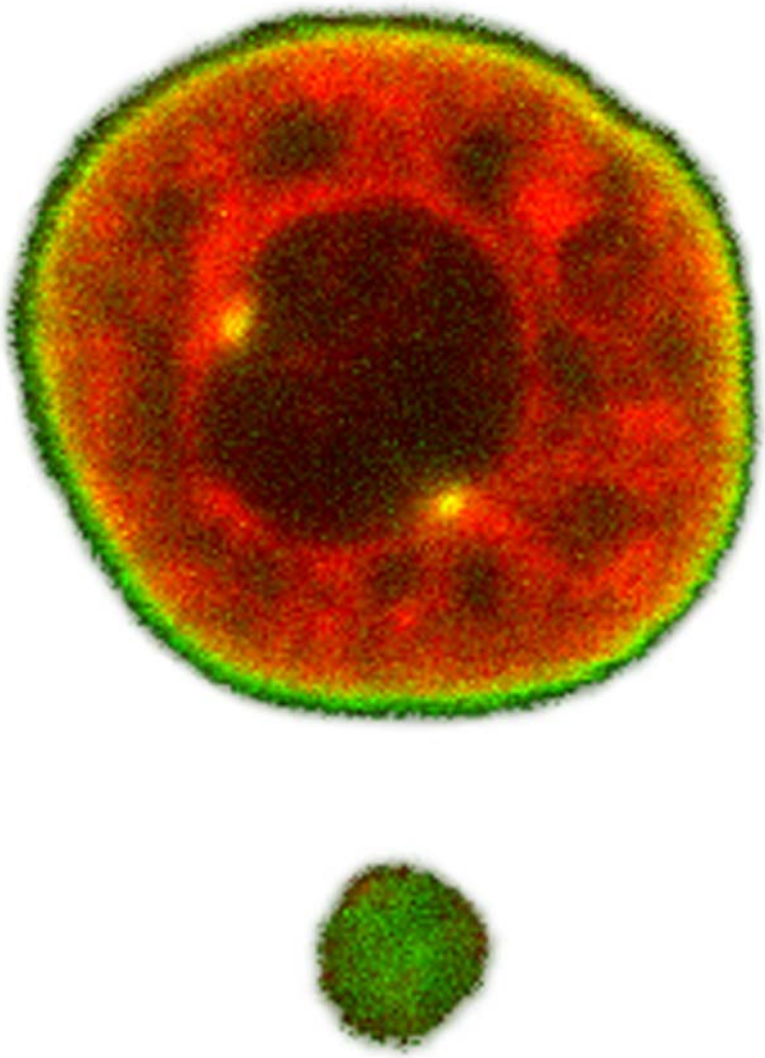
VIVIANE MIRANDA DIAS

Micronúcleos em células tumorais: biologia e implicações para a tumorigênese



SÃO PAULO | 2006

Viviane Miranda Dias

Micronúcleos em células tumorais: biologia e implicações para a tumorigênese

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Genética e Biologia Evolutiva.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Gláucia Maria Machado-Santelli

São Paulo

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa de dissertação de mestrado, em sessão pública, realizada a ...../...../....., considerou:

( ) Aprovado (a) ( ) Reprovado (a)

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).
Orientador(a)

Aos meus pais, Anízio e Fátima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha amada família e pelas oportunidades que colocou em meu caminho. Agradeço também:

À Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli pela acolhida carinhosa em seu laboratório, pela paciência, orientação, incentivo e apoio incondicionais. Agradeço por me fazer acreditar e confiar em meu trabalho.

Aos meus pais, Anízio e Fátima, pelo amor, carinho, ensinamentos e apoio em todos os meus projetos de vida. Agradeço por me transmitirem, desde criança, valores que levarei comigo para sempre.

À Nívea, minha irmã querida, pelo apoio e amizade.

Ao Tio Maurício e à Mônica, sempre orgulhosos de suas sobrinhas, por terem dado a nós duas preciosidades: Milena e Matheus.

À toda minha enorme família mineira, incluindo meus avós tão amados, que mesmo sem entender direito o que faço, sempre torceram e me apoiaram carinhosamente.

À Elly, grande amiga e parceira nas dúvidas e discussões científicas (ou não...), por agüentar meus desabafos e crises de desespero, sempre me apoiando e acreditando em mim. Agradeço também por toda ajuda com meus experimentos e dados.

Ao Evandro, “riquinho”, pela amizade e ajuda, pelas longas conversas de fim de tarde, pelas risadas e gargalhadas.

À Nara, tão querida, grande amiga, pela confiança e amizade e por me ensinar “gauchês”.

À Marisa Ionta, que sempre me acompanhou, disposta a me ajudar quando mais precisei, além de me ouvir durante minhas crises de insegurança.

À Renata Manelli, que me acolheu no laboratório e ensinou muito do que aprendi no BioCeM.

À Sandra e Bia Cortez, pela ajuda com o texto e hibridizações *in situ*.

Aos amigos do BioCeM: Raphael, Bia Bradão, Marcel, Mingau, Flávia, Jonâtas (e seus amigos...), Fábio, Alê, Raquel, Fernando, Marisa Rangel, Nancy, Stefânia, Ricardo, Marisinha, Bruna, Paula (especialmente pelo auxílio com a impressão), Amanda e Egle.

Ao Roberto Cabado Modia, pelas longas horas ao microscópio confocal e precioso auxílio na preparação da capa.

Ao Edson Rocha de Oliveira pelo esmero na revelação das fotomicrografias.

À Yukie Sato, minha eterna memória acessória, pela companhia nas crises de compras em Monte Sião. À Tais Machado, por me acordar nas aulas de licenciatura. Agradeço a ambas, por todo apoio, pelas risadas e momentos divertidos. E, claro, pelas tapiocadas no Alaor.

À Vivian, grande amiga, pela companhia nas baladas e por nunca desistir de me arrastar para a academia, embora fosse em vão.

Às eternas amigas do magistério, Débora, Fabiana e Rosana, pelos momentos de descontração nesse período difícil e pela amizade de tantos anos.

Aos amigos da BD, especialmente à Ivonete e ao Arthur, por compreenderem minhas necessidades nesse período final.

Ao pessoal da Secretaria de Pós Graduação do IB-USP, especialmente à Érika, Helder, Tereza e Vera Lúcia sempre dispostos a auxiliar no que fosse possível.

Às meninas da Secretaria de Pós Graduação do Departamento de Biologia e Genética Evolutiva, Deisy e Helenice, pela ajuda e atenção.

Ao pessoal da Biblioteca do Instituto de Biociências.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB.

À FAPESP pela bolsa de mestrado. Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO..... 09

ABSTRACT..... 10

1 INTRODUÇÃO..... 11

2 OBJETIVOS..... 29

3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 31

3.1 Linhagem celular e condições de cultura..... 32

3.2 Curva de crescimento..... 32

3.3 Tratamento hipotérmico..... 33

3.4 Índice mitótico..... 33

3.4.1 Iodeto de propidio..... 33

3.4.2 Imunofluorescência para histona H3 fosforilada..... 34

3.5 Incorporação e detecção de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)..... 35

3.6 Determinação da duração de G2 pelo método das mitoses marcadas..... 35

3.7 Determinação da duração da fase S e do ciclo todo pela incorporação de BrdU..... 36

3.8 Avaliação inicial do efeito da vincristina..... 36

3.9 Sincronização de células em mitose pela associação de métodos (duplo bloqueio)..... 37

3.10 Imunofluorescência para lamina B..... 38

3.11 Imunofluorescência para tubulina..... 38

3.12 Hibridização fluorescente *in situ* para EGFR..... 39

3.12.1 Seqüenciamento de DNA..... 39

3.12.2 Preparação da sonda e reações de hibridização..... 41
3.13 Análise por microscopia confocal de varredura a laser..... 42
3.14 Análise estatística..... 43
4 RESULTADOS..... 45
4.1 Curva de crescimento e caracterização da linhagem celular..... 46
4.2 Efeito da hipotermia sobre o ciclo celular..... 48
4.3 Caracterização do ciclo celular..... 61
4.4 Avaliação do efeito do duplo bloqueio em células A549..... 70
4.5 Caracterização de elementos do citoesqueleto..... 86
4.5.1 Microtúbulos e filamentos de actina..... 86
4.5.2 Lamina B..... 86
4.6. Cinética de surgimento de micronúcleos em células sincronizadas.. 91
4.7 Caracterização do conteúdo dos micronúcleos..... 102
5 DISCUSSÃO..... 104
6 CONCLUSÕES..... 129
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 131

RESUMO

Micronúcleos são estruturas constituídas por material cromatínico contido por um envoltório nuclear e menores que o núcleo principal. Apesar do amplo uso do teste do micronúcleo na avaliação do potencial genotóxico de diversas substâncias, os trabalhos cujas preocupações sejam elucidar o mecanismo de formação dessas estruturas, seu conteúdo e a fase do ciclo celular em que surgem, são raros. O objetivo do presente trabalho foi estudar a cinética de surgimento de micronúcleos em células A549, provenientes de carcinoma de pulmão humano, submetidas à sincronização. Após duplo bloqueio por ausência de soro fetal bovino e adição de vincristina ao meio, o surgimento de micronúcleos foi acompanhado com o auxílio de um marcador para fase S. Os resultados obtidos indicam que micronúcleos podem surgir tanto durante a mitose quanto na intérfase e possuem capacidade de replicação de DNA, independentemente do núcleo principal. A capacidade de escapar ao duplo bloqueio permite sugerir que o ponto de checagem de ligação ao fuso mitótico em A549 não é funcional. Também foram observadas seqüências amplificadas de EGFR no interior dos micronúcleos. A interpretação do significado dos micronúcleos é importante para a definição de sua relação com a expulsão de oncogenes em células tumorais ou de outras seqüências amplificadas.

ABSTRACT

Micronuclei are structures composed by chromatin material contained in the nuclear envelope and smaller than the main nucleus. Micronucleus test has been widely used in the genotoxic potential evaluation of different compounds. Although a few report concerning on the mechanism of micronucleus genesis, its DNA sequences content and the cell cycle phase when they arise. The aim of this work was to analyze the kinetic of micronuclei in A549 cells from human lung carcinoma submitted to cell cycle synchronization. After double blocking by fetal bovine serum deprivation and vincristine treatment, micronucleus formation was monitored with a S-phase marker. The results have showed that both in the mitosis and in the interphasic phase, micronuclei may arise and they were able to replicate its DNA. This process seemed to be independent of main nucleus. Cellular ability to escape from double blocking suggests that mitotic spindle checkpoint in A549 is not functional. Moreover, EGFR sequences were detected into the micronucleus. It is important to elucidate the micronucleus meaning to describe precisely its association with elimination of oncogene or other amplified sequences from the tumor cells.

Introdução

O número de mortes causadas por neoplasias malignas é preocupante em todo o mundo. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer prevêem que em 2006 mais de 472.000 brasileiros serão afetados por essa doença (INCA, 2005). Na população masculina, os cânceres que mais matam são aqueles que atingem traquéia, brônquios e pulmões, respondendo por 16,35% dos óbitos. Para as mulheres, esses cânceres são responsáveis por 7,91% dos casos de morte, perdendo apenas para o câncer de mama que causa 15,55% do total de mortes (INCA, 2002).

Esta expressiva diferença entre a mortalidade por cânceres de traquéia, brônquios e pulmões em homens e mulheres pode ser explicada pelo hábito de fumar, principal causa desses tumores. Esses dados refletem hábitos passados, uma vez que o câncer, na maior parte das vezes, é uma doença que se manifesta tardiamente. Até algum tempo atrás, o fumo era mais comum entre os homens, conseqüentemente, observa-se maior número de casos de cânceres nos órgão respiratórios na população masculina. Atualmente, verifica-se tendência de maior incidência desses cânceres entre as mulheres em função do aumento no número de fumantes nessa população (INCA, 2002).

A ampla variabilidade das características dos tumores, mesmo de origens idênticas, traz certas dificuldades para a elucidação dos processos envolvidos na aquisição do fenótipo tumoral. Mesmo assim, é possível estabelecer um grupo de características comuns entre os tumores malignos.

Perturbações no controle do ciclo celular são alterações extremamente comuns em células tumorais. Ao longo dos últimos anos, foram descritos vários oncogenes e genes supressores de tumor envolvidos nesse processo (revisões em CLASSON & HARLOW, 2002; OSADA & TAKAHASHI, 2002; VOGELSTEIN & KINZLER, 2004).

De modo geral, produtos de oncogenes e genes supressores de tumor aumentam o número de células tumorais através da sinalização para proliferação e/ou inibição de morte celular. Vários desses genes controlam a progressão do ciclo e codificam proteínas diversas como fatores de transcrição, quinases e ciclinas, as quais atuam, geralmente, em vias integradas (MALUMBRES & BARBACID, 2001; CARNERO, 2002; EASTMAN, 2004). A grande maioria das neoplasias humanas tem mutações em pelo menos um componente regulatório do ciclo celular. Por exemplo, em determinados casos câncer de mama, a ciclina D1 está super expressa (COURJAL *et al.*, 1996; HAN *et al.*, 1998, ARNOLD & PAPANIKOLAU, 2005; CALDON *et al.*, 2006), enquanto em câncer de bexiga (MYIAMOTO *et al.*, 1995), retinoblastoma e osteosarcoma a proteína pRb pode estar inativa (CARNERO, 2002; CLASSON & HARLOW, 2002).

A ativação de oncogenes requer mutação em apenas um dos alelos e, quando mutados, esses genes permanecem ativos em condições nas quais os genes normais não estariam. A amplificação gênica e as mutações pontuais, afetando resíduos importantes para a regulação da atividade da proteína produzida, são duas vias bastante comuns de ativação de

oncogenes. Rearranjos cromossômicos, como translocações, também podem contribuir para a super expressão de proteínas oncogênicas (VOGELSTEIN & KINZLER, 2004).

O complexo ciclina B1/Cdc2 é essencial para a transição G2/M, e, portanto, fundamental para o controle da proliferação celular. Analisando amostras de 77 pacientes por imunohistoquímica, Soria e colaboradores (2002) demonstraram que a ciclina B1 encontra-se super expressa em 22% dos casos de tumores de células não pequenas de pulmão (NSCLC) em estágio I. Pacientes que apresentavam expressão de ciclina B1 em nível mais elevado tinham um período de sobrevida mais curto, quando comparados aos pacientes com baixos níveis. Por isso, os autores sugerem que, além do funcionamento anômalo em câncer de pulmão, a ciclina B1 está associada ao prognóstico de pacientes em estágios iniciais da doença. Pelo envolvimento dessa ciclina na progressão deste e de outros tipo de tumores, sugere-se que ela atue como uma proteína oncogênica.

Novos genes têm sido identificados e relacionados aos mais diversos tumores e, além do envolvimento em controle de ciclo, eles fazem parte de outros processos celulares. Em trabalho recente, Wu e colaboardores (2005) verificaram que doze linhagens celulares de tumor de bexiga apresentam super expressão do gene *ID4*. Outros genes localizados na mesma região que *ID4*, 6p22.3, também são super expressos. No entanto, quando tecidos tumorais de bexiga foram analisados, os autores não observaram os mesmos padrões de expressão obtidos nas linhagens celulares. *ID4* é um candidato a

oncogene por estar envolvido em tumores mamários e por interferir na via de diferenciação celular, bloqueando fatores de transcrição e proteínas como a RB1.

