

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Beatriz de Araujo Cortez

Interação da crisotila com células de carcinoma de pulmão humano em cultura: interferência com a mitose utilizando genes repórteres e microscopia em tempo real e estudo do potencial genotóxico.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientador(a): Profa. Dra. Gláucia Maria Machado Santelli

São Paulo

2009

RESUMO DA DISSERTAÇÃO

Asbesto é um nome geral dado a seis tipos de fibras minerais encontradas naturalmente na crosta terrestre. Estas fibras vêm sendo exploradas industrialmente desde 1970, porém diversos trabalhadores expostos às fibras apresentaram patologias no trato respiratório, como fibroses e carcinomas. Alguns tipos de fibra foram banidos do mercado, porém o tipo de asbesto crisotila ainda pode ser comercializado na maioria dos países. Estudos *in vivo* e *in vitro* tentam elucidar as alterações causadas pela exposição à asbesto nos tecidos e nas células que possam estar relacionadas ao aparecimento de doenças, e foi verificado que a exposição às fibras leva a quebras na dupla fita de DNA, estresse oxidativo, formação de células micronucleadas e células aneuploides. O presente estudo teve como objetivo verificar a presença de alterações causadas em células em cultura expostas à crisotila por 48 h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 h, 4 dias e 8 dias, além de observar por microscopia em tempo real divisões aberrantes após a exposição as fibras por 24 e 48h. Foram verificadas alterações que permaneceram na cultura mesmo após 8 dias de recuperação, quando não foram mais observadas fibras na cultura, como formação de células aneuploides, diminuição de frequência de células em G0/G1, aumento de células em G2/M e aumento relativo de células em metáfase quanto à porcentagem de células em fases mais tardias da fase M do ciclo. Já aumento da frequência de células micronucleadas ocorreu apenas nos períodos quando foram observadas fibras na cultura. Para análise da formação de mitoses multipolares e destinos destas células foram construídos vetores para expressão de tubulinas fusionadas a proteínas fluorescentes RFP e GFP, padronizadas as condições de transfecção e de aquisição de imagens para que as células tratadas com crisotila fossem observadas por *time-lapse*. Alguns destinos de mitoses multipolares causadas pelo tratamento com crisotila foram observados, como morte em metáfase, divisão gerando duas ou três células filhas, fusão de células durante a telófase e retenção em

metáfase. Os dados sugerem a indução da amplificação centrossômica, que parece ocorrer inicialmente em células interfásicas, e também devido à fusão de células.

CAPÍTULO I

1.1 O Amianto

Encontrado naturalmente na crosta terrestre, o asbesto ou amianto é uma fibra mineral cujas características como a resistência à tração maior que a do aço, aos ácidos e a temperaturas de até 1.000⁰C, não sendo oxidável nem combustível, o tornam muito importante para o uso humano – há registros de sua utilização já na Grécia Antiga. Com exploração comercial iniciada em 1878 na região de Quebec, Canadá, a produção mundial das fibras de amianto atingiu cerca de 4 milhões de toneladas nos últimos anos. Suas aplicações industriais chegam a 3 mil produtos, sendo os mais numerosos o fibrocimento (que também dá origem a telhas e caixas d'água), os produtos de fricção de automóveis e os isolantes térmicos. Em consequência do crescente interesse comercial que despertaram, tanto a mineralização como a industrialização das fibras de amianto têm levado um grande número de trabalhadores a ficar exposto a este mineral (MURRAY, 1990).

As variedades de amianto dividem-se em dois grandes grupos, de acordo com sua composição química e estrutura cristalina: o grupo das serpentinas e o grupo dos anfíbolios. Estes últimos caracterizam-se por apresentar fibras duras e pontiagudas, e são representados por antofilita, amosita, crocidolita, tremolita e actinolita (Fig. 1A). O grupo das serpentinas tem como principal variedade a crisotila, o mais abundante tipo de amianto encontrado na natureza, com fibras curvas e sedosas, uma muito pequena seção transversal (180 a 300 nm) e composição química $3\text{MgOSiO}_2\text{H}_2\text{O}$. Sua estrutura

é tubular e consiste em lâminas que se curvam devido ao alinhamento dos átomos de magnésio e silício (Fig. 1B).

