3:1-3.

SHERR C & ROBERTS J (1999). Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. 13:1501-1512.

SINGER D *et al*. (1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. Genes Dev, 13:2375-87.

SKOWYRA D *et al*. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. Cell, 91:209-19.

SLAMON D *et al*. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science, 235:177–182.

SMITH A *et al.* (2006). Deregulated cyclin E promotes p53 loss of heterozygosity and tumorigenesis in the mouse mammary gland. Oncogene, 25:7245-7259.

SOZZI G *et al*. (1997). Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. Cancer Research, 57:5207-12.

SPRUCK C, WON K & REED S (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. Nature, 401:297-300.

STEVAUX O & DYSON N (2002). A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. Curr. Opin. Cell Biol. 14:684-691.

STILLMAN B (1996). Cell cycle control of DNA replication. Science, 274: 1659-1664.

STROHMAIER H *et al*. (2001). Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. Nature, 413:316-22.

TEDESCHI A *et al.* (2013). Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation. Nature, 501:564–568.

THIBODEAU S, BREN G & SCHAID D (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science, 260:816–819.

THOMPSON S, BARKHOUM S & COMPTON D (2010). Mechanisms of Chromosomal Instability. Current Biology, 20:285-295.

TOYOSHIMA H, HUNTER T (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell, 78:67-74.

TSANTOULIS P *et al*. (2008). Oncogene-induced replication stress preferentially targets common fragile sites in preneoplastic lesions. Oncogene, 27:3256-3264.

UHLMANN F, LOTTSPEICH F & NASMYTH K (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. Nature, 400:37–42.

VAKIFAHMETOGLU H, OLSSON M & ZHIVOTOVSKY B (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death Differ, 15:1153–1162.

VITALE I *et al*. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 12:385-392.

WALSH T & KING M (2007). Ten genes for inherited breast cancer. Cancer Cell, 11:103–105.

WON K & REED S (1996). Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. EMBO J, 15:4182-93.

WOODWARD A *et al*. (2006). Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. J Cell Biol, 173:673-8.

XIONG Y *et a*l. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature, 366:701-4.

ZARIWALA M, LIU J & XIONG Y (1998). Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. Oncogene, 17:2787-2798.

ZEMAN M & CIMPRICH K (2014). Causes and Consequences of Replication Stress. Nat Cell Biol, 16:2–9.

ZHAO J *et al*. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication dependent histone gene transcription. Genes Dev, 14:2283-97.

ZIELKE N, EDGAR B & DEPAMPHILIS M (2013). Endoreplication. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5:1-15.

ZOU L & ELLEDGE S (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science, 300:1542-1548.