Ensaios com camundongos mostrararam que os genes da família RUNX desenvolvem importante papel na hematopoiese, osteogênese e neurogênese. As proteínas codificadas por eles são centrais nas vias que regulam crescimento e diferenciação celular. Esses mesmos genes têm sido encontrados hipermetilados em cânceres de origem epitelial. De modo interessante, podem atuar como oncogenes ou genes supressores de tumor dependendo do contexto. Por exemplo, camundongos *knockout* para *Runx3* têm maior incidência de hiperplasias gástricas, evidenciando o papel supressor desse gene. Por outro lado, camundongos transgênicos expressando *Runx2* desenvolvem linfomas, indicativo de seu potencial oncogênico (BLYTH *et al.*, 2005).

Mutações em genes supressores de tumor implicam em redução na quantidade ou atividade do produto gênico, como demonstrado pela atividade do gene FEZ1/LZTS1 em tumores de bexiga. Este gene encontra-se em 8p22, uma região cromossômica ausente em diversos tumores humanos, inclusive o de bexiga (VECCHIONE *et al.*, 2002). Em trabalho semelhante ao de Wu *et al.* (2005), Vecchione e colaboradores (2002) analisaram a expressão da proteína Fez1 em cinco linhagens celulares derivadas do carcinoma mais comum de bexiga e em 60 tumores primários do mesmo tipo. As análises através de imunohistoquímica mostraram que 62% dos tumores

primários apresentavam redução ou ausência na expressão de Fez1. Dentre as cinco linhagens celulares testadas, quatro também apresentavam expressão ausente ou reduzida da mesma proteína. Os efeitos da restauração da atividade de Fez1 foram verificados através da introdução de um vetor adenoviral em células que não expressavam a proteína e que, após a infecção, passaram a expressá-la. Os resultados obtidos mostraram que houve inibição de crescimento celular e parada das células em G2/M. Posteriormente, os autores demonstraram que Fez1 interage com a proteína cdc2, além de diminuir a tumorigenicidade de uma das linhagens de carcinoma de bexiga. Portanto, tomando-se o conjunto de evidências do trabalho, Vecchione e colaboradores (2002) mostraram que Fez1 está envolvida na progressão do carcinoma de bexiga e poderia ser utilizada como um marcador molecular no diagnóstico destes tumores.

O gene p53, localizado em 17p13.1, é um supressor de tumor muito estudado, uma vez que a proteína codificada por ele pode alterar respostas de diversas vias. Algumas de suas principais funções são atrasar o ciclo celular e permitir que o DNA seja reparado quando houve dano, ou disparar as vias de apoptose, impedindo que a célula danificada contribua para a formação de um tumor (EASTMAN, 2004). Está mutado em 80-90% dos carcinomas de pulmão de células pequenas e em aproximadamente 50% dos carcinomas de células não-pequenas (MITSUUCHI & TESTA, 2002; PANANI & ROUSSOS, 2005).

O gene RhoB também encontra-se mutado em grande número de carcinomas de pulmão, como mostraram Mazieres e colaboardores (2004). Os autores analisaram dois conjuntos independentes de amostras de tumores de pulmão, um deles originário da França e o outro dos Estados Unidos. Os estudos por imunohistoquímica demonstraram que a proteína RhoB estava ausente em 96% dos carcinomas invasivos analisados e nos 4% restantes, a marcação para RhoB era bastante fraca. Os autores também observaram forte correlação entre a perda da expressão desta proteína e a progressão do tumor de pulmão. Estes dados sugerem que RhoB teria um papel supressor no desenvolvimento de tumores, assim a expressão forçada desta proteína deveria dificultar a aquisição de um fenótipo maligno. Para avaliar esta possibilidade, um vetor contendo a seqüência gênica de RhoB foi inserido em células A549 e os clones transfectados com sucesso foram isolados. Nestes clones, a taxa de crescimento e a capacidade de ancoragem foram significativamente diminuídas em relação aos clones transfectados com o vetor vazio. Células expressando RhoB foram injetadas em camundongos e os autores verificaram que tumores de menor tamanho desenvolveram-se nos animais injetados com as células A549 contendo o vetor vazio. Estes dados, além de outros apontados por Mazieres e colaboradores (2004), indicam que RhoB é um gene supressor de tumor em carcinomas de pulmão. Além de estar envolvido em controle de proliferação celular, RhoB também desempenha papel na organização do citoesqueleto

de actina, transcrição de genes de metaloproteínas, metabolismo de fosfolipídios e transporte vesicular.

Segundo alguns autores, é possível também classificar os genes envolvidos em câncer, em “genes de estabilidade”, que incluem aqueles responsáveis pelo reparo de erros durante a replicação normal do DNA ou de erros induzidos pela exposição a agentes mutagênicos. Quando estão inativados, há um aumento na taxa de mutação de outros genes, como os supressores de tumor, contribuindo para o processo de tumorigênese (VOGELSTEIN & KINZLER, 2004).

Uma característica marcante em tumores diz respeito ao citoesqueleto. Células normais possuem uma rede bem organizada de microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários, enquanto nas tumorais essa rede é reduzida ou desorganizada. Manelli-Oliveira & Machado-Santelli (2001) mostraram que células HK2, derivadas de tumor de pulmão humano inoculado em ratos atímicos, apresentam alteração no padrão de distribuição de filamentos de actina e tubulina, quando comparadas a células normais.

Anormalidades na morfologia nuclear também são encontradas freqüentemente em células neoplásicas, incluindo variações no tamanho e forma dos núcleos, além de estruturas anormais de cromatina. Estas anormalidades nucleares são, inclusive, utilizadas no diagnóstico do câncer. Gisselsson *et al.* (2001), confirmaram que há relação entre a morfologia nuclear e instabilidade cromossômica em células tumorais. Utilizando técnicas moleculares e citogenéticas, os autores verificaram que cerca de

80% dos tecidos tumorais estudados apresentavam estruturas nucleares anormais, inclusive brotos nucleares e micronúcleos contendo material cromossômico instável, como cromossomos dicêntricos e em anéis.

Boveri (1914, *apud* MASUDA & TAKAHASHI, 2002), foi um dos primeiros pesquisadores a fazer uma associação entre mitoses anormais, alterações cromossômicas e a presença de características malignas em células de mamíferos. Algum tempo depois, outras evidências suportaram a hipótese de Boveri, como por exemplo, a constante presença de um cromossomo marcador em leucemia mielóide crônica. Esse cromossomo, denominado Filadélfia, é formado a partir de translocação entre os cromossomos 9 e 22 (NOWELL & HUNGERFORD, 1960, *apud* RANDOLPH, 2005).

A presença de instabilidade cromossômica em tumores também traz implicações para o tratamento da doença. Em um mesmo tumor é comum a presença de diversas populações celulares com diferentes alterações cariotípicas; isso aumentaria as chances de pelo menos uma dessas populações apresentar características que permitam a elas não responderem bem às terapias convencionais.

Vários mecanismos podem contribuir para a instabilidade cromossômica ou genética de uma célula. Dentre eles estão a perda de controle do ciclo celular, defeitos na resposta a dano de DNA e falhas mitóticas. Falhas nos pontos de checagem mitóticos permitem a propagação de cariótipos com número cromossômico alterado. Em condições normais,

esse sistema de monitoramento pára o ciclo de divisão de células que apresentam algum tipo de anormalidade. O ponto de checagem do fuso mitótico é acionado quando algum cinetócoro permanece desligado das fibras do fuso. Se este mecanismo não estiver funcionando corretamente, a mitose pode progredir mesmo na presença de cromossomos não ligados ao fuso, causando alterações numéricas nas células-filhas. Mais de 40% das linhagens celulares originadas a partir de tumores de pulmão apresentam algum tipo de alteração neste ponto de checagem (MASUDA & TAKAHASHI, 2002).

As alterações cromossômicas estruturais são consideradas um tipo de instabilidade. Entre 70% e 80% dos tumores de pulmão são portadores desse tipo de alteração, que inclui deleções, inserções e translocações (BALSARA & TESTA, 2002; MASUDA & TAKAHASHI, 2002; MITSUUCHI & TESTA, 2002; PANANI & ROUSSOS, 2005). Alguns dos mecanismos que podem contribuir para o surgimento dessas anormalidades são as quebras na dupla fita de DNA que não são corrigidas por falhas em pontos de checagem, e os ciclos de quebra-fusão-ponte que podem originar pontes anafásicas e cromossomos dicêntricos, altamente instáveis durante a mitose (RESHMI & GOLLIN, 2005).

Disfunções teloméricas são importante fonte de alterações cromossômicas estruturais. Os telômeros são responsáveis pela manutenção da estabilidade genômica, pois protegem as pontas dos cromossomos contra o encurtamento em cada replicação e também contra a possibilidade de se

tornarem coesivas (BLACKBURN & CHALLONER, 1984). Na ausência do ponto de checagem TP53 funcional, células com telômeros encurtados podem escapar à apoptose e os cromossomos com pontas agora coesivas podem se fundir, originando cromossomos dicêntricos. Durante a anáfase esses cromossomos podem se quebrar e formar fragmentos cromossômicos aleatórios. Como resultado, as células-filhas apresentarão alterações cromossômicas estruturais (GOLLIN, 2005; RESHMI & GOLLIN, 2005).

As alterações cromossômicas numéricas também são consideradas manifestação de instabilidade. Normalmente, células tumorais são aneuplóides, ou seja, possuem número cromossômico alterado, por perda ou ganho de cromossomos através de diversos mecanismos (JALLEPALLI & LENGAUER, 2001; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002; BHARADWAJ & YU, 2004). Nas células tumorais, a aneuploidia pode ocorrer por alterações durante a mitose. Essa fase da divisão celular envolve um complexo conjunto de alterações como quebra do envelope nuclear, rearranjo da rede de microtúbulos, condensação e migração dos cromossomos. Portanto, falhas em genes responsáveis por codificar proteínas envolvidas em qualquer passo da segregação cromossômica poderiam contribuir para o desenvolvimento de instabilidade cromossômica.

O funcionamento anormal dos centrossomos deve estar relacionado à aneuploidia comumente observada em células neoplásicas já que muitos tumores apresentam aberrações centrossômicas estruturais e numéricas (NIGG, 2002). Número alterado de centríolos ou centrossomos tem sido

observado com freqüência em células de câncer oral, como mostra o trabalho de Saunders e colaboradores (2000). De acordo com esses autores, os cromossomos destas células não alinham-se corretamente na placa metafásica e também apresentam problemas na anáfase, incluindo perdas cromossômicas, porque os seus cinetócoros são defeituosos. Eles também observaram a formação de fusos multipolares e outras anormalidades ligadas à presença de número irregular de centríolos. Assim, segregação cromossômica defeituosa, formação de cromossomos dicêntricos e ciclos de quebra-fusão-ponte, entre outros, seriam causas de instabilidade genética no sistema estudado (SAUNDERS *et al.*, 2000).

Em recente revisão, Yuen e colaboradores (2005) discutem o papel dos cinetócoros e sua possível ligação com o surgimento e progressão de tumores. O cinetócoro é constituído por seqüências de DNA repetitivas associadas a proteínas. Estima-se que pelo menos 100 proteínas diferentes façam parte desta estrutura. Os autores relatam trabalhos sugerindo que a super expressão de componentes do cinetócoro contribuiriam para o surgimento de tumor por estimular a instabilidade cromossômica. No entanto, é preciso observar estes resultados com cautela, pois ainda são necessários mais trabalhos funcionais em linhagens celulares ou modelos animais para desvendar a real relação entre disfunções no cinetócoro e o desenvolvimento de câncer.

Utilizando anticorpos para pericentrina, α-tubulina e γ-tubulina, Sato e colaboradores (2001) mostraram que centrossomos anormais quanto ao

tamanho, forma e número estão relacionados a aneuploidização de várias linhagens tumorais de pâncreas humano. A instabilidade cromossômica em tumores pancreáticos pode ser causada por alterações no funcionamento dos centrossomos.

Até algum tempo atrás, alguns pesquisadores ainda resistiam em aceitar o envolvimento das instabilidades cromossômicas no surgimento e progressão de um tumor. No entanto, um substancial corpo de evidências mostra que essa relação, de fato, existe. Entre elas está a observação de que pacientes com aneuploidias congênitas têm predisposição a determinados cânceres e também a constatação de que em cânceres familiais há freqüentes perdas de genes supressores de tumor através de não-disjunção. Além disso, alterações estruturais e numéricas afetam a expressão gênica de maneira global, interferindo em diversos processos celulares ligados ao desenvolvimento de tumores (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2002).

Devido à relevância das instabilidades cromossômicas, é muito importante ter à disposição ferramentas ou biomarcadores que permitam sua detecção. Técnicas como a citometria de fluxo e análise morfométrica de imagem permitem quantificar o DNA de células tumorais e têm demonstrado que há relação entre desvios do contéudo normal de DNA e características clínicas como tipo histológico, prognóstico e sensibilidade às terapias (MASUDA & TAKAHASHI, 2002). A hibridização genômica comparativa e a cariotipagem espectral são técnicas que também possibilitam o estudo de alterações ligadas à instabilidade cromossômica. Assim como as

metodologias mencionadas anteriormente, estas novas abordagens têm mostrado a relação entre instabilidade cromossômica e câncer, inclusive nos carcinomas de pulmão (TAGUCHI *et al.*, 1997; LUK *et al.*, 2001; DAVIES *et al.*, 2005).

A validação de um biomarcador para a predição de câncer depende, segundo Fenech (2002), de três estágios: o desenvolvimento de protocolos padronizados; a determinação da influência dos fatores metodológicos, demográficos, genéticos e de estilo de vida; e os testes em casos-controle. Ainda são necessários estudos a respeito da sensibilidade e especificidade do marcador para predizer o risco de câncer em geral ou de um tipo específico de tumor. O teste do micronúcleo tem sido proposto como mais uma alternativa para a predição do risco de desenvolvimento de tumores, embora a relação entre o micronúcleo e o processo de transformação maligna não tenha sido completamente elucidada.

O micronúcleo é classicamente definido como uma estrutura constituída por material cromatínico contido por um envoltório nuclear, com até 1/3 do diâmetro do núcleo principal de células somáticas interfásicas. Assume-se que se originam por quebras cromossômicas na intérfase, surgindo na mitose seguinte, ou por distúrbios do fuso ou centrômero durante a divisão mitótica. Esta estrutura é bastante útil na detecção de alterações cromossômicas (FENECH, 2002 a, b) e sua utilização como teste foi proposta inicialmente por Hedle (1973) e Schmid (1975). Numa determinada população celular a freqüência de micronúcleos representa um índice

composto de aberrações cromossômicas (OLIVEIRA & MACHADO-SANTELLI, 1987).