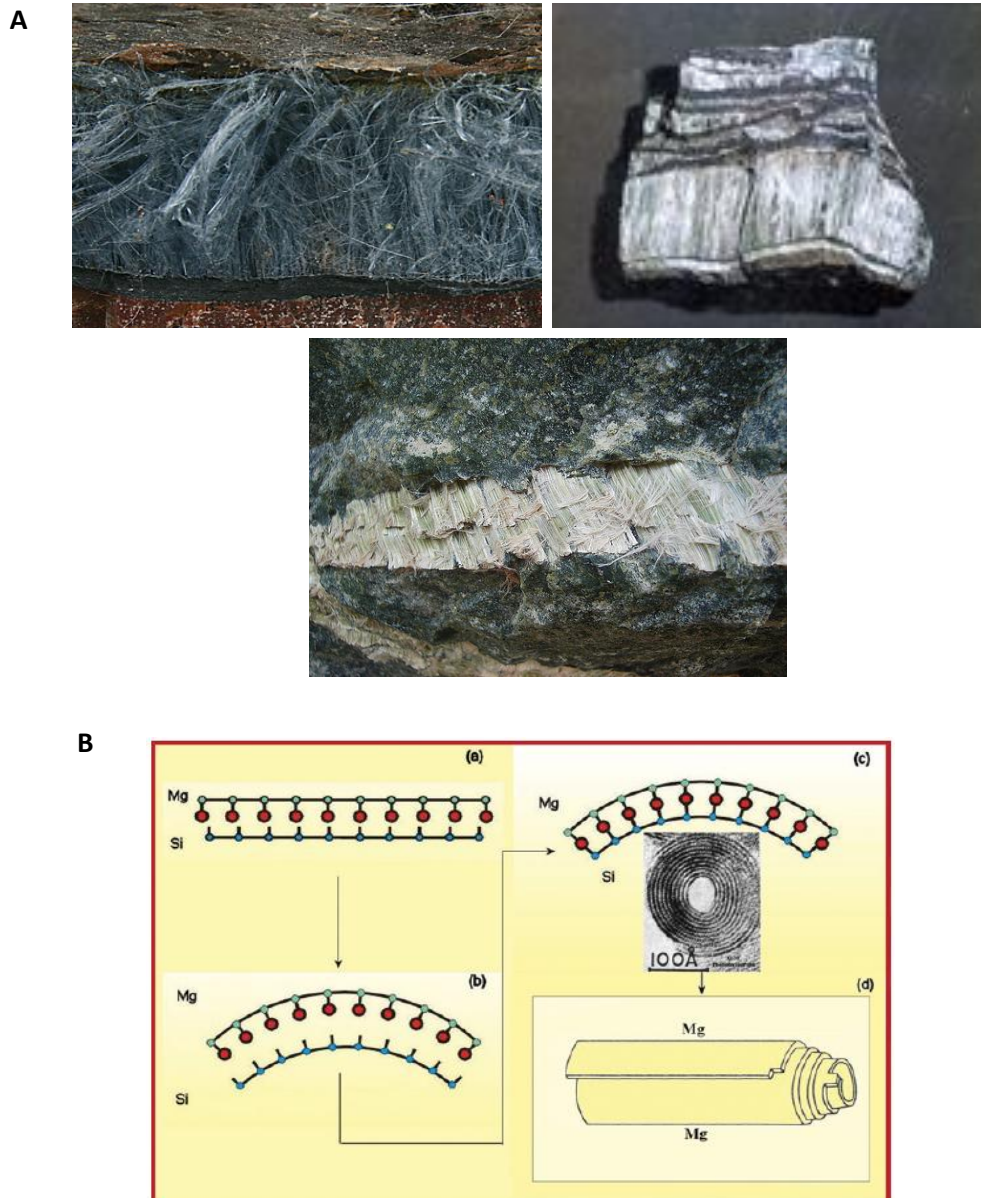


Figura 1: **Os tipos de amianto e a estrutura da crisotila. A)** Tipos de amianto, na forma como são encontrados na natureza (crocidolita, amosita e crisotila); **B)** Estrutura tubular da crisotila, formada devido o alinhamento dos átomos de Magnésio e Silício (Bernstein *et al.*, 2005).

No passado, as fibras do tipo anfibólio eram praticamente as únicas utilizadas comercialmente. Porém as condições de trabalho com este material não obedeciam a regulamentação alguma e daí foram gerados graves problemas de saúde humana que passaram a ser conhecidos como “doenças relacionadas ao asbesto”. Mesoteliomas e fibrose pulmonar são as principais doenças que comprovadamente estão associadas à exposição crônica a fibras do tipo anfibólio (MOSSMAN *et al.*, 1990).

Quando analisados os casos de pessoas que foram expostas ao amianto por 20 anos ou mais, as placas pleurais e a asbestose são as patologias mais comuns, atingindo 40 de cada 100 pessoas. Os carcinomas de pulmão e mesoteliomas de pleura são as patologias menos frequentes, atingindo de 12 a 25 pessoas de cada 100, respectivamente. No entanto, quando analisadas as causas de morte de pessoas expostas ao asbesto, a ordem se inverte: mesoteliomas e carcinomas de pulmão são as primeiras causas (MERCHANT, 1990). Outros tipos de tumor também são observados em maior frequência em pessoas expostas ao asbesto, como cânceres gastrointestinais, renais e oculares (ENTERLINE *et al.*, 1987).

Estas doenças apresentam um longo tempo de latência (10 a 30 anos) antes de se manifestarem, como mostra o estudo feito por HAGEMEYER e col. (2006), que analisou o consumo de asbesto na Alemanha e a ocorrência de mesoteliomas de pleura e carcinomas de pulmão, verificando que após 30 anos do aumento do consumo de asbesto ocorreu também o aumento da detecção de carcinomas e mesoteliomas. Este longo período de latência, por sua vez, retardou a implantação de uma legislação regulamentando o uso do asbesto e condições de mais segurança para os trabalhadores.

Os tecidos pulmonares de pessoas expostas ao asbesto que morreram de doenças a ele relacionadas foram também analisados a fim de identificar os tipos de fibras presentes. Normalmente são encontradas fibras do tipo amosita, crisotila e crocidolita, porém estas raramente se encontram puras, dificultando a análise do potencial carcinogênico de cada uma (LANGER & NOLAN, 1998).

A avaliação da frequência de anormalidades cromossômicas evidencia o potencial mutagênico das fibras de amianto. Pessoas que sofreram exposição ao asbesto durante longos períodos (5 a 40 anos) apresentaram anormalidades cromossômicas em frequência maior a pessoas que não sofreram exposição a estes tipos de fibra, evidenciando também a possível relação entre exposição ao amianto e o desenvolvimento de cânceres (DUŠINSKÁ *et al.*, 2004).

Hoje as fibras do tipo anfibólio estão banidas do mercado, foram substituídas pelas fibras do grupo das serpentinas, representadas sobretudo pela crisotila. O Brasil é atualmente o terceiro maior produtor mundial de crisotila, com uma única mina em funcionamento (Mina de Cana Brava, localizada em Goiás), que gera a crisotila considerada muito pura, já que não possui contaminação por outro tipo de amianto. Os principais países consumidores estão na Ásia, que consomem até 58% dos 2,2 milhões de toneladas/ano comercializados no mundo.

Os efeitos nocivos desta fibra à saúde humana são muito menos graves, mas ainda merecem atenção de pesquisadores por não estarem completamente elucidados. Alguns autores sugerem que o potencial da crisotila em causar carcinomas de pulmão é semelhante ao potencial das fibras tipo anfibólio (LANDRIGAN, 1998; OSINUBI *et al.*; 2000; MANNING *et al.*, 2002).

BERNSTEIN e col. (2005) verificaram que as fibras de crisotila não se acumulam como as do tipo anfibólio em pulmões de camundongos expostos às fibras por 5 dias. Os tecidos observados em microscopia de luz apresentam fibras do tipo anfibólio maiores que 20 μm até 400 dias após o final da exposição, enquanto as fibras de crisotila maiores que 20 μm não foram encontradas nos pulmões de animais após 10 dias da exposição. Entretanto, foram encontradas fibras de crisotila de até 5 μm nos tecidos dos pulmões dos camundongos até 400 dias após a exposição, sugerindo que as fibras de crisotila sofram uma fragmentação em pedaços pequenos quando se alojam nos tecidos. Se estes fragmentos pequenos são eliminados dos organismos e como seriam eliminados são pontos ainda não elucidados.

1.2 A divisão Celular e a Aneuploidia

A divisão mitótica corresponde ao processo pelo qual uma célula dá origem a duas células geneticamente idênticas a ela. Este processo seria o responsável por dar origem a novos organismos, quando unicelulares, ou a praticamente todas as células de um organismo multicelular.

Para que ao final da mitose sejam formadas duas células geneticamente idênticas, os diversos organismos dispõem de processos próprios que podem diferir de acordo com o organismo ou com a fase de vida, porém alguns eventos ocorrem de maneira universal. Para que ocorra a divisão, todo o material genético deve ser totalmente replicado apenas uma vez e deve ser dividido igualmente pelas duas células filhas a fim de formar duas células que possuam um genoma completo.

O processo de divisão mitótica é classicamente dividido em quatro fases: fase G1, fase S, fase G2 e fase M (quando o material genético duplicado em S e o citoplasma são divididos entre as duas células filhas). Estas quatro fases são estritamente

controladas e só podem ocorrer quando a fase anterior for corretamente completada, e para tanto existem diversos mecanismos de verificação e controle do ciclo celular. Para que cada fase do ciclo se inicie é necessário que ciclinas específicas se liguem a Cdks (quinases dependentes de ciclinas), e o complexo então formado é capaz de fosforilar diferentes substratos, promovendo os eventos necessários para cada fase do ciclo (HUNTER, 1993). Existem também proteínas capazes de inibir estes complexos, que são chamadas de Cdkis, que mantêm os sítios ativos das Cdks inativos. As mais estudadas são p15, p16, p21 e p27, e o equilíbrio entre as Cdks, Cdkis e ciclinas é essencial à manutenção de uma população celular (KAMB, 1995).

Durante o início da fase G1 são encontrados os complexos Cdk6-ciclina D e Cdk4-ciclina D, que podem ser ativados, por exemplo, após ligação de mitógenos a superfície celular. Esses complexos são responsáveis por iniciar a fosforilação da proteína Rb, que nesta fase está ligada a E2F. Com essa fosforilação inicial, a proteína Rb começa a se dissociar do fator E2F, e este leva a transcrição de ciclina E entre outros genes necessários à passagem de G1 para fase S. Já ao final de G1, ciclina E se liga a Cdk2, e este complexo finaliza a fosforilação de Rb, liberando mais fatores E2F que desencadeiam a transcrição de diversos genes envolvidos na replicação do DNA, entre eles ciclina A. O complexo formado por Cdk2- ciclina A desencadeia a replicação do material genético, marcando a entrada na fase S, quando todo o DNA genômico da célula é replicado de forma semiconservativa (NEVINS, 1992; KOFF *et al.*, 1992; JOHNSON & SCHNEIDER-BROUSSARD, 1998).

Após a fase S ocorre a fase G2, intervalo entre a fase S e a fase M, quando ocorre a transcrição e tradução da maquinaria necessária à divisão celular, além do amadurecimento dos centrossomos que também foram duplicados na fase S. Ao final da fase G1 e ao final da G2 ocorrem os pontos de checagem de G1/S e G2/M, que

verificam se as condições do ambiente são favoráveis ao crescimento e divisão celular e se o material genético sofreu algum dano, e se o DNA foi totalmente replicado e de forma correta, respectivamente. Caso o material genético contenha algum dano, a proteína p53 é ativada e leva a transcrição de p21, que vai desencadear o reparo do dano ou o encaminhamento da célula para a morte celular programada (HUNTER, 1993).

Caso o material genético tenha sido corretamente duplicado, ocorre a transcrição de ciclina B e também a ativação de Cdc25, uma fosfatase que leva à ativação de Cdk1. Estas duas proteínas, ciclina B e Cdk1, unidas formam o complexo promotor na mitose (MPF), capaz de fosforilar diferentes substratos como o retículo endoplasmático, condensinas e componentes do citoesqueleto como lamina nucleares, levando a alterações celulares necessárias à divisão celular.

A prófase corresponde ao início da fase M, quando o envoltório nuclear ainda está intacto, porém os cromossomos estão se condensando, os centrossomos migrando para pólos opostos e os fusos mitóticos começando a se formar. A próxima etapa é a pró-metáfase, quando ocorre a fragmentação do envoltório nuclear e os cromossomos passam a se ligar aos microtúbulos.

Quando os cromossomos apresentam seus cinetócoros ligados a microtúbulos provenientes de pólos opostos do fuso e passam a se localizar na região equatorial da célula formando a placa metafásica, é caracterizada a metáfase. Neste momento ocorre o ponto de checagem do fuso mitótico, que é capaz de verificar se todos os cinetócoros dos cromossomos estão ligados aos microtúbulos e se as cromátides irmãs estão ligadas aos microtúbulos provenientes de pólos opostos. Cinetócoros livres, ou seja, não ligados a microtúbulos, são capazes de reter proteínas deste ponto de checagem, as quais retêm a proteína Cdc20 nos cinetócoros. Quando microtúbulos estão ligados aos cinetócoros

os sítios de ligação das proteínas do ponto de checagem se tornam fracos e elas se desligam dos cinetócoros, liberando Cdc 20, que então se liga e ativa o APC (complexo promotor da anáfase). Este, por sua vez, leva à ubiquitinação da securina, que assim libera a separase para clivar a coesina que mantém as cromátides irmãs unidas, permitindo a segregação dos cromossomos. Além disso, o APC ativa a degradação da ciclina B, que fará com que as alterações ocorridas para entrada na mitose sejam revertidas (MUSACCHIO & HARDWICK, 2002; RIEDER & MAIATO, 2004).

Após este ponto de checagem ocorre a anáfase, que consiste na separação das cromátides irmãs. O movimento dos microtúbulos nesta fase é de extrema importância: os microtúbulos astrais se encurtam e os polares deslizam uns sobre os outros, aproximando os centrossomos do córtex celular, enquanto os microtúbulos ligados a cinetócoros se encurtam levando as cromátides em direção aos centrossomos. (WADSWORTH, 1993). Com os lotes de cromossomos já em pólos opostos da célula é caracterizada a telófase, e os efeitos da degradação da ciclina B pelo APC já são percebidos com o descondensamento dos cromossomos e a reorganização do envoltório nuclear. Também é iniciada a formação do corpo intermediário de microtúbulos (*midbody*), que permanece na ponte intercelular até que o citoplasma das duas células filhas seja dividido.

A citocinese, a última fase da divisão celular, é caracterizada pela formação do anel contrátil de actina e a separação total do citoplasma das duas células filhas. O corpo intermediário de microtúbulos funciona como ancoradouro para diversas proteínas necessárias à completa divisão, sendo fundamental à citocinese. Se todos os processos de controle e verificação do ciclo celular ocorrerem de forma correta, duas células geneticamente idênticas devem ser formadas (BARR & GRUNEBERG, 2007).

A maior parte das células nos tecidos humanos se encontra no estado diploide, ou seja, elas apresentam duas versões homólogas para cada cromossomo. Exceções também existem, como algumas células do fígado e do coração que são tetraploides (STORCHOVA & PELLMAN, 2004), ou ainda algumas células nervosas aneuploides que apresentam perda ou ganho de poucos cromossomos (REHEN *et al.*, 2001).