O teste do micronúcleo tem sido largamente utilizado na avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e físicos (CHUNG *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2003). Martinez *et al.* (2005) avaliaram o risco da exposição ao arsênico, através do teste do micronúcleo em mucosa oral de uma população chilena, consumidora de água contaminada com o composto, não encontrando freqüência de micronúcleos mais elevada do que no grupo controle.

A genotoxicidade do fansidar, um composto amplamente utilizado no tratamento da malária, foi testada em linfócitos humanos por Abou-Eisha & Afifi (2004). As concentrações testadas consideraram a dosagem usualmente utilizada para tratamento e a quantidade de droga que é acumulada no organismo do paciente durante a terapia. O aumento no número de linfócitos micronucleados, aliado a outros parâmetros verificados, indica que o composto exerce efeitos genotóxicos moderados quando altas concentrações são utilizadas. Diante destes resultados, os autores propõem que o fansidar deve ser utilizado somente quando outros medicamentos não são eficientes.

A influência do estilo de vida na aquisição de danos genéticos também pode ser avaliada com o teste do micronúcleo. Maffei *et al.* (2002) observaram um acréscimo na freqüência de micronúcleos em linfócitos de usuários de álcool e sugerem o uso desse teste em programas de prevenção de câncer. A relação entre o hábito de fumar e a existência de lesões da

cérvice uterina foi investigada em três subpopulações brasileiras por Cerqueira e colaboradores (1998), com o auxílio do teste do micronúcleo. Foi encontrada maior incidência de micronúcleos nos esfregaços de mulheres fumantes e portadoras de lesões de grau mais elevado. Desse modo, é possível afirmar que o hábito de fumar está relacionado ao aumento do dano cromossômico e à progressão de lesões da cérvice uterina.

O teste também tem sido utilizado no biomonitoramento de populações ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos (MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994; LAFFON *et al.*, 2002; MAJER *et al.*, 2003; BOLOGNESI *et al.*, 2004). Enfermeiras expostas a gases anestésicos, como o N_2O, foram monitoradas através do teste de micronúcleo. Neste grupo, os autores observaram um aumento significativo no número de linfócitos micronucleados quando comparado ao grupo de enfermeiras controle (LEWINSKA *et al.,* 2005). Trabalhadores em refinarias de petróleo também estão constantemente expostos a agentes com potencial mutagênico. Roma-Torres *et al.* (2006), verificaram freqüência elevada de micronúcleos, aberrações cromossômicas e danos de DNA em trabalhadores expostos a benzeno, tolueno e xileno em uma refinaria de Portugal, sugerindo que os níveis de exposição dos trabalhadores a estes agentes devem ser reavaliados.

Agentes quimiopreventivos e inibidores de carcinogênese podem ser avaliados pelo teste do micronúcleo (SURH *et al.*, 1999; IZZOTI *et al.*, 2001; ROY *et al.*, 2003). A capacidade quimiopreventiva e antimutagênica do extrato de ginseng foi analisada por Panwar *et al.*, (2005) em ratos albinos. A

administração oral de diferentes doses do extrato de ginseng ocorreu antes da indução de tumores de pele nos animais. Nestes grupos houve significante decréscimo na incidência, número, tamanho e peso dos papilomas em comparação aos animais que não receberam as doses de extrato. Também houve decréscimo no número de células com aberrações cromossômicas e micronúcleos nos grupos que receberam o tratamento prévio. Assim, os parâmetros avaliados, inclusive o teste do micronúcleo, permitem afirmar que o extrato de ginseng possui atividade quimiopreventiva e antimutagênica no organismo estudado.

Em avaliações ecotoxicológicas como as de Llorente *et al.* (2002), Porto *et al.* (2005) e Nigro *et al.* (2006), o teste do micronúcleo também vem ganhando importância. Gauthier e colaboradores (1999) propuseram o uso desse teste em golfinhos para monitorar populações expostas a ambientes contaminados. Cavas *et al.* (2005) comprovaram em peixes os efeitos genotóxico e citotóxico de metais pesados, como cádmio e cobre, observados previamente em mamíferos. Swartz e colaboradores (2003), em estudo com animais de uma região poluída por rejeitos industriais, verificaram que o número de micronúcleos em células sanguíneas de tartarugas correlaciona-se positivamente com os níveis de mercúrio e DDD nos tecidos dos animais. Ensaios envolvendo este tipo de abordagem são bons modelos para a avaliação dos riscos da exposição a fatores ambientais e fornecem subsídios para o potencial efeito sobre a saúde das populações residentes na mesma região e para o manejo dos animais expostos.

Inúmeros trabalhos utilizam o teste do micronúcleo como ferramenta de avaliação, e seu papel nos mais diversos campos do conhecimento científico é incontestável. Apesar disso, há poucos ensaios preocupados em contribuir para a compreensão de pontos relevantes sobre a biologia do micronúcleo. Embora estudos tenham mostrado que a freqüência destas estruturas é mais elevada em linhagens celulares originadas a partir de tumores, ainda não foi estabelecida uma correlação direta entre a formação do micronúcleo e o processo de transformação celular.

Outro aspecto bastante importante e ainda pouco explorado diz respeito ao conteúdo dos micronúcleos. Eles podem conter cromossomos inteiros ou fragmentados em número variável como mostra a revisão de Norppa & Falck (2003). Alguns trabalhos mostram que determinados cromossomos podem ser preferencialmente incorporados aos micronúcleos dependendo da idade e/ou sexo dos pacientes. Entretanto, estes dados ainda são bastante controversos (LEACH & JACKSON-COOK, 2001; NORPPA & FALCK, 2003).

Apesar da importância do teste do micronúcleo, são raros os trabalhos preocupados em elucidar o mecanismo de formação dessas estruturas, seu conteúdo e a fase do ciclo celular em que surgem. Estas informações permitiriam estabelecer a relação entre tumorigênese e a formação do micronúcleo e planejar terapias com o uso de drogas que agem em fases específicas do ciclo, induzindo a formação e expulsão destas estruturas.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de surgimento de micronúcleos em células A549, provenientes de carcinoma de pulmão humano, submetidas a sincronização. Para tal foi necessário:

- determinar qual o método adequado para sincronizar o ciclo celular em mitose;

- analisar o efeito do protocolo de sincronização sobre a população celular;

- analisar a cinética de indução de micronúcleos em células tumorais sincronizadas, utilizando 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) como marcador de fase S.

Materiais e Métodos

3.1 Linhagem celular e condições de cultura

A linhagem celular A549 é proveniente de carcinoma de pulmão de um homem caucasiano de 58 anos e foi caracterizada por Lieber *et al.* (1976). As culturas celulares foram mantidas em garrafas de cultivo com meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco –DMEM (Sigma) , suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e mantidas em estufa a 37ºC, com alta umidade relativa (maior que 90%) e 5% de CO_2. A cada dois ou três dias as células eram subcultivadas por tripsinização com uma solução de tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02%.

Os estoques celulares foram mantidos em nitrogênio líquido, em uma solução contendo 80% de meio DMEM, 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido.

3.2 Curva de crescimento

As células foram cultivadas em placa de Petri de 35mm com inóculo inicial de 3×10^4 células. Foram contadas em câmara de Neubauer nos 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dias após o inóculo inicial. O experimento foi feito em duplicata.

3.3 Tratamento hipotérmico

As células foram inoculadas sobre lamínula em placa de Petri de 35mm, com inóculo inicial de $1x10^4$, $2x10^4$ ou $3x10^4$ células. Após 48 ou 72 horas, durante a fase exponencial de crescimento, as células foram submetidas a baixa temperatura. As temperaturas testadas foram 4ºC, 10ºC e 15ºC, nos seguintes intervalos de tempo: 30 min, 1h, 2h, 6h 12h, 18h e 24 h. Após o tratamento, o meio de cultura foi substituído e as células permaneceram em recuperação por 2h, 4h, 6h, 7h, 18h, 24h, 26h e 28h na estufa, a 37ºC. Os grupos controles foram mantidos em estufa a 37ºC e fixados nos mesmos tempos de recuperação referidos acima.

3.4 Índice mitótico

3.4.1 Iodeto de Propídio

Após cada tratamento, as células foram lavadas três vezes em solução fosfato salina (PBSA) e pré-fixadas por 1 minuto na proporção 1:1 em PBSA e etanol-ácido acético (3:1). Após a pré-fixação, as células foram fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 30 minutos. Na etapa posterior foram realizadas três lavagens em PBSA e permeabilização em Triton X-100 (0,5%), por 10 minutos e novamente três lavagens em PBSA. A seguir, as células foram tratadas com RNAse (10 mg/mL) por 30 minutos, lavadas três vezes em PBSA e, então os núcleos foram corados com iodeto de propídio - Sigma (10

μg/mL) por 20 minutos. Após uma nova lavagem em PBSA, as lamínulas foram montadas em “anti-fading” (Vector).

As lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência (Nikon modelo EDF-3). Foram contadas 1000 células para cada tratamento e seu respectivo controle. As freqüências de mitoses foram representadas como porcentagem em histogramas e incluem células em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase.

3.4.2 Imunofluorescência para histona H3 fosforilada

Após cada tratamento, as células foram lavadas uma vez em PBSA, fixadas em formaldeído 3,7% por um minuto, lavadas duas vezes em PBSA e permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%) por 3 minutos. Após a lavagem em PBSA, as células foram incubadas por uma hora em PBSA contendo 1% de albumina bovina (Sigma). A seguir, as células foram novamente lavadas em PBSA e incubadas com anticorpo policlonal anti-fosfo-histona H3 (Upstate), diluído na proporção 1:100, por 3 horas em câmara úmida. Após duas lavagens em PBSA, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (Calbiochem), diluído na proporção 1:50, por uma hora e meia, em câmara escura e úmida. Os núcleos foram contracorados com iodeto de propídio (10 μg/mL) por 20 minutos. Após uma lavagem em PBSA, as lamínulas foram montadas em “anti-fading”. A análise foi realizada como descrito no item anterior.

3.5 Incorporação e detecção de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)

Os esquemas de tratamento e momento de incorporação e concentrações de BrdU utilizadas estão adequadamente descritos e esquematizados nos Resultados.

Após o tempo de incubação com BrdU (Sigma) necessário para cada experimento, as células foram lavadas três vezes em PBSA e fixadas em metanol gelado por 30 minutos, e a seguir em formaldeído (3,7%) por 10 minutos. Após três lavagens com PBSA, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%) por 10 minutos e novamente lavadas em PBSA. As células foram tratadas durante 40 minutos com anti-bromo-desoxiuridina e nuclease (GE Healthcare), na proporção 1:100, e a seguir lavadas três vezes em PBSA. Após o tratamento, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (Sigma), na proporção 1:50, por uma hora e meia, em câmara escura e úmida. Os núcleos foram contracorados com iodeto de propídio (10 μg/mL) por 20 minutos. Após uma lavagem em PBSA, as lamínulas foram montadas em "anti-fading". As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência (Nikon).

3.6 Determinação da duração de G2 pelo método das mitoses marcadas

As células foram inoculadas sobre lamínula em placa de Petri de 35mm, com inóculo inicial de $2x10^4$ células. Após 72 horas, foram submetidas a incorporação de 100μM de BrdU por uma hora (pulso). Foram fixadas a

cada 30 minutos por um período de sete horas (caça) e marcadas com anticorpo anti-BrdU, conforme foi descrito detalhadamente no item anterior. Em cada ponto foram analisadas 200 mitoses ao microscópio de fluorescência (Nikon). O experimento foi feito em duplicata.

3.7 Determinação da duração da fase S e do ciclo todo pela incorporação de BrdU

As células foram inoculadas sobre lamínula em placa de Petri de 35 mm, com quantidade inicial de $2x10^4$, $1,5x10^4$ ou $1x10^4$ células, dependendo do tempo de incubação a que seriam submetidas posteriormente. Após 72 horas, durante a fase exponencial de crescimento, o meio normal foi trocado por outro contendo 100 µM de BrdU. As células foram fixadas a cada três horas durante um período de 36 horas e marcadas com anticorpo anti-BrdU, conforme descrito no item 3.6. Foram contadas 1000 células em cada lâmina ao microscópio de fluorescência. O experimento foi feito em duplicata.

3.8 Avaliação inicial do efeito de vincristina

As células foram inoculadas sobre lamínula em placa de Petri de 35mm, com quantidade inicial de $2x10^4$ células. Após 72 horas, foram tratadas com 0,05 µg/mL de vincristina por 12, 24, 48 e 72 horas. O índice mitótico foi obtido através coloração por iodeto de propídio (conforme o item 3.4.1).

3.9 Sincronização de células em mitose pela associação de métodos (bloqueio duplo)

As estratégias metodológicas utilizadas para esta finalidade consistiram na retirada do soro fetal bovino (SFB) e tratamento com vincristina nas preparações celulares. As células foram inoculadas sobre lamínula em placa de Petri de 35 mm, com inóculo inicial de $1x10^3$ células em meio DMEM suplementado com SFB (10%). Após 24 horas, o meio foi substituído por DMEM a 5% de SFB. Decorridas 24 horas, o soro foi reduzido a 1% e após igual período, foi completamente retirado. As células permaneceram nessa condição por 50 horas, e então o meio com 10% de SFB foi adicionado à cultura por 44 horas. Ao final desse período, as células foram tratadas com vincristina (0,05, 0,1 e 0,5 µg/mL) por mais 6 horas e, finalmente, o meio foi substituído por outro livre da droga. As células foram fixadas imediatamente após o término do tratamento e também 6h, 18h, 24h e 48 h após a troca de meio. O índice mitótico foi obtido através de imunofluorescência para histona H3 ou coloração por iodeto de propídio (itens 3.4.2 e 3.4.1, respectivamente). A freqüência de micronúcleos foi avaliada de acordo com os critérios descritos por Dias *et al*, 2005. Células binucleadas e multinucleadas também foram consideradas na contagem. Foram analisadas 1000 células por ponto.

3.10 Imunofluorescência para lamina B

Ao final da sincronização por duplo bloqueio, as células foram submetidas a imunofluorescência para detecção de lamina B. Após serem lavadas três vezes em PBSA, as células foram fixadas por 20 minutos em formaldeído (3,7%), lavadas novamente e tratadas com Triton x-100 (0,5%) por 15 minutos. Depois de três lavagens em PBSA, foram incubadas por 15 horas em câmara úmida com o anticorpo anti-lamina B (Santa Cruz), diluído a 1:10. Após duas lavagens em PBSA, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína (Santa Cruz), na diluição 1:20, por duas horas, em câmara escura e úmida. A seguir as preparações foram tratadas com RNAse (10 mg/mL) por 30 minutos, novamente lavadas e os núcleos foram contracorados com iodeto de propídio (10 μg/mL) por 20 minutos. Após uma lavagem em PBSA, as lamínulas foram montadas em "anti-fading". As lâminas foram analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser (item 3.13). Dois experimentos independentes foram realizados e 50 micronúcleos foram analisados em cada lâmina.