Erros durante o ciclo celular podem levar à formação de células aneuploides, células que possuem conteúdo de DNA alterado devido à perda ou ganho de cromossomos ou parte de cromossomos, e assim apresentam conteúdo de DNA diferente do diplóide (GANEM *et al.*, 2009). Em alguns casos esse conteúdo de DNA anormal é estável e se mantém em sucessivas divisões mitóticas. Já em outros casos o conteúdo de DNA não é estável e se altera com sucessivas divisões celulares, refletindo prováveis problemas na maquinaria de replicação ou de segregação dos cromossomos (LENGAUER *et al.*, 1997). Esta instabilidade, que leva a rápidas alterações e pode atingir todos os cromossomos, é conhecida como instabilidade cromossômica. É importante notar que a aneuploidia seria um estado, que pode ser alterado ou não, e a instabilidade cromossômica implicaria rápidas alterações na composição cromossômica.

Estudos com linfócitos do sangue periférico de humanos normais marcados com sondas centroméricas específicas mostram que até 1% destas células apresentam trissomia de alguns cromossomos (CARERE *et al.*, 1998; HAYES *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1998). Se as células normais de outros tecidos humanos se comportarem de maneira semelhante aos linfócitos, centenas de milhares de células aneuploides devem ser geradas diariamente. Alguns autores especulam que talvez a aneuploidia seja tolerada em células totalmente diferenciadas que dificilmente vão entrar em novas divisões, mas que não seria tolerada em células indiferenciadas (CIMINI & DEGRASSI, 2005).

A presença de aneuploidia está relacionada a diversas doenças genéticas, como a Síndrome de Down, e ainda está presente na grande maioria dos tumores sólidos, sendo assim uma característica prognóstica e diagnóstica (MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; PATHAK & MULTANI, 2006; DUESBERG *et al.*, 2006, dentre outros).

A hipótese de que a aneuploidia estaria relacionada ao desenvolvimento de tumores foi feita por BOVERI há quase 100 anos (BOVERI, 1914), quando observou que, após divisões mitóticas aberrantes que resultavam em células com quantidade de DNA alteradas durante o desenvolvimento de ouriços, estes apresentavam aberrações durante o seu desenvolvimento ou não o completavam. Mutações pontuais em determinados genes também já foram colocadas como causas de tumores a partir da década de 1970 (DUESBERG *et al.*, 1998; BRINKLEY & GOEPFERT, 1998; HAHN *et al.*, 1999), e alguns autores chegaram a excluir a instabilidade genômica e a aneuploidia como possíveis causas da formação de tumores (ZIMONJIC *et al.*, 2001). Outros autores sugerem que a aneuploidia poderia ser importante na supressão de tumores, já que grandes alterações no cariótipo podem causar perdas de muitos genes necessários à sobrevivência das células, fazendo com que estas morram (HEDE, 2005).

Hoje ainda persiste uma grande discussão em torno do papel da aneuploidia no desenvolvimento de tumores. Alguns autores propõem que uma instabilidade genômica pequena provocaria a formação de células aneuploides com poucas alterações cromossômicas e mutações pontuais em determinados genes (como nos genes de reparo de DNA), e estas células seriam possíveis responsáveis pela formação de tumores. Já a formação de células aneuploides com grandes alterações em seu conteúdo de DNA ou com perdas de muitos cromossomos seria um evento supressor de tumor, assim como danos extensos ao material genético como aqueles causados pelos quimioterápicos (WEAVER & CLEVELAND, 2007).

Já está bem estabelecido que a perda ou ganho de um único cromossomo ou parte dele pode acarretar o desequilíbrio dos níveis de expressão de certos genes e a introdução de diversas mutações envolvidas em transformações malignas, além de erros na segregação cromossômica, motivando uma maior instabilidade genética (LENGAUER *et al.*, 1997; FUKASAWA 2005). Erros em eventos relacionados à divisão mitótica podem ocasionar instabilidade cromossômica e levar à formação de células aneuploides. Entre estes erros podemos destacar a falha no processo de citocinese, a perda da função do ponto de checagem mitótico, a falha na função do cinetócoro e a amplificação anormal do número de centrossomos. A falha na citocinese e a amplificação centrossômica são eventos relacionados, já que a primeira leva à formação de uma célula com conteúdo de DNA e de centrossomos duplicados.

A presença de mais de dois centrossomos durante a divisão mitótica pode induzir a alterações na segregação dos cromossomos, como cromossomos presos a fusos astrais de centrossomos posicionados incorretamente durante a mitose, forças desiguais exercidas pelos pólos dos fusos devido à presença de números diferentes de centrossomos nos pólos, e ainda devido à possibilidade de os centrossomos se organizarem formando três pólos e a célula se dividir resultando em três células filhas (FUKASAWA *et al.*, 1996).

A duplicação do centrossomo tem início no final de G1/início de S, e durante S e G2 os novos centríolos se alongam e a matriz pericentriolar é recrutada, e no final de G2 os dois centríolos já estão totalmente formados. A sincronização da duplicação dos centrossomos e do DNA ocorre pela ativação no final de G1 do complexo Cdk2-ciclina E. Este complexo está envolvido na replicação do DNA pela fosforilação da proteína Rb, e foi descoberto que a duplicação dos centrossomos também é iniciada por Cdk2-

ciclina E (NEVINS, 1992; MATSUMOTO *et al.*, 1999; HINCHCLIFFE & SLUDER; 2001, MATSUMOTO & MALLER, 2004).

Recentemente os centrossomos estão sendo vistos como um centro de reações, organizando espaço-temporalmente os componentes dos pontos de checagem (LOFFLER *et al.*, 2006), e até foram postulados como centros de controle do ciclo celular (DOXSEY, 2001; DOXSEY *et al.*, 2005). Chk1 e Chk2 estão entre as proteínas reguladoras do ponto de checagem encontradas nos centrossomos, o que sustenta a proposta destas funções adicionais.

E embora já esteja claro que a aneuploidia contribui para o surgimento ou desenvolvimento de tumores e também de outras doenças, a ocorrência e mecanismos que levam a erros na segregação dos cromossomos e a aneuploidia ainda precisam ser explorados (CIMINI & DEGRASSI, 2005).

1.3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações do ciclo celular causadas pela exposição à crisotila por 48 horas, relacionar estas alterações com a formação de células aneuploides e verificar se as alterações persistem por longos períodos de recuperação em meio livre de fibra. Para tanto, foram consideradas as seguintes abordagens:

- análise do ciclo celular, formação de células aneuploides e índice mitótico após tratamento com crisotila e recuperação por 48 horas, 4 dias e 8 dias;
- avaliar o potencial genotóxico da exposição à crisotila pela determinação da frequência de micronúcleos;

- análise da presença de fibras de crisotila durante todos os períodos de recuperação;
- estabelecimento das condições necessárias para observação das células vivas por *time-lapse*, e análise da formação de mitoses multipolares e destinos destas células.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARR, F. A.; GRUNEBERG, U. Cytokinesis: placing and making the final cut. **Cell**, 131: 847-60, 2007.

BERNSTEIN, D. M.; CHEVALIER, J.; SMITH P. Comparison of Calidria chrysotile asbestos to pure tremolite: final results of the inhalation biopersistence and histopathology examination following short-term exposure. **Inhal. Toxicol.**, 17: 427-449, 2005.

BRINKLEY, B. R.; GOEPFERT, T. M. Supernumerary centrosomes and cancer: Boveri's hypothesis resurrected. **Cell Motil. Cytoskeleton.**, 41: 281-8, 1998.

BOVERI, T. Zur frage der entstehung maligner tumoren. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1914; trad. Boveri M. The origin of malignant tumors. Baltimore, M. D.: Williams and Wilkins; 1929.

CARERE, A.; ANTOCCIA, A.; CIMINI, D.; CREBELLI, R.; DEGRASSI, F.; LEOPARDI, P.; MARCON, F.; SGURA, A.; TANZARELLA, C.; ZIJNO, A. Genetic effects of petroleum fuels: II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. **Environ. Mol. Mutagen.**, 32: 130-8, 1998.

CIMINI, D.; DEGRASSI, F. Aneuploidy: a matter of bad connections. **Trends Cell Biol.**, 15: 442-51, 2005.

DOXSEY, S. J. Re-evaluating centrosome function. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, 2(9): 688-98, 2001.

DOXSEY, S. J.; ZIMMERMAN, W.; MIKULE, K. Centrosome control of the cell cycle. **Trends Cell Biol.**, 15: 303-311, 2005.

DUESBERG, P.; RAUSCH, C.; RASNICK, D.; HEHLMANN, R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95: 13692–13697, 1998.

DUESBERG, P.; LI, R.; FABARIUS, A.; HEHLMANN, R. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. **Contrib. Microbiol.**, 13: 16-44, 2006.

DUSINSKÁ, M.; BARANCOKOVÁ, M.; KAZIMÍROVÁ, A.; HARRINGTON, V.; VOLKOVÁ, K.; STARUCHOVÁ, M.; HORSKÁ, A.; WSÓLOVÁ, L.; COLLINS, A. Does occupational exposure to mineral fibres cause DNA or chromosome damage? **Mutat. Res.**, 553: 103-10, 2004.

ENTERLINE, P. E.; HARTLEY, J.; HENDERSON, V. Asbestos and cancer: a cohort followed up to death. **Br. J. Ind. Med.**, 44: 396-401, 1987.

FUKASAWA, K.; CHOI, T.; KURIYAMA, R.; RULONG, S.; VAN DE WOUDE, G. F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. **Science**, 271: 1744-7, 1996.

FUKASAWA, K., Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. **Cancer Letters**, 230: 6–19, 2005.

HAGEMEYER, O.; OTTEN, H.; KRAUS, T.; Asbestos consumption, asbestos exposure and asbestos-related occupational diseases in Germany. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, 79: 613–620, 2006.

HAHN, W. C; COUNTER, C. M.; LUNDBERG, A. S.; BEIJERSBERGEN, R. L.; BROOKS, M. W.; WEINBERG, R. A. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. **Nature**, 400: 464-8, 1999.

HAYES, R. B.; ZHANG, L.; YIN, S.; SWENBERG, J. A.; XI, L.; WIENCKE, J.; BECHTOLD, W.E.; YAO, M.; ROTHMAN, N.; HAAS, R.; O'NEILL, J.P.; ZHANG, D.; WIEMELS, J.; DOSEMEDI, M.; LI, G.; SMITH, M. T. Genotoxic markers among butadiene polymer workers in China. **Carcinogenesis**, 21: 55-62, 2000.

HEDE, K. Which came first? Studies clarify role of aneuploidy in cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, 97: 87-9, 2005.

HINCHCLIFFE, E. H.; SLUDER, G. Centrosome duplication: three kinases come up a winner! **Curr. Biol.**, 11: 698-701, 2001.

HUNTER, T. Braking the cycle. **Cell**, 75: 839-841, 1993.

JOHNSON, D. G.; SCHNEIDER-BROUSSARD, R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. **Front. Biosc.**, 3: 447-8, 1998.

KAMB, A. Cell-cycle regulator and cancer. **TIG**, 11: 136-140, 1995.

KOFF, A.; GIORDANO, A.; DESAI, D.; YAMASHITA, K.; HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. **Science**, 257: 1689-1694, 1992.

LANDRIGAN, P. J. Asbestos- Still a carcinogen. **N. Engl. J. Med.**, 338: 1618- 1619, 1998.

LANGER, A. M.; NOLAN, R. P. Asbestos in the lungs of persons exposed in the USA. **Monaldi Arch. Chest Dis.**, 53: 168-80, 1998.

LENGAUER, G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, 386: 623-7, 1997.

LOFFLER, H.; LUKAS, J.; BARTEK, J.; KRAMER, A. Structure meets function: centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. **Exp. Cell. Res.**, 312: 2633-40, 2006.

MACHADO–SANTELLI, G. M.; MORI, L.; PEREIRA, C. A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Anal Cell Pathol.**, 7: 321-34, 1994.

MANNING, C. B.; VALLYATHAN, V.; MOSSMAN, B. T. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. **Int. Immunopharmacol.**, 2: 191-200, 2002.

MATSUMOTO, Y.; HAYASHI, K.; NISHIDA, E. Cyclin-dependent kinase 2 (cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells, **Curr. Biol.**, 9: 429–432, 1999.

MATSUMOTO, Y.; MALLER, J. L. A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. **Science**, 306: 885-8, 2004.

MERCHANT, J. A. Human Epidemiology: A Review of Fiber Type and Characteristics in the Development of Malignant and Nonmalignant Disease. **Environ. Health Perspec.**, 88: 287-293, 1990.

MOSSMAN, B. T.; BIGNON, J. B.; CORN, M.; EATON, A.; GEE, J. B. L. Asbestos: scientific developments and implications for public policy. **Science**, 247: 294–301, 1990.

MURRAY, R. Asbestos: a chronology of its origins and health effects. **Br. J. Ind. Med.**, 47: 361-365, 1990.

MUSACCHIO, A.; HARDWICK, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. **Nat. Rev.Mol. Cell Biol.**, 3: 731–741, 2002.

NEVINS, J. R.. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. **Science**, 258: 424-9, 1992.

OSINUBI, O. Y.; GOCHFELD, M.; KIPEN, H. M. Health effects of asbestos and nonasbestos fibers. **Environ. Health Perspect.**, 108: 665-74, 2000.