3.11 Imunofluorescência para tubulina

Ao final da sincronização por duplo bloqueio, as células foram submetidas a imunofluorescência para detecção dos microtúbulos. Após serem lavadas três vezes em PBSA, as células foram fixadas por 20 minutos em formaldeído (3,7%), lavadas novamente e tratadas com Triton x-100

(0,5%) por 15 minutos. Depois de três lavagens em PBSA, foram incubadas por 15 horas com anticorpo anti-α-tubulina (1:200) e anti-β-tubulina (1:50), ambos provenientes do fabricante Sigma. Após duas lavagens em PBSA, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com Cy-5 (Sigma), na diluição 1:10, por três horas, em câmara escura e úmida. A seguir foram tratadas com RNAse (10 mg/mL) por 30 minutos, novamente lavadas e os núcleos foram contracorados com iodeto de propídio (10 μg/mL) por 20 minutos. Após uma lavagem em PBSA, as lamínulas foram montadas em "anti-fading". As lâminas foram analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser (item 3.13).

3.12 Hibridizações fluorescentes *in situ* para EGFR

3.12.1 Seqüenciamento de DNA

Bactérias competentes *E. Coli* DH10B preparadas em cálcio 50 mM foram transformadas com cDNA de EGFR, gentilmente cedido pela Dra Fátima Bonaldo (Chicago Memorial Children's Hospital). As bactérias transformadas que continham o inserto no plasmídeo PT7T3 foram selecionadas por crescimento em placas com meio LB (10 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona) contendo ampicilina 100 mg/L, IPTG e Xgal. As colônias selecionadas foram mantidas em crescimento por 18 horas em placa de 96 poços e filtro Multiscreen (Millipore), em 1 mL de TB (10 g/L NaCl, 24 g/L extrato de levedura, 12 g/L triptona, 0,4% glicerol, ampicilina

100mg/L), coletadas na própria placa de crescimento por centrifugação a 4°C (4000 rpm, 5 minutos), ressuspensas em 85 μL de GET (10mM EDTA, 50mM Glicose, 25 mM Tris-HCl) contendo 0,5 mg/mL de RNAase. Foram, então, lisadas com a adição de 60 μL de solução de lise (0,2M NaOH, 1% SDS) e neutralizadas com 60 μL de acetato de potássio 3M e mantidas a 90°C por 30 minutos. Após centrifugação de 15 minutos (4000 rpm, 4°C) o lisado foi filtrado em Multiscreen (Millipore) montado sobre placas de coleta com fundo em V contendo 110 μL de isopropanol através de nova centrifugação a 4000 rpm (40 minutos, 4°C), ao final desta o DNA já precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em 10 mM Tris-HCl (pH 8).

O DNA obtido foi verificado em gel de agarose 0,8 % e a partir deste DNA a reação de amplificação (PCR) foi preparada utilizando 3 μL de DNA, 7,5 μL de água, 6 μL de tampão SM, 2 μL BigDye e 1,5 μL de primers T7 e T3 (a 3,2 pmol/μL). Os ciclos utilizados para a reação de amplificação foram:

1 minuto - 96°C

20 segundos - 96°C
1 minutos - 50°C
4 minutos - 60°C
} 35 vezes

∞ - 4°C

O produto de PCR foi precipitado adicionando 54 μL de solução gelada de precipitação contendo 50 μL de etanol, 2 μL de acetato de sódio (3 M, pH 5) e 2 μL de glicogênio (1 g/L). Após breve agitação em vortex, as amostras permaneceram em gelo por 15 minutos, foram então centrifugadas por 30 minutos a 4000 rpm, 4°C e após o descarte do sobrenadante foram adicionados 50 μL de etanol gelado. As amostras foram novamente centrifugadas, secas no escuro a temperatura ambiente por uma hora e ressuspensas em 1,5 μL de tampão de entrada (loading buffer : blue-dextran e formamida) para seqüenciamento.

As amostras foram seqüenciadas no seqüenciador modelo ABI-Prism 3100 (Applied Biosystems). A identidade do clone foi confirmada pelo programa Blast Client 3, distribuído pelo National Center for Biotechnology Information.

3.12.2 Preparação da sonda e reações de hibridização

Após a confirmação da identidade do clone, a sonda foi preparada com 4μL de DNA e 11 μL de água Milli-Q, fervidos por 5 minutos e mantidos em gelo. A seguir foram acrescentados 2 μL de Dig DNA, 2 μL de hexanucleotídeos e 1μL da enzima Klenow. A mistura foi mantida a 37°C por 1 hora e congelada ao final do período.

As células A549 crescidas sobre lamínulas foram fixadas em etanol-ácido acético na proporção 3:1 por 30 minutos, lavadas com PBSA e incubadas 50μL de NaOH 0,07% por 5 minutos. Então, foram lavadas com PBSA e mergulhas seqüencialmente em SSC 2X, álcool 70% e álcool absoluto gelado. As lamínulas foram secas e incubadas com 10 μL de uma mistura previamente fervida por 10 minutos contendo 20 μL da sonda, 5 μL de SDS 10%, 5 μL de Denharts 10X, 25 μL de SSC 20X e 45 μL de água. As células foram mantidas a 58°C por 18 horas. Após este período, foram mergulhadas por 5 minutos em SSC 2X e incubadas com 9 μL de dideoxiginina-fluoresceína (1:5) e mantidas em câmara úmida e escura por 1h 30 minutos. Finalmente, as lamínulas foram lavadas em SSC 2X e montadas em "anti-fading" e iodeto de propidio (10 μg/mL). A análise foi realizada com o auxílio do microscópio confocal de varredura a laser.

3.13 Análise por microscopia confocal de varredura a laser

As imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) com laseres de argônio hélio-neônio, ligados a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100 M. A fluorescência emitida foi selecionada por um conjunto de filtros e exibida com uma resolução de 512x512 pixels em modo RGB. As imagens de secções verticais foram obtidas por intervalo de seccionamento apropriado no eixo Z, variando de acordo com o material analisado (MANELLI-OLIVEIRA & MACHADO-SANTELLI, 2001).

As imagens adquiridas foram analisadas com o auxílio de várias funções do “software”. A função “split” permite observar cada canal individualmente e sobrepostos. Com “Projection”, todas as secções obtidas no eixo Z são projetadas em uma única imagem.

3.14 Análise estatística

Foi utilizado o teste de Igualdade de Duas Proporções e para complementar a análise descritiva dos valores quantitativos, a técnica de Intervalo de Confiança para média (Vieira, 1991).

O Teste de Igualdade de Duas Proporções é um teste não paramétrico que aponta se a proporção de respostas de duas determinadas variáveis e/ou seus níveis é estatisticamente significantes. Assim, trabalha-se com as seguintes hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \mathrm{p}_1 = p_2 \\ H_1 : \mathrm{p}_1 \neq p_2 \end{cases}$$

Para realização do teste deve-se calcular $f_1 = \frac{x_1}{n_1}$, $f_2 = \frac{x_2}{n_2}$ e $\hat{p} = \frac{x_1 + x_2}{n_1 + n_2}$. Com isso é possível calcular a estatística teste.

$$Z_{cal} = \frac{f_1 - f_2}{\sqrt{\hat{p}(1-\hat{p})\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

- Se $-Z_{\frac{\alpha}{2}} \leq Z_{cal} \leq Z_{\frac{\alpha}{2}}$, não se pode rejeitar H_0, isto é, a um determinado risco α, afirma-se que não existe diferença entre as proporções.
- Se $Z_{cal} > Z_{\frac{\alpha}{2}}$ ou $Z_{cal} < -Z_{\frac{\alpha}{2}}$, rejeita-se H_0, concluindo-se, com risco α, que há diferença entre as proporções.

Para a conclusão dos testes realizados a estatística p-valor foi utilizada. Caso esse valor seja maior que o nível de significância adotado (erro ou α), conclui-se portanto que a H_0 (a hipótese nula) é a hipótese verdadeira, caso contrário a opção é H_1, a hipótese alternativa.

O nível de significância adotado foi 0,05 (5%).

Resultados

4.1 Curva de crescimento e caracterização da linhagem celular

A curva de crescimento da linhagem A549 foi obtida a partir de um inóculo inicial de $3x10^4$ células. A população celular aumenta exponencialmente até o décimo dia de cultivo, quando as células começam a descolar do substrato e há decréscimo no número total (Figura 01).

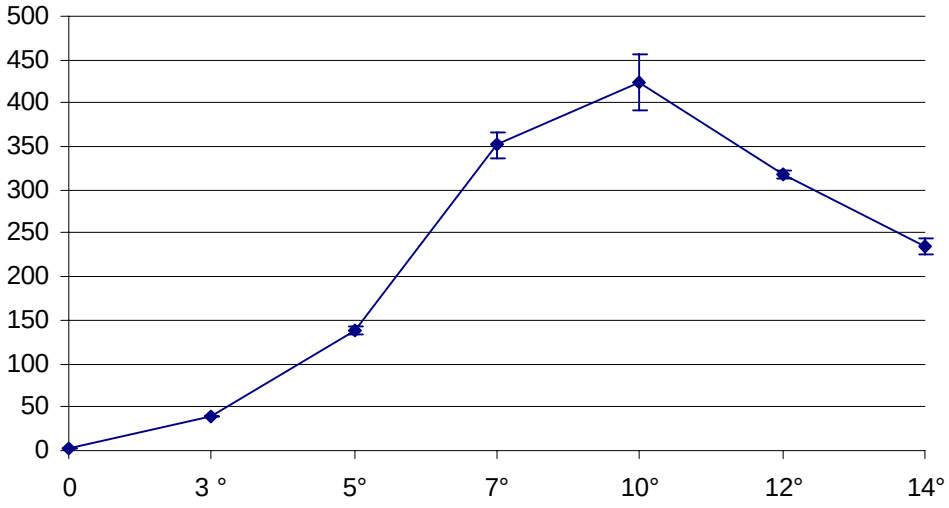


Figura 01. Curva de crescimento da linhagem A549, com inóculo inicial de $3x10^4$ células.

As células A549 possuem morfologia típica de células epiteliais, compatível com sua origem a partir de um carcinoma. Durante o período de subconfluência apresentam morfologia irregular, enquanto em confluência, o aspecto torna-se mais regular. A figura 02 mostra o aspecto morfológico das células da linhagem A549.

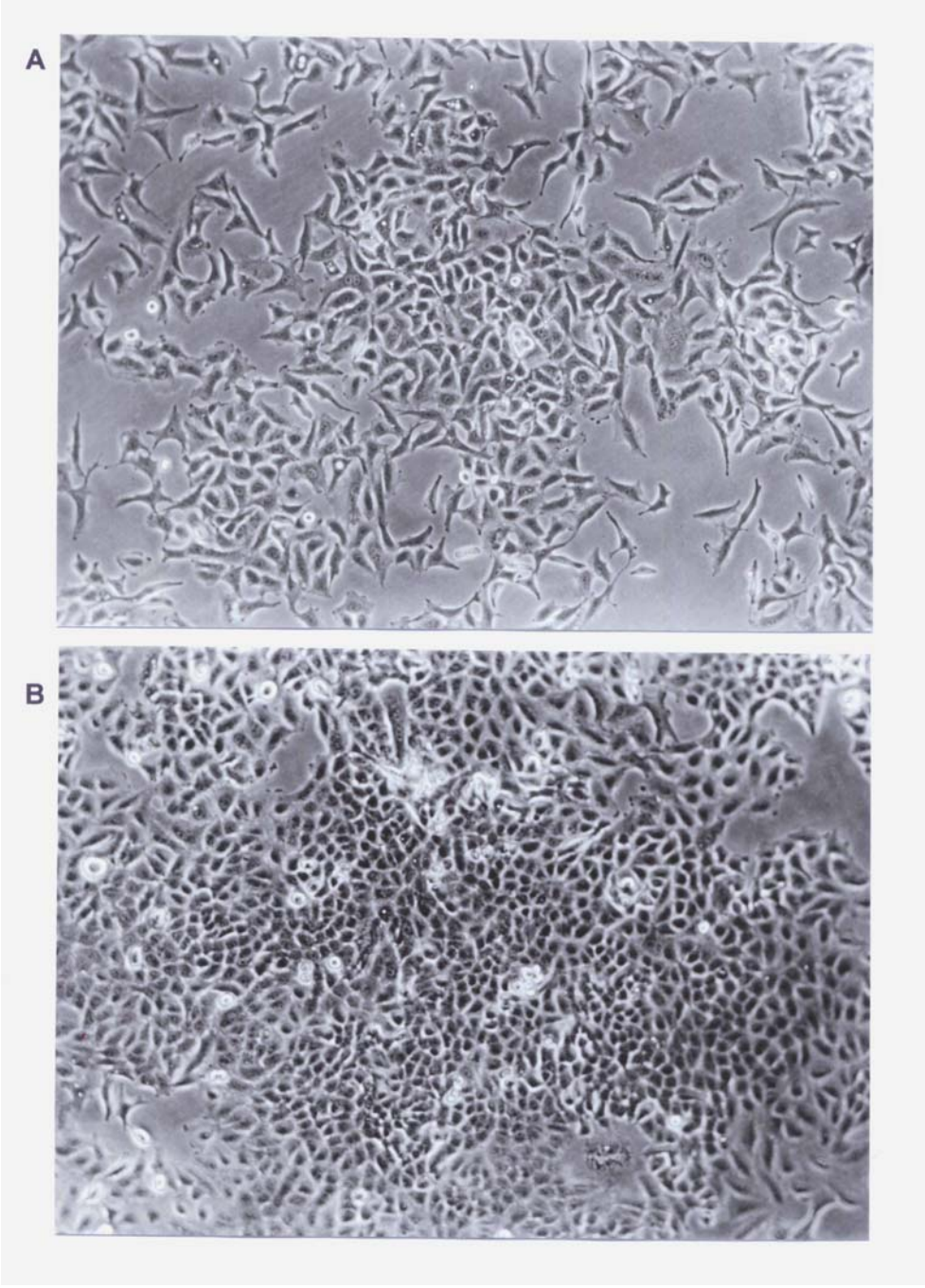


Figura 02. Células A549 observadas ao microscópio invertido de contraste de fase. **A.** fase de subconfluência. **B.** fase de confluência. Aumento: 82x.

4.2 Efeito da hipotermia sobre o ciclo celular

Nos primeiros experimentos realizados, o objetivo foi avaliar qual seria a temperatura mais adequada para o tratamento hipotérmico. Esperava-se a parada em mitose e posterior retomada do ciclo celular sem perturbações severas às células. Nestes experimentos os núcleos foram corados com iodeto de propídio e analisados ao microscópio de fluorescência.

Inicialmente, as células foram submetidas a 4ºC por 30 minutos, uma e duas horas (Figura 03). Os resultados mostram que apenas o tratamento de duas horas causou pequeno aumentou no número de células em mitose.

No experimento seguinte, as células foram mantidas a 4ºC por duas, seis, 12, 18 e 24 horas e recuperadas a 37ºC por 90 minutos (Figura 04). Os tratamentos de 12, 18 e 24 horas foram muito agressivos, causando descolamento e morte celular. Nos demais tempos, as porcentagens de células em mitose foram muito semelhantes entre as tratadas e entre essas e o grupo controle.