PATHAK, S.; MULTANI, A. S. Aneuploidy, stem cells and cancer. **Exs.**, 96: 49-64, 2006.

REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; KAUSHAL, D.; KINGSBURY, M. A.; YANG, A. H.; CHUN, J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98: 13361-6, 2001.

RIEDER, C. L.; MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Dev. Cell**, 7: 637-651, 2004.

STORCHOVA, Z., PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 5: 45-5, 2004.

ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; LI, G.; DOSEMECI, M.; YIN, S.; KOLACHANA, P.; TITENKO-HOLLAND, N.; SMITH, M. T. Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene. **Carcinogenesis**, 19: 1955-61, 1998.

WADSWORTH, P. Mitosis: spindle assembly and chromosome motion. **Curr. Opin. Cell Biol.**, 5:123-128, 1993.

WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D. W. Aneuploidy: Instigator and Inhibitor of Tumorigenesis. **Cancer Res.**, 67: 10103-10105, 2007.

ZIMONJIC, D.; BROOKS, M. W.; POPESCU, N.; WEINBERG, R. A.; HAHN, W. C. Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability. **Cancer Res.**, 61: 8838-44, 2001.

CAPÍTULO II

ABSTRACT

Studies in vivo and in vitro are trying to elucidate the asbestos effects in cells that could be related to the development of asbestos associated diseases. Chrysotile is one of the six types of asbestos naturally found on earth, and it is the only that still can be commercialized in most of the countries. Exposure to others types of asbestos are associated serious health disease, such as asbestosis, carcinomas and pleural mesotheliomas. The association of

chrysotile exposure and health diseases is controversy, however *in vitro* studies show the mutagenic potential of this fiber that can induce DNA and cell damage. The present work aimed to analyze alterations in lung small cell carcinoma culture after 48 h of chrysotile exposure followed to 48 h, 4 days and 8 days of recovery in fiber-free culture medium. Some alterations such as aneuploid cell formation, increased frequencies of G2/M cell, decreased frequencies of G1 cells, and increased frequencies of cells in early M phases as metaphase were found in cell culture even after 8 days of recovery. The presence of chrysotile fibers in cell culture and the cell morphology were observed by confocal microscopy and after 4 and 8 days of recovery were observed only few chrysotile fragments inside some cells, and the morphology of cell culture are similar to control situation, formed mostly by mononucleated cells. The induction of micronuclei occurred after chrysotile treatment followed to 48 h and 4 days of recovery, however after 8 days of recovery the number of micronucleated cells was similar to control situation. We conclude that HK2 cells exposed to chrysotile fibers for 48 h show alterations in cell culture such as aneuploid cell formation, and these alterations can persist in cell culture even in absence of chrysotile fibers

RESUMO

Estudos *in vivo* e *in vitro* tentam elucidar as alterações causadas por asbesto que podem ter a ver com o desenvolvimento das doenças vinculadas a essas fibras. Células em cultura expostas a asbesto por até 72 horas apresentam produção de espécies reativas de oxigênio, além de aumento da expressão de enzimas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo. Após a exposição ao asbesto também são encontradas maior frequência de micronúcleos, quebras da dupla fita de DNA e formação de células aneuploides. Já alterações do ciclo celular foram investigadas por citometria de fluxo, e o tratamento com

asbestos parece levar ao acúmulo de células em G2/M. O presente estudo tem como objetivo verificar a presença de alterações causadas em células em cultura expostas à crisotila por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias. As seguintes alterações foram verificadas em células expostas à crisotila por 48 horas: formação de população de células aneuploides, diminuição de frequência de células em G0/G1, aumento de células em G2/M, aumento do número de células micronucleadas e aumento relativo de células em metáfase quanto à porcentagem de células em fases mais tardias do ciclo celular, como anáfase e telófase. Após 8 dias de recuperação, apenas a frequência de células micronucleadas voltou a ser semelhante a células controle. Por microscopia confocal verificou-se que após 4 dias e 8 dias de recuperação fibras longas de crisotila não estão mais presentes na cultura, e pequenos pontos de fibra são observados raramente após 8 dias de recuperação. Conforme os dados revelaram, a exposição à crisotila leva a alterações que são mantidas na cultura, mesmo após 8 dias de recuperação em meio livre de fibras, e podem estar relacionadas a problemas na divisão celular.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONALDO, M. F.; PESTANO, C. B; RIBEIRO, M. C.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; MORI, L.; OLIVEIRA, A. R. Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. **Cell Biol. Int. Rep.**, 15(3): 229-241, 1991.

BRODY, A. R.; OVERBY, L. H. Incorporation of tritiated thymidine by epithelial and interstitial cells in bronchiolar-alveolar regions of asbestos-exposed rats. **Am. J. Pathol.**, 134: 133-144, 1989.

BRODY, A. R.; LIU, J.; BRASS, D.; CORTI, M. Analyzing the Genes and Peptide Growth Factors Expressed in Lung Cells in Vivo Consequent to Asbestos Exposure and in Vitro. **Environ. Health Perspect.**, 105(5): 1165-1171, 1997.

BURMEISTER, B.; SCHWERDTLE, T.; POSER, I.; HOFFMANN, E.; HARTWIG, A.; MÜLLER, W. U.; RETTENMEIER, A. W.; SEEMAYER, N. H.; DOPP, E. Effects of asbestos on initiation of DNA damage, induction of DNA-strand breaks, P53-expression and apoptosis in primary, SV40-transformed and malignant human mesothelial cells. **Mutat. Res.**, 558(1-2): 81-92, 2004.

CORTEZ, B. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. **BMC Cancer**, 8:181, 2008.

DOPP, E.; SCHULER, M.; SCHIFFMANN, D.; EASTMOND, D. A. Induction of micronuclei, hyperdiploidy and chromosomal breakage affecting the centric/pericentric regions of chromosomes 1 and 9 in human amniotic fluid cells after treatment with asbestos and ceramic fibers. **Mutation Res.**, 377:77-87, 1997.

DOPP, E.; YADAV, S.; ANSARI, F. A.; BHATTACHARYA, K.; VON RECKLINGHAUSEN, U.; RAUEN, U.; RODELSPERGER, K.; SHOKOUHI, B.; GEH, S.; RAHMAN, Q. ROS-mediated genotoxicity of asbestos-cement in mammalian lung cells in vitro. **Part. Fiber Toxicol.**, 2:9, 2005.

DOXSEY, S. J.; ZIMMERMAN, W.; MIKULE, K. Centrosome control of the cell cycle. **Trends Cell Biol.**, 15: 303-311, 2005.

FUKASAWA, K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. **Cancer Letters**, 230: 6–19, 2005.

KAPLAN, K. B.; BURDS, A. A.; SWEDLOW, J. R.; BEKIR, S. S.; SORGER, P. K.; NATHKE, I. S. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. **Nat. Cell Biol.**, 3(4): 429–432. 2001.

LEVRESSE, V.; RENIER A.; FLEURY-FEITH, J.; LEVY, F.; MORITZ, S.; VIVO, C., JAURAND, M. C. Analysis of Cell Cycle Disruptions in Cultures of Rat Pleural

Mesothelial Cells Exposed to Asbestos Fibers. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 17:660–671, 1997.

LIU, S. T.; HITTLE, J. C.; JABLONSKI, S. A.; CAMPBELL, M. S.; YODA, K.; YEN, T. J. Human CENP-I specifies localization of CENP-F, MAD1 and MAD2 to kinetochores and is essential for mitosis. **Nat. Cell Biol.**, 5(4): 341–345, 2003.

MACHADO–SANTELLI, G. M; MORI, L.; PEREIRA, C. A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Anal Cell. Pathol.**, 7(4):321-34, 1994.

OKAYASU, R.; TAKAHASHI, S.; YAMADA, S.; HEI, T. K.; ULLRICH, R. Asbestos and DNA double strand breaks. **Cancer Res.**, 59: 298-300, 1999.

WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D. W. Aneuploidy: Instigator and Inhibitor of Tumorigenesis. **Cancer Res.**, 67(21): 10103-10105, 2007.

QUINLAN, T. R.; BERUBE, K. A.; MARSH, J. P.; JANSSEN, Y. M. W.; TAISI, P.; LESLIE, K. O.; HEMENWAY, D.; O'SHAUGHNESSY, P. T.; VACEK, P.; MOSSMAN, B. T. Patterns of inflammation, cell proliferation, and related gene expression in lung after inhalation of chrysotile asbestos. **Am. J. Pathol.**, 147:729-739, 1995.

SUZUKI, K.; HEI, T. K. Induction of heme oxygenase in mammalian cells by mineral fibers: distinctive effect of reactive oxygen species. **Carcinogenesis**, 17(4):661-667, 1996.

CAPÍTULO III

ABSTRACT

Cells exposed to asbestos fibers for 4 to 72 h show several alterations, such as cytoplasmatic vacuoles, bi and multinucleated cells, micronucleus and multipolar

mitosis. The cell-fiber interaction observed by high-resolution time-lapse microscopy evidenced many internalized fibers, and these fibers can interfere on cell division and lead to cytokines failure. The cytokinesis failure is a process that lead to tetraploid cells with duplicated centrosomes formation, and recent studies are demonstrating others mechanisms that cause centrosome duplication and amplification. DNA damage caused by irradiation or defects on the replication and repair machinery leads to centrosome amplification, and then to mitoses with multipolar spindles. Aberrant mitosis are related to aneuploid cell formation once multipolar spindles lead to chromosome segregation errors and cell divisions resulting in more than 2 cells. In the present study, DNA vectors for the expression of tubulins fused to fluorescent proteins were constructed, and the conditions for cells transfection and image acquisition for time-lapse microscopy were established. The transfection of HK2 cells with the plasmid EGFP- γ tubulin generated heterogeneous cells population when considered the presence and number of centrosomes. However, the transfection with GFP- α tubulin e RFP- α tubulin plasmids generated cells with the microtubules dynamic and distribution very similar to control cells, and permitted the visualization of microtubules during interphase and mitotic live cells. The fate of some multipolar metaphases was observed: cell retention on metaphase, cell cycle progression generating two or three daughter cells, cell fusion during cytokinesis or during telophase after a multipolar anaphase, and cell death. The centrosome amplification was not observed during the M phase of cell cycle, and may occur in interphase, and also despite cell fusion.

RESUMO

Diversas alterações celulares já foram descritas em células expostas ao asbesto de 4 horas a 72 horas, como vacúolos citoplasmáticos, células bi e multinucleadas, células micronucleadas e mitoses multipolares. A observação da interação de fibras de amianto e células em cultura por *time-lapse* de grande resolução, adquirindo imagens de contraste de fase, permitiu a visualização de fibras internalizadas interferindo na divisão mitótica e levando à regressão da citocinese. A regressão da citocinese seria uma das causas da formação de células com conteúdo de DNA e centrossomos duplicados, e hoje estudos vêm demonstrando outros mecanismos que provocam a duplicação e amplificação centrossômica. Danos ao material genético causados por irradiação ou falha na maquinaria de replicação ou reparo de DNA são descritos por levarem à amplificação centrossômica, esta causando a formação de mitoses multipolares que, devido a erros na segregação cromossômica, geram células aneuploides. No presente estudo foram construídos vetores para expressão de tubulinas fusionadas a proteínas fluorescentes RFP e GFP, padronizadas as condições de transfecção e de aquisição de imagens para que as células tratadas com crisotila fossem observadas por *time-lapse*. A transfecção de células HK2 com o plasmídeo EGFP- γ tubulina levou à formação de populações muito heterogêneas em relação à presença de centrossomos. Já a transfecção das células com os plasmídios GFP- α tubulina e RFP- α tubulina gerou células com a rede de microtúbulos muito semelhante à de células controle, e a dinâmica dos microtúbulos pode ser observada em células interfásicas e mitóticas vivas. Alguns destinos de mitoses multipolares causadas pelo tratamento com crisotila foram observados, como morte em metáfase, divisão gerando duas ou três células filhas, fusão de células durante a telófase e retenção em metáfase. O aumento do número de centrossomos pode ser consequência de amplificação inicialmente em células interfásicas, ou devido à fusão de células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMÉ, J. C.; FOUQUEREL, E.; GAUTHIER, L. R.; BIARD, D.; BOUSSIN, F. D.; DANTZER, F.; MURCIA, G.; SCHREIBER, V. Radiation-induced mitotic catastrophe in PARGdeficient cells. **J. Cell Sci.**, 122(12): 1990-2002, 2009.

BARR, A. R.; GERGELY, F. MCAK-Independent Functions of ch-Tog/XMAP215 in Microtubule Plus-End Dynamics. **Mol. Cel. Biol.**, 28: 7199–7211, 2008.

BEY, E.; HARINGTON, J. S. Cytotoxic effects of some mineral dusts on Syrian hamster peritoneal macrophages. **J. Exp. Med.**, 133(5): 1149-69, 1971.

BONALDO, M. F.; PESTANO, C. B; RIBEIRO, M. C.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; MORI, L.; OLIVEIRA, A. R. Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. **Cell Biol. Int. Rep.**, 15(3): 229-241, 1991.