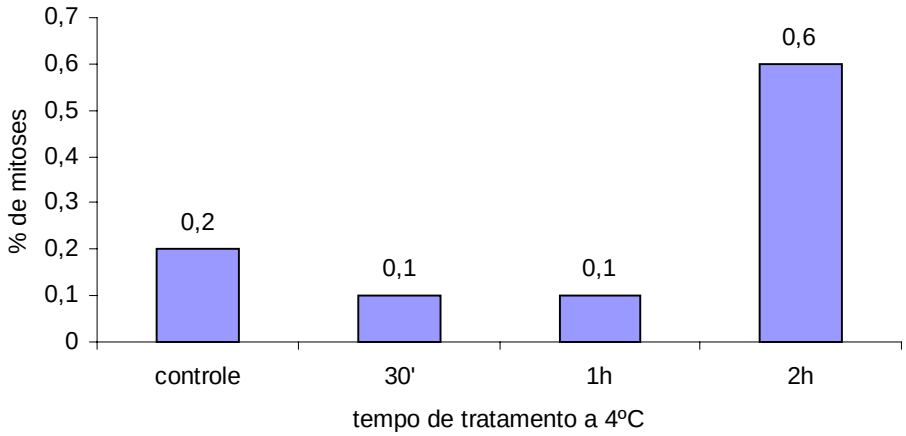


Figura 03. Porcentagem de células da linhagem A549 em mitose após tratamento hipotérmico. Foram analisadas 1000 células por tratamento.

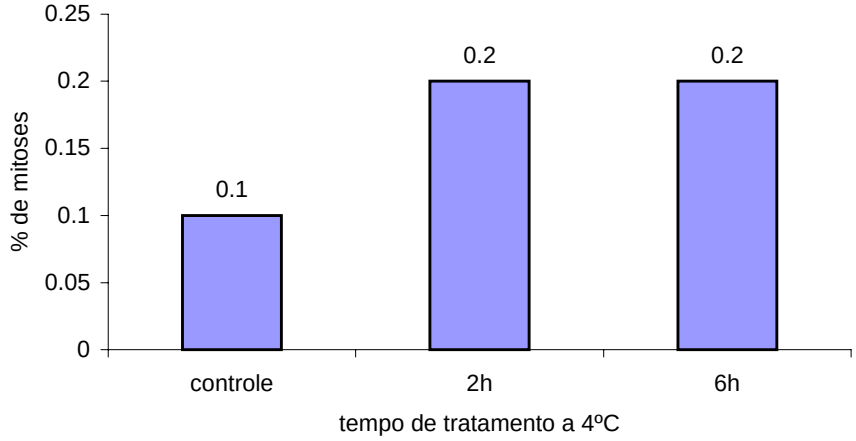


Figura 04. Porcentagem de células da linhagem A549 em mitose após tratamento por hipotérmico e recuperação a 37ºC por 90 minutos. Foram analisadas 1000 células por tratamento.

Estes dois experimentos sugeriram que o tratamento a 4°C por duas horas, sem recuperação seria o mais eficaz, por isso essa mesma temperatura foi testada com outros tempos de recuperação. Também optou-se por manter as células a 4ºC por uma hora (Figura 05), com o objetivo de verificar a diferença quanto ao índice mitótico entre os tempos de recuperação e entre os tempos de tratamento.

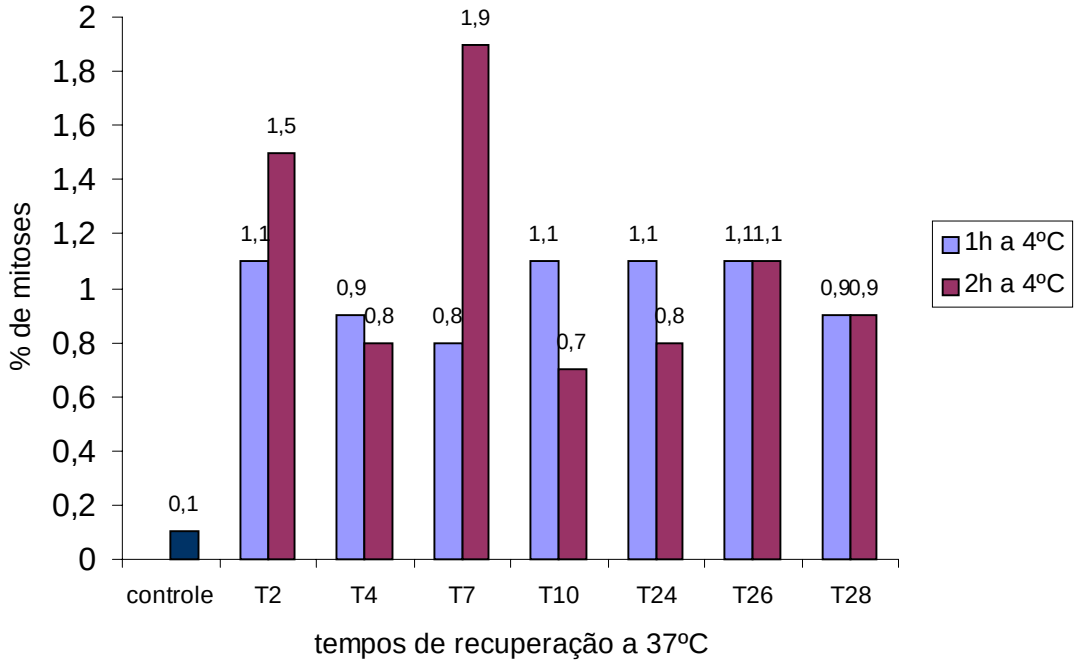


Figura 05. Porcentagem de células da linhagem A549 em mitose após tratamento a 4ºC por uma ou duas horas e tempos de recuperação a 37ºC de duas, quatro, sete, 10, 24 e 26 e 28 horas. Foram analisadas 1000 células por tratamento.

A resposta a esses tratamentos foi bastante variável. No entanto, houve aumento do índice mitótico em relação ao controle em todos os

tempos de recuperação. Após uma hora de tratamento a 4ºC, os índices mitóticos não variaram muito para cada tempo de recuperação, ficando entre 0,8% e 1,1%. Células submetidas a 4ºC por duas horas apresentaram resultados mais variáveis. Nesse caso, a porcentagem de células em fase M esteve entre 0,7% e 1,9%. Os índices mais expressivos foram obtidos após duas e sete horas de recuperação: 1,5% e 1,9%, respectivamente. Nos tempos T26 e T28, os resultados para os dois tempos de tratamento foram idênticos.

Apesar dos resultados mostrarem um aumento nos índices mitóticos após os tratamentos, não houve sincronização. Além disso, as células apresentavam morfologia irregular após serem submetidas a hipotermia e muitas se soltaram do substrato. Por isso, foram avaliados tratamentos a 15ºC, com os mesmos tempos de recuperação, além da inclusão do tempo zero e de alguns controles (Figura 06). Os valores dos grupos controles foram 0.4%, 1.0% e 1.4% nos tempos T2, T7 e T24, respectivamente.

Novamente, os valores obtidos foram bastante variáveis. Em células tratadas por uma hora a 15ºC, os índices mitóticos ficaram entre 0,8% e 1,3%. No tratamento de duas horas, as porcentagens de células em mitose variaram entre 0,4% e 1,7%.

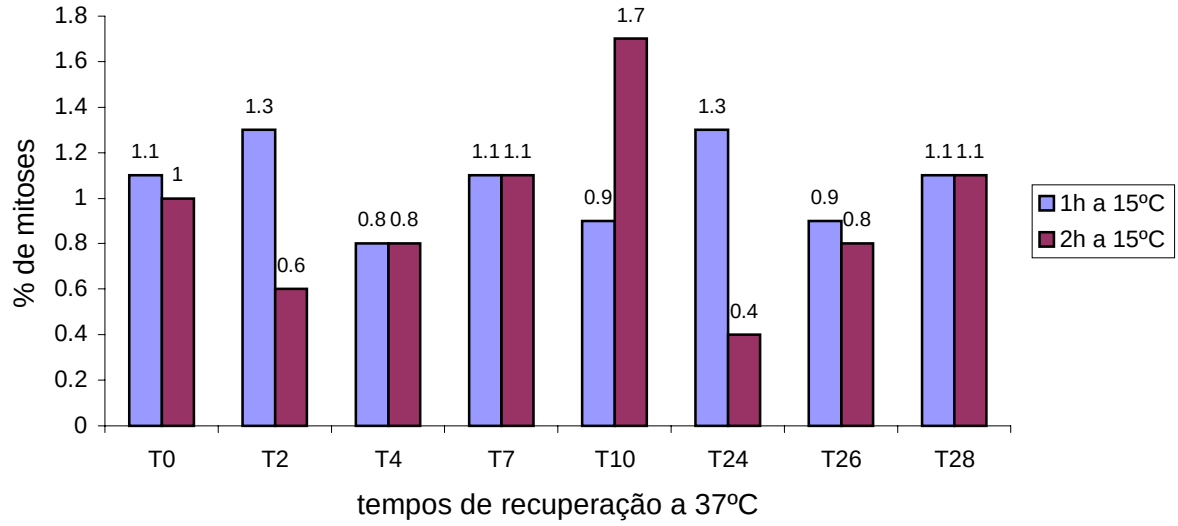


Figura 06. Índice mitótico de células da linhagem A549 mantidas a 15ºC por uma ou duas horas e recuperadas a 37ºC por zero, duas, quatro, sete, 10, 24 e 26 horas. Foram analisadas 1000 células por tratamento.

Também foram feitos experimentos a 15ºC onde as células foram expostas por 6 ou 12 horas e recuperadas por 12 ou 24 horas (Figura 07). Em células submetidas a baixa temperatura por 6 horas, a porcentagem de mitoses aumentou progressivamente durante o período de recuperação, sendo maior que o controle nos tempos T2 e T24 e com valores próximos no tempo zero. Células tratadas por 12 horas apresentaram índices mais baixos que os controles e também menores que os apresentados em células tratadas por seis horas.

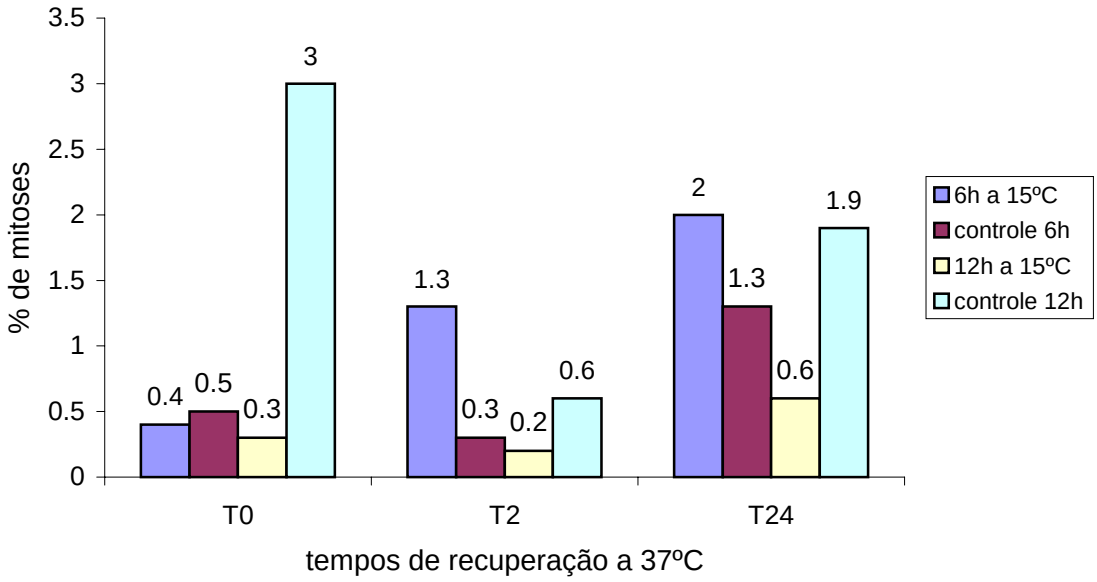


Figura 07. Índice mitótico de células da linhagem A549 mantidas a 15ºC por seis ou 12 horas e recuperadas a 37ºC por zero, duas e 24 horas. Foram analisadas 1000 células por tratamento.

Após serem submetidas a 10ºC por seis horas, as células foram fixadas em tempos progressivos durante a recuperação (Figura 08). Nesse ensaio, a porcentagem de mitoses aumentou progressivamente em relação aos tempos de recuperação. As porcentagens de mitose no grupo controle foram sempre maiores que nas células tratadas.

O conjunto de resultados mostrou que a melhor resposta quanto ao índice mitótico foi obtida utilizando-se temperatura mais amena (15ºC) e tempo de exposição intermediário (seis horas). Nesses tratamentos, as células também apresentaram menos alterações morfológicas.

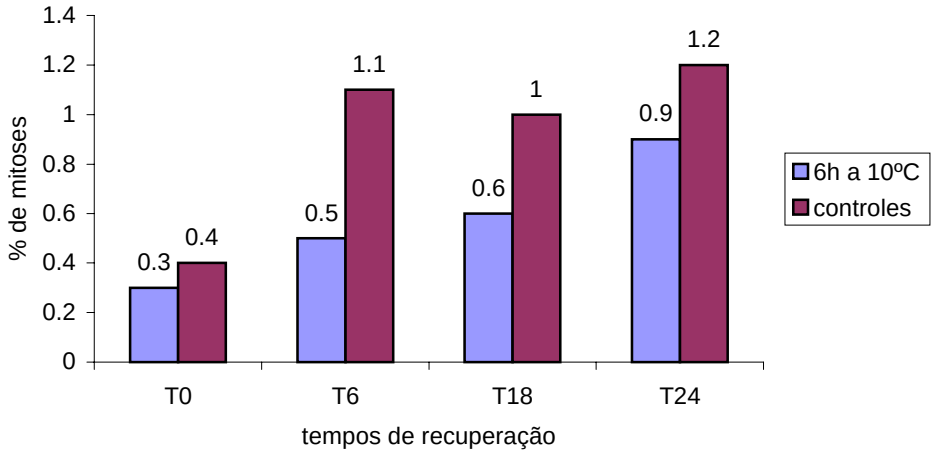


Figura 08. Porcentagem de células da linhagem A549 em mitose, após tratamento por seis horas a 10ºC e recuperadas a 37ºC. Foram analisadas 1000 células por ponto.

Diante disto, outros experimentos foram realizados utilizando exposição a 15ºC e novos tempos de recuperação foram investigados. A partir de então, uma nova metodologia passou a ser utilizada para avaliar o índice mitótico. O método escolhido foi a imunofluorescência para histona H3 fosforilada, um marcador de mitose. A fosforilação dessa histona é muito baixa em células interfásicas e ocorre quase exclusivamente durante a mitose (HENDZEL *et al.*, 1997; WEI *et al.*, 1998). Foi necessário padronizar essa técnica, incluindo variações na fixação e permeabilização da células. A figura 09 mostra o padrão de marcação obtido com o uso do anticorpo anti-H3 fosforilada em células da linhagem A549.

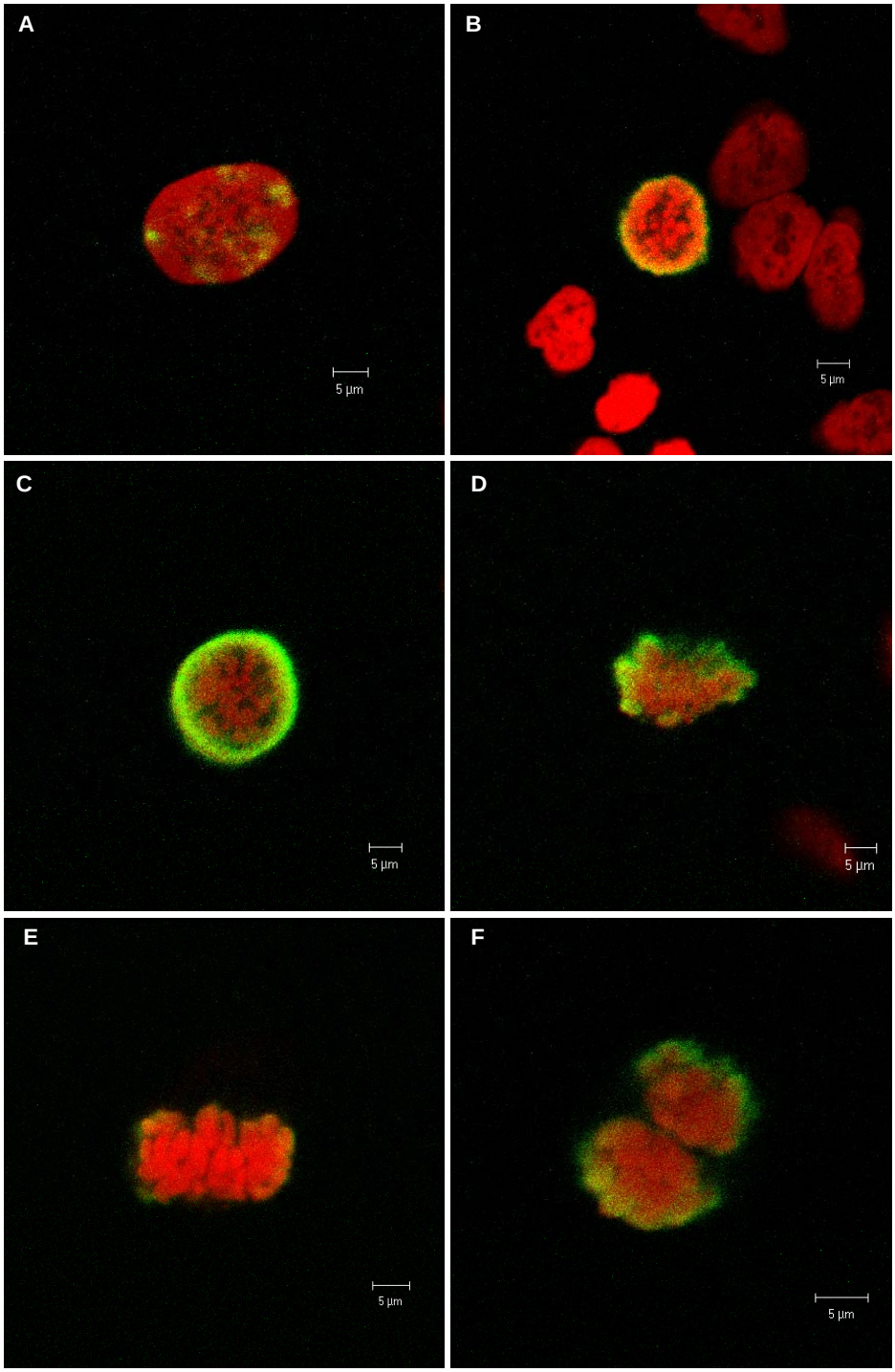


Figura 09. Células A549 marcadas com anticorpo anti histona H3 fosforilada (verde) e DNA corado por iodeto de propídio (vermelho). **A** e **B**. prófase inicial; **C.** prófase; **D.** e **E.** metáfases. **F.** início de anáfase. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

A figura 10 mostra os resultados obtidos em células submetidas a 15ºC por 6 horas e recuperadas a 37ºC por zero, seis, 18 e 24 horas.

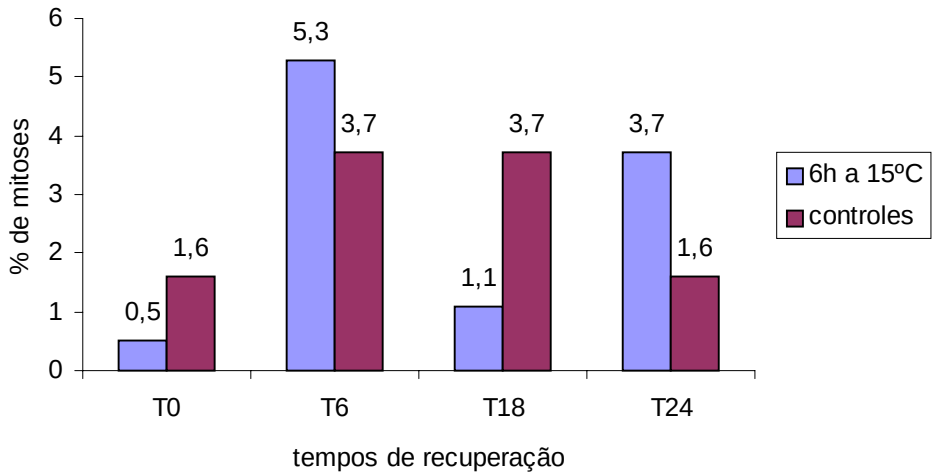


Figura 10. Índice mitótico avaliado por imunofluorescência com anticorpo anti histona H3 fosforilada em células da linhagem A549 mantidas a 15ºC por seis horas e recuperadas a 37ºC. Foram analisadas 1000 células em cada tempo.

Nesse ensaio, o maior índice mitótico foi obtido após seis horas de recuperação. Nos tempos T0 e T18, os valores obtidos para os grupos controles foram superiores aos encontrados nas células tratadas.

O mesmo experimento foi realizado com células tratadas por seis horas a 10ºC (Figura 11).

Os dados mostraram que os índices mitóticos obtidos foram diferentes daqueles mostrados no experimento anterior, avaliados por coloração com iodeto de propídio (Figura 08). Além disso, os valores para células tratadas e

controles foram muito próximos nos tempos T0 e T18. É interessante notar que também nesse ensaio, o índice mitótico mais alto foi obtido em T6.

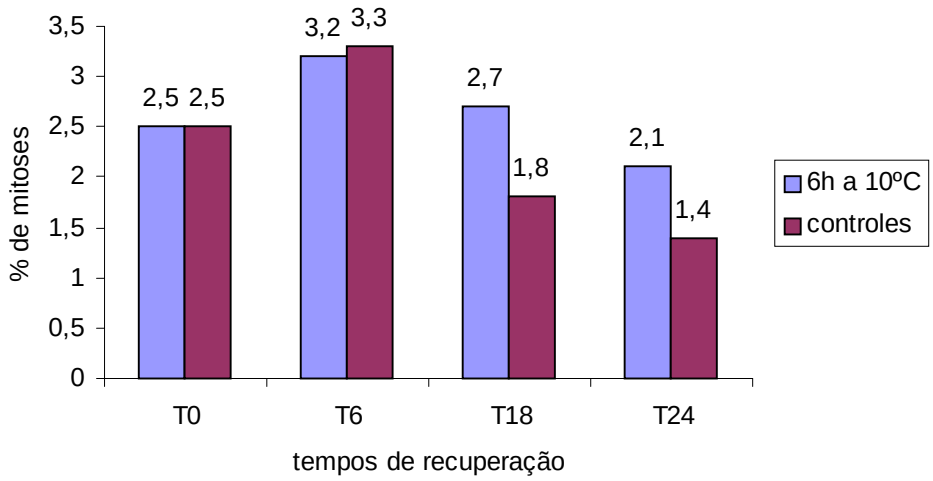


Figura 11. Índice mitótico detectado por anticorpo anti histona H3 fosforilada em células A549 mantidas a 10ºC por seis horas e recuperadas a 37ºC. Foram analisadas 1000 células por ponto.

Para avaliar o efeito da hipotermia sobre a fase S, utilizamos o método de incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). Este método permite quantificar o número de células de uma população em fase S, pois a desoxiuridina, sendo um análogo da timidina, é incorporada ao DNA durante a fase de replicação (GRATZENER, 1982). A detecção é feita com anticorpos que reconhecem a BrdU. Para a realização desses experimentos, foi necessária a padronização da técnica, com relação à concentração de BrdU utilizada e ao tempo de tratamento com nuclease. A figura 12 mostra o padrão de marcação nos ensaios de incorporação de BrdU em células da linhagem A549.

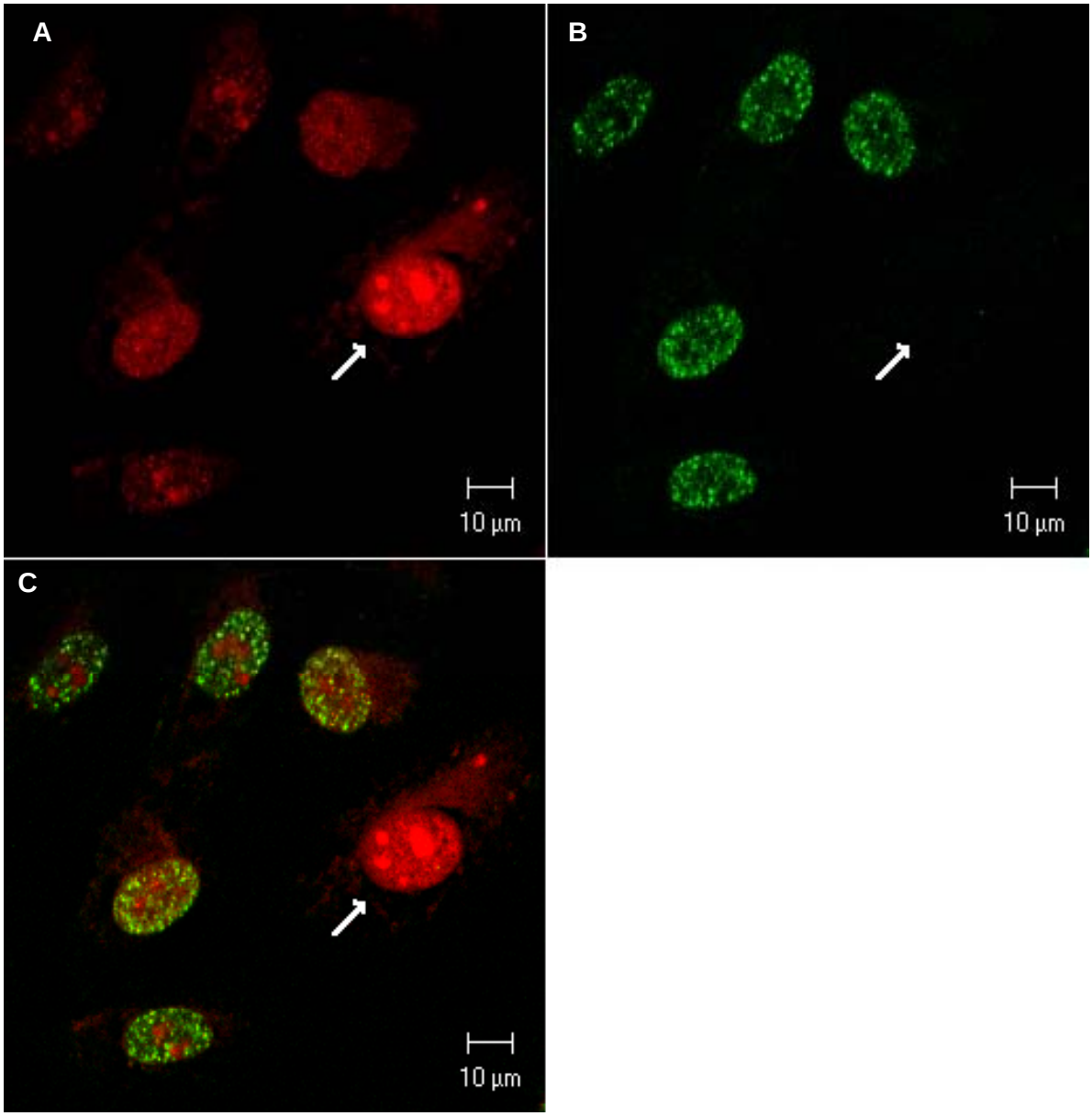


Figura 12. Células A549 submetidas a incorporação de 5 bromo-2'-desoxiuridina (BrdU). **A.** núcleos corados com iodeto de propídio; **B**. núcleos marcados com anticorpo anti BrdU; **C.** duas marcações simultâneas; **seta**: núcleo que não incorporou BrdU. Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser.

Inicialmente, as células foram tratadas com 300 µM de BrdU por duas horas a 37ºC e levadas a 15ºC (ainda com BrdU) por seis horas. Então, voltaram para meio normal e foram recuperadas a 37ºC por zero, seis, 18 e 24 horas. As células controles foram mantidas a 37ºC com a mesma concentração de BrdU por oito horas e fixadas após zero, seis e 24 horas (Figura 13).