BOROJERDI, J. P.; MING, J.; COOCHA, C.; WARD, Y.; SEMINO-MORA, C.; YU, M.; BRAUN, H. M.; TAYLOR, B. J.; POIRIER, M. C.; OLIVERO, O. A. Centrosomal amplification and aneuploidy induced by the antiretroviral drug AZT in hamster and human cells. **Mutat. Res.**, 665: 67–74, 2009.

BOURKE, E.; DODSON, H.; MERDES, A.; CUFFE, L.; ZACHOS, G.; WALKER, M.; GILLESPIE, D.; MORRISON, C. G. DNA damage induces Chk1-dependent centrosome amplification. **EMBO Reports**, 8: 603-609, 2007.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802–805, 1994.

CORTEZ, B. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. **BMC Cancer**, 8:181, 2008.

DODSON, H.; BOURKE, E.; JEFFERS, L. J.; VAGNARELLI, P.; SONODA, E.; TAKEDA, S. *et al.*, Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM, **Eur. Mol. Biol. Org. J.**, 23: 3864–3873, 2004.

DODSON, H.; WHEATLEY, S. P; MORRISON, C. G. Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe. **Cell Cycle**, 6: 364-370, 2007.

DOXSEY, S. J.; ZIMMERMAN, W.; MIKULE, K. Centrosome control of the cell cycle. **TRENDS Cell Biol.**, 15: 303-311, 2005.

FORGUES, M.; DIFILIPPANTONIO, M. J.; LINKE, S. P.; RIED, T.; NAGASHIMA, K.; FEDEN, J.; *et al.*, Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. **Mol.Cell.Biol.**, 23: 5282–5292, 2003.

FUKASAWA, K.; CHOI, T.; KURIYAMA, R.; RULONG, S.; VAN DE WOUDE, G. F. Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. **Science**, 271: 1744-7, 1996.

FUKASAWA, K.. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. **Cancer Letters**, 230: 6–19, 2005.

GANEM, N. J.; GODINHO, S. A.; PELLMAN, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. **Nature**, 409: 278-283, 2009.

GALLANT, P.; NIGG, E. A. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. **J. Cell Biol.**, 117: 213-24, 1992.

GUIDUCCI, C.; CERONE, M. A., BACCHETTI, S. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. **Oncogene**, 20: 714–725, 2001.

HESTERBERG, T. W.; BARRET, J. C. Induction by asbestos fibers of anaphase abnormalities: Mechanism for aneuploidy induction and possibly carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 6: 473-475, 1985.

HINCHCLIFFE, E. H.; CASSELS, G. O.; RIEDER, C. L.; SLUDER, G. The coordination of centrosome reproduction with nuclear events of the cell cycle in the sea urchin zygote. **J. Cell Biol.**, 140: 1417–1426, 1998.

HORNICK, J. E.; BADER, J. R.; TRIBBLE, E. K.; TRIMBLE, K.; BREUNIG, J. S.; HALPIN, E. S.; VAUGHAN, K. T.; HINCHCLIFFE, E. H. Live-cell analysis of mitotic spindle formation in taxol-treated cells. **Cell Motil. Cytoskeleton**, 65:595-613, 2008.

HOWARD, J.; HYMAN, A. A. Microtubule polymerases and depolymerases. **Cur. Opin. Cell Biol.**, 19: 31–35, 2007.

HUT, H. M.; LEMSTRA, W.; BLAAUW, E. H.; VAN CAPPELLEN, G. W.; KAMPINGA, H. H.; SIBON, O. C. Centrosomes Split in the Presence of Impaired DNA Integrity during Mitosis. **Mol. Biol. Cell**, 14: 1993–2004, 2003.

JESEN, C. G.; JESEN, L. C. W.; RIEDER, C. L.; COLE, R. W.; AULT, J. G. Long crocidolite asbestos fibers cause polyploidy by sterically blocking cytokinesis. **Carcinogenesis**, 17: 2013–2021, 1996.

JESEN, C. G.; WATSON, M. Inhibition of cytokinesis by asbestos and synthetic fibers. **Cell Biology International**, 23(12): 829-840, 1999.

KERYER, G.; RIS, H.; BORISY, G. G. Centriole distribution during tripolar mitosis in Chinese hamster ovary cells. **J. Cell Biol.**, 98: 2222–2229, 1984.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle do not require microtubules. **J. Cell Biol.**, 146: 585–596, 1999.

KHODJAKOV, A.; COPENAGLE, L.; GORDON, M. B.; COMPTON, D. A.; KAPOOR, T. M. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. **J. Cell Biol.**, 160: 671-683, 2003.

HYMAN, A. A. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. **Nat. Cell Biol.**, 2:13-9, 2000.

LEVRESSE, V.; RENIER, A.; FLEURY-FEITH, J.; LEVY, F.; MORITZ, S.; VIVO, C.; JAURAND, M. C. Analysis of cell cycle disruptions in cultures of rat pleural mesothelial cells exposed to asbestos fibers. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 17: 660-671, 1997.

MACCORKLE, R. A.; SLATTERY, S. D.; NASH, D. R.; BRINKLEY, B. R. Intracellular Protein Binding to Asbestos Induces Aneuploidy in Human Lung Fibroblasts. **Cell Motil. Cytoskeleton**, 63: 646-657, 2006.

MERALDI, P.; HONDA, E.; NIGG, E. A. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. **EMBO J.**, 21: 483-492, 2002.

PELIN, K.; KIVIPENSAS, P.; LINNAINMAA, K. Effects of asbestos and man-made vitreous fibers on cell division in cultured human mesothelial cells in comparison to rodent cells. **Environ. Molec. Mutagen.**, 25: 118-125, 1995.

RUSAN, N. M.; FAGERSTROM, C. J.; YVON, A. C.; WADSWORTH, P. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-a tubulin. **Mol. Biol. Cell**, 12: 971-980, 2001.

SALADINO, C.; BOURKE, E.; CONROY, P. C.; MORRISON, C. G. Centriole separation in DNA damage-induced centrosome amplification. **Environ. Mol. Mutagen.**, 50: 725-732, 2009.

STRAIGHT, A. F.; MARSHALL, W. F.; SEDAT, J. W.; MURRAY, A. W. Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate. **Science**, 277: 574-578, 1997.

TOURNEBIZE, R.; POPOV, A.; KINOSHITA, K.; ASHFORD, A. J.; RYBINA, S.; POZNIAKOVSKY, A.; MAYER, T. U.; WALCZAK, C. E.; KARSENTI, E.; WALKER, C.; EVERITT, J.; BARRETT, J. C. Possible cellular and molecular mechanisms of asbestos carcinogenicity. **Am. J. Ind. Med.**, 21: 253-273, 1992.

WEAVER, B. A.; CLEVELAND, D. W. The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. **Cancer Cell.**, 14: 431-433, 2008.