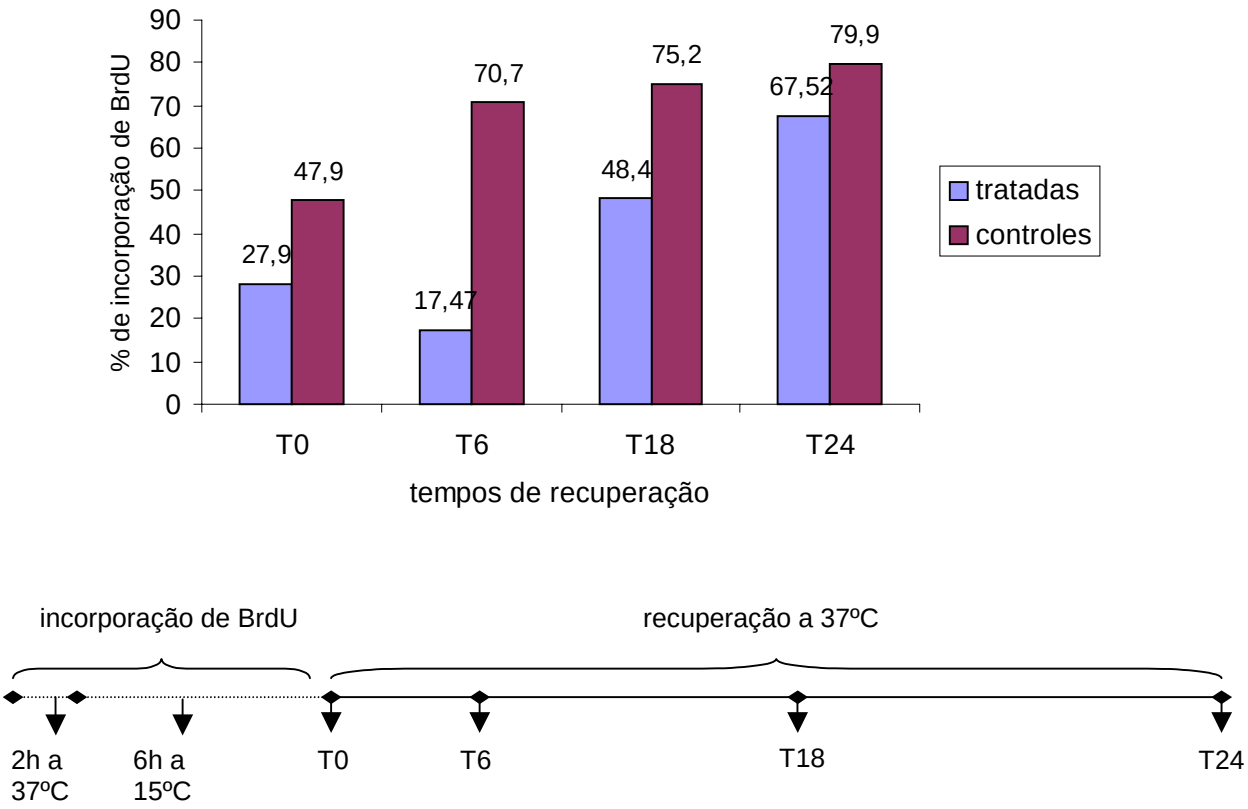


Figura 13. Esquema do experimento e porcentagem de células em fase S, após tratamento com 300 µM de BrdU por duas horas a 37ºC e seis horas a 15ºC, com recuperação a 37ºC na ausência de BrdU. Foram analisadas 1000 células por ponto.

A porcentagem de células em fase S aumentou progressivamente em cada tempo de recuperação, com exceção do tempo T6. Os grupos controles apresentaram mais células em S, indicando que o tratamento hipotérmico inibe parcialmente a síntese de DNA.

No experimento seguinte, as células foram tratadas com 180 µM de BrdU por uma hora a 37ºC e levadas a 15ºC, ainda com BrdU por seis horas. A droga foi retirada e as células foram recuperadas a 37ºC por zero, seis, 18 e 24 horas. Os controles foram tratados com 180 µM de BrdU por 7 horas a 37ºC e fixados após zero, seis, 18 e 24 horas (Figura 14).

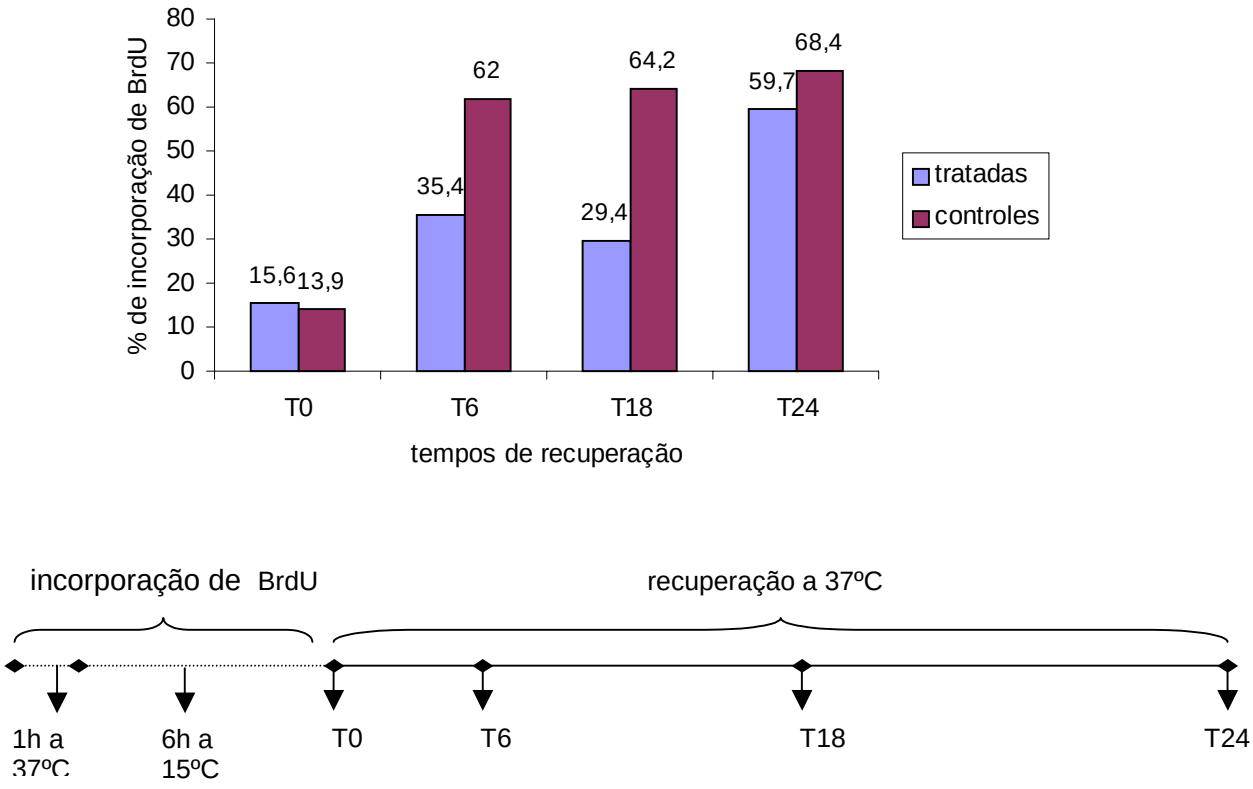


Figura 14. Esquema do experimento e porcentagem de incorporação de BrdU em células A549 tratadas com 180µM de BrdU por uma hora a 37ºC e levadas a 15ºC, ainda com BrdU, por seis horas. Foram analisadas 1000 células por ponto.

O padrão obtido foi praticamente igual ao observado anteriormente. De modo geral, os índices foram mais baixos, refletindo o menor tempo de incorporação de BrdU. Também aqui, os grupos controles apresentaram maior porcentagem de células em S, exceto em T0 e T0 controle, cujos valores são muito próximos. Nas células tratadas, os índices aumentaram progressivamente, exceto no tempo T18, que apresentou porcentagem de incorporação um pouco menor do que em T6. Em T6, T18 e T24, os resultados mostram que células submetidas ao frio não sintetizam DNA nas mesmas proporções que seus respectivos controles, pelo menos durante as 24 horas iniciais de recuperação. O aumento de células em fase S observado nos grupos controles é resultado da divisão de células marcadas durante o experimento e que, conseqüentemente, deveriam estar marcadas também.

4.3 Caracterização do ciclo de celular

A caracterização do ciclo celular da linhagem A549 foi feita de acordo com o método proposto por Uzbekov *et al*. (1998), com pequenas modificações e incluiu estimativas da duração do ciclo completo e das fases M, S, G2 e G1. Para estimar a duração de G2, foi utilizado o método das mitoses marcadas. Após serem submetidas a um pulso de uma hora de incorporação de BrdU, as células foram fixadas em intervalos de 30 minutos, por um período de sete horas e submetidas à imunofluorescência para detecção do BrdU incorporado (Figura 15).

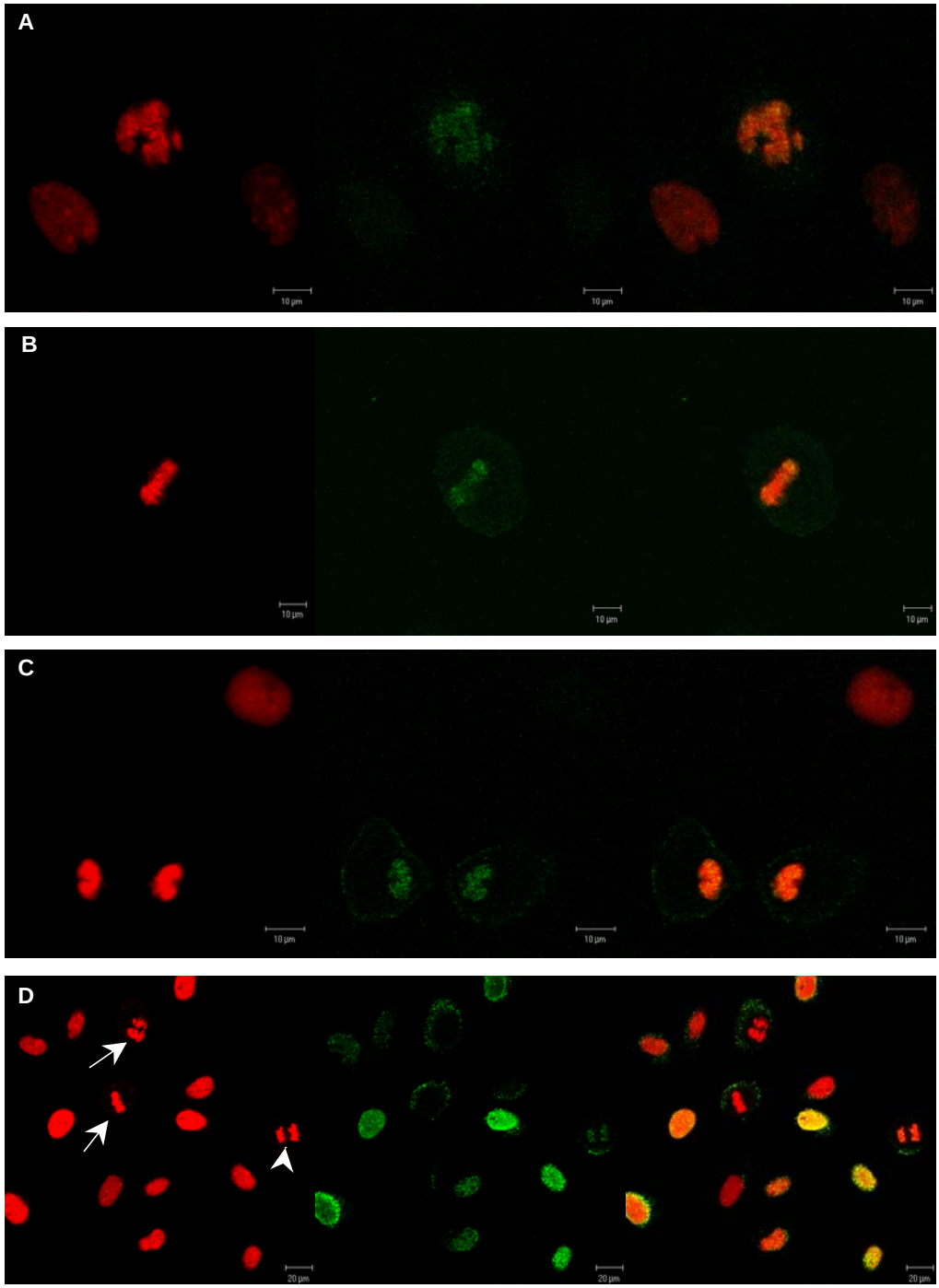


Figura 15. Padrão de incorporação de BrdU em células mitóticas. DNA corado por iodeto de propídio (em vermelho), mitoses e núcleos interfásicos marcados pelo anti-BrdU (em verde) e sobreposição das imagens. A: prometáfase, B: metáfase, C: final de telófase, D: anáfase e metáfase não marcadas (setas) e anáfase marcada pelo anti-BrdU (cabeça de seta). Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

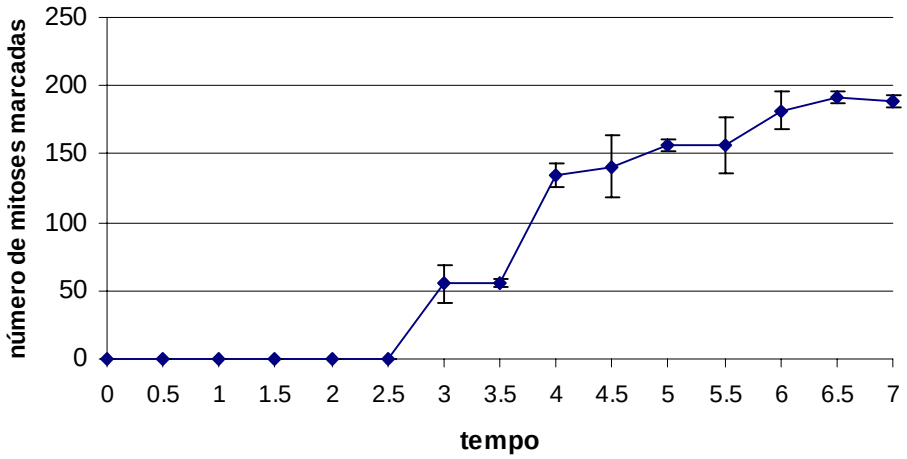


Figura 16. Número médio de mitoses marcadas pelo anticorpo anti-BrdU em células da linhagem A549, após pulso de 1 hora e tempos de caça de trinta minutos. Em cada ponto foram analisadas 200 mitoses. As barras representam o desvio padrão.

Foram analisadas 200 mitoses por ponto, em dois experimentos independentes. A concordância entre os resultados foi avaliada pelo teste de igualdade de duas proporções. Os resultados mostram que três horas após o fim do pulso, as primeiras mitoses, incluindo prófases, aparecem marcadas pelo anticorpo anti-BrdU (Figura 16 e Tabela I). O gráfico apresentado na figura 16 foi traçado com as médias obtidas a partir dos dois experimentos realizados. Entre T0 e T2.5, mitoses marcadas não foram observadas. A partir de T3.5, o número de mitoses positivas para a marcação com BrdU aumenta continuamente, tendendo a estabilizar no final do experimento, quando aproximadamente 95% das figuras mitóticas observadas estavam marcadas.

Tabela I. Número de mitoses marcadas pelo anticorpo anti-BrdU em A549, após pulso de uma hora com 5-bromo-2'-desoxiuridina. As células foram fixadas em intervalos de 30 minutos. Os intervalos de tempo foram contados após o fim da incorporação. A segunda e terceira trazem a média dos dois experimentos em números absolutos e porcentagem. Na última coluna, os valores marcados por asteriscos indicam os pontos onde houve diferença estatisticamente significativa entre os dois experimentos.

	Média	**% mitoses marcadas**	**p-valor**
T0	0	0	- x -
T0.5	0	0	- x -
T1	0	0	- x -
T1.5	0	0	- x -
T2	0	0	- x -
T2.5	0	0	- x -
T3	55	27,5	0,025*
T3.5	55	27,5	0,654
T4	134,5	67,25	0,166
T4.5	141	70,5	<0,001*
T5	157	78,5	0,465
T5.5	156,5	78,25	<0,001*
T6	182	91	<0,001*
T6.5	192	96	0,126
T7	188,5	94,25	0,133

Os dados obtidos foram analisados segundo Uzbekov *et al.* (1998), com pequenas modificações. A duração mínima de G2 é determinada pelo aparecimento da primeira prófase marcada pelo anti-BrdU (T3), incluindo o tempo de incubação com 5-bromo-2'-desoxiuridina, ou seja, quatro horas (Tabela I). Essas células estavam no fim de S durante a incubação, passaram por G2 e foram as primeiras a entrar em mitose. O tempo médio de duração de G2 é representado pelo ponto onde cerca de 50% das mitoses analisadas estão marcadas (aproximadamente em T4, isto é, cinco horas após o início da incorporação), excluindo-se a metade do tempo de duração da mitose (30 minutos, ver o cálculo para determinação da duração de M adiante). Portanto, temos um G2 médio de 4h30min. Para G2 máximo, devemos considerar o tempo no qual há o número máximo de mitoses marcadas (T6.5), mais o tempo de incorporação, excluindo-se metade do tempo da mitose. Assim, obtemos 7h como a duração máxima.

De acordo com Uzbekov *et al.* (1999), é possível obter G2 médio através do cálculo da média considerando G2 mínimo (quatro horas) e máximo (sete horas). Assim teremos: G2 médio = 4 + 7/ 2 = 5 h 30'. Desse valor, deve-se excluir o tempo de incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina. Ao final teremos um G2 médio de 4h30', conforme obtido pela análise anterior. Esse foi o valor considerado para os cálculos posteriores e para a determinação do método de sincronização.

Experimentos para determinar a duração estimada do ciclo completo e da fase S também foram realizados. Nestes ensaios, as células foram

cultivadas na presença de BrdU continuamente e fixadas em intervalos de três ou seis horas. A tabela II mostra a média de dois experimentos independentes (experimento A e experimento B). Ambos foram comparados pelo teste da igualdade de duas proporções. Em cada ponto de cada experimento foram analisadas 1000 células. A figura 17 mostra a curva obtida com a média dos experimentos e os desvios para cada ponto.

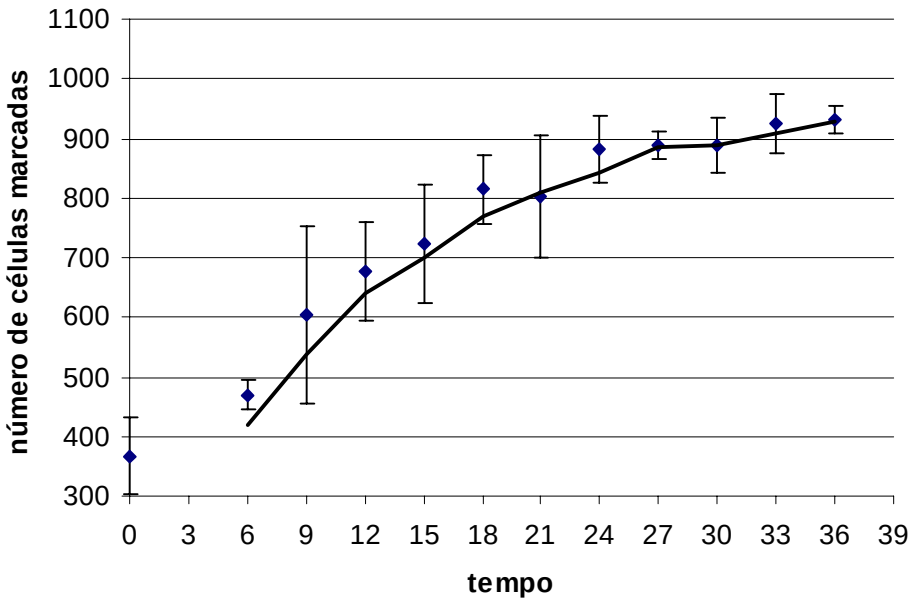


Figura 17. Cinética de incorporação de BrdU, na linhagem A549. As células passaram por incorporação contínua de BrdU e foram fixadas em intervalos de três horas. Foram analisadas 1000 células em cada ponto. As barras representam o desvio padrão.

Entre os pontos T6 e T27 houve aumento contínuo de células marcadas pelo anti-BrdU. A curva obtida com a média dos dois conjuntos de dados é mais definida em relação ao ponto de estabilização do número de células marcadas. Observando-a, é possível notar que isso ocorreu após 27 horas de incorporação contínua com BrdU.

Tabela II. Número de células A549 marcadas com anti-BrdU, após incorporação contínua de 5-bromo-2'-desoxiuridina, durante período máximo de 36 horas. As células foram fixadas após uma hora de incorporação (T0), seis horas após e a partir de então, em intervalos de três horas. A segunda e terceira colunas trazem a média dos dois experimentos em números absolutos e porcentagem. Na última coluna, os valores marcados por asteriscos indicam os pontos onde houve diferença estatisticamente significativa entre os dois experimentos.

	média	**% células marcadas**	**p-valor**
T0	367,5	36,75	<0,001*
T6	470	47,0	0,128
T9	604	60,4	<0,001*
T12	677	67,7	<0,001*
T15	722,5	72,25	<0,001*
T18	814,5	81,45	<0,001*
T21	803	80,3	<0,001*
T24	883	88,3	<0,001*
T27	888	88,8	0,016*
T30	889	88,9	<0,001*
T33	924,5	92,45	<0,001*
T36	932	93,2	0,004*

A análise estatística mostrou que há diferença significativa em todos os pontos, exceto em T6. Isto aconteceu porque durante a maior parte dos tempos do experimento B, a proporção de células marcadas por anti-BrdU foi maior do que no experimento A. No entanto, o mais importante nestes experimentos é determinar em que momento o número de células marcadas tende a estabilizar. Este é o ponto utilizado nas análises, conforme descrito a seguir.

Os dados também foram analisados segundo Uzbekov *et al.* (1998), utilizando-se a média de cada ponto. O ponto no qual há tendência de estabilização no número de células marcadas deve ser considerado nos cálculos de duração do ciclo. A figura 18 mostra que esse ponto é T27, onde 88,8% dos núcleos estavam marcados. Esse tempo corresponde à diferença entre a duração total do ciclo (T) e a duração da fase S (S). Assim: T – S = 27. Para os cálculos propostos por Uzbekov e col (1998), também é necessário conhecer a quantidade aproximada de células em S em uma população crescendo normalmente. Para tanto, basta um pulso de BrdU por uma hora e fixação a seguir. O valor obtido em dois experimentos independentes, é de 36,75% de núcleos marcados.

Portanto, S/T = proporção inicial de células em S / proporção de células ciclando: 0,367/0,888 = 0,413. Assim,

S/T = 0,413;

T – S = 27;

Resolvendo o sistema de equações:

T = 27/ 1-0,413 = **46 horas**

S = 0,413 x 46 = **19 horas**.

A duração da mitose foi calculada com base no índice mitótico médio obtido em culturas controles dos diversos experimentos apresentados, cujo valor é 2,45%. O cálculo considerou a proporção de células em mitose e a duração do ciclo inteiro (UZBEKOV *et al.*, 1999). Assim, 0,0245 x 46 = 1 h 07 min, ou seja, a duração de **M é de 1h 07 min**. A duração de G1 foi feita por subtração das outras fases. O ciclo todo dura 46 horas e todas as outras fases juntas somam 24,5 horas, portanto, a duração de **G1** é de 21,5 horas ou **21 h 30 min**.

4.4 Avaliação do efeito do duplo bloqueio em células A549

Inicialmente, apenas o bloqueio com vincristina foi avaliado. As células foram submetidas a tratamentos com 0,05 μg/mL por 12, 24, 48 e 72 horas. Os índices mitóticos obtidos foram 3,4%, 4,8%, 0,9% e 0%, respectivamente. Portanto, não houve elevação do número de células em mitose e a droga causou severas alterações morfológicas na população celular.

Diante do exposto, uma nova metodologia para obtenção de populações sincrônicas foi avaliada. A alternativa para sincronização do ciclo celular foi o duplo bloqueio, utilizando privação de soro fetal bovino (SFB) e tratamento com vincristina. O protocolo incluiu um período de adaptação à ausência de SFB. Decorridas 24 horas do plaqueamento, o meio normal foi trocado por meio suplementado com 5% de SFB e as células permaneceram nessa condição por mais 24 horas. Então o soro foi reduzido a 1% e após igual período foi totalmente retirado. As células permaneceram nessa condição por 50 horas (tempo maior que a duração do ciclo). Após esse período, grande fração das células deveria estar em G0. Então o meio foi suplementado com 10% de SFB por 44 horas, tempo suficiente para cobrir a duração de G1, S e G2. A seguir, vincristina (0,05 μg/mL) foi adicionada ao meio por seis horas, tempo suficiente para que todas as células que estivessem entrando em mitose parassem nesta fase. As células foram fixadas imediatamente após o término do tratamento (T0) e após permanecerem seis, 18, 24 e 48 horas em recuperação em meio sem a droga. Então, as células foram submetidas à reação de imunofluorescência

com marcador de mitose (anti-histona H3 fosforilada) e analisadas ao microscópio de fluorescência. Em cada ponto, foram contadas 1000 células. A análise incluiu mitose, c-mitose, células binucleadas e multinucleadas e micronúcleos.

Na figura 18 é possível observar imagens de preparações que passaram pelo duplo bloqueio, com número elevado de c-mitoses. Essas células ficam mais arredondadas e num plano diferente dos núcleos interfásicos. O microscópio confocal de varredura a laser permite fazer secções óticas da preparação, tornando possível capturar imagens de planos diferentes. Essas imagens podem ser observadas no modo “código de profundidade” (Figura 18C), facilitando a visualização das células mitóticas e interfásicas em uma só imagem.

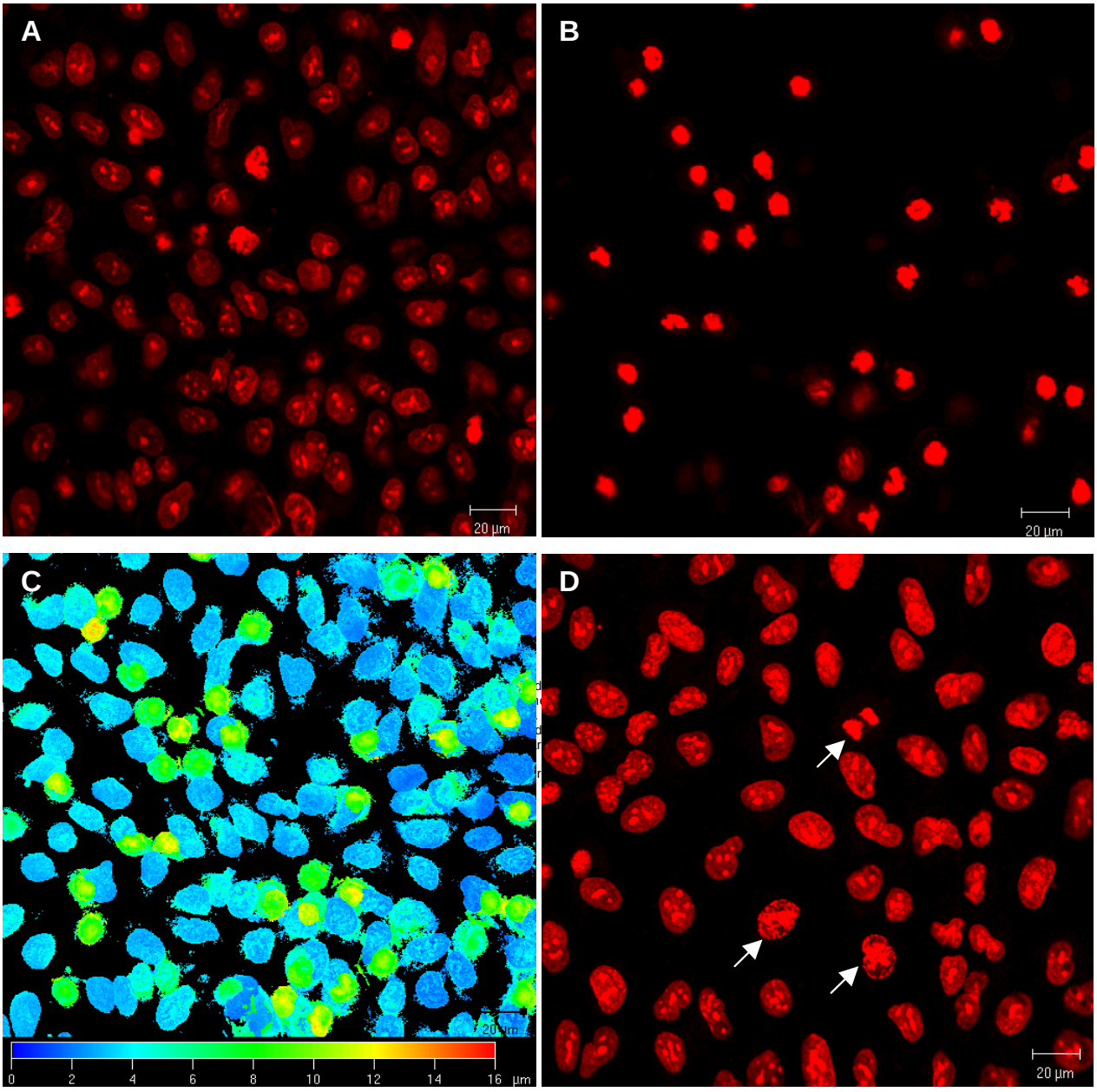


Figura 18. A, B e C: Células A549 submetidas a sincronização por duplo bloqueio. Imagens obtidas a partir de um mesmo campo, após fatiamento óptico. A: núcleos interfásicos observados na fatia n°8 (3,5 µm). B. c-mitoses visualizadas na fatia 17 (8 µm). C: código de profundidade, células em interfáse em azul e células mitóticas em verde. D: preparação controle, poucas mitoses são observadas (setas). Núcleos corados por iodeto de propídio. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

O tratamento para sincronização também alterou o padrão de crescimento celular. Após a privação de soro fetal bovino, a população apresentava-se distribuída em grupos, distantes entre si e alguns deles com células de tamanho reduzido.

Ao final do duplo bloqueio utilizando vincristina a 0,05 μg/mL, o número de c-mitoses estava acima de 200, ou seja, 21,1% da população havia sido bloqueada em mitose (Tabela III, Figura 19). Os controles passaram pelo mesmo tratamento descrito anteriormente, exceto a exposição a vincristina. Na cultura controle, a qual foi submetida apenas a carência de soro, o índice obtido foi de 4,2%. O número de c-mitoses foi máximo em T0, diminuindo nos tempos subseqüentes. Em T6, esse valor foi de 10,1%, ou seja, quase metade do número de mitoses em T0. Em T18, T24 e T48 a redução foi drástica, 0,4%, 0,2% e 0,1%, respectivamente. Por outro lado, observou-se aumento na população de células binucleadas e multinucleadas (Figura 20 C, D e E). Em T0 e T6 essas populações somadas representavam menos de 4% do total, já em T18, T24 e T48 esses valores alcançaram 18,9%, 16,6% e 12,1%, respectivamente (Tabela III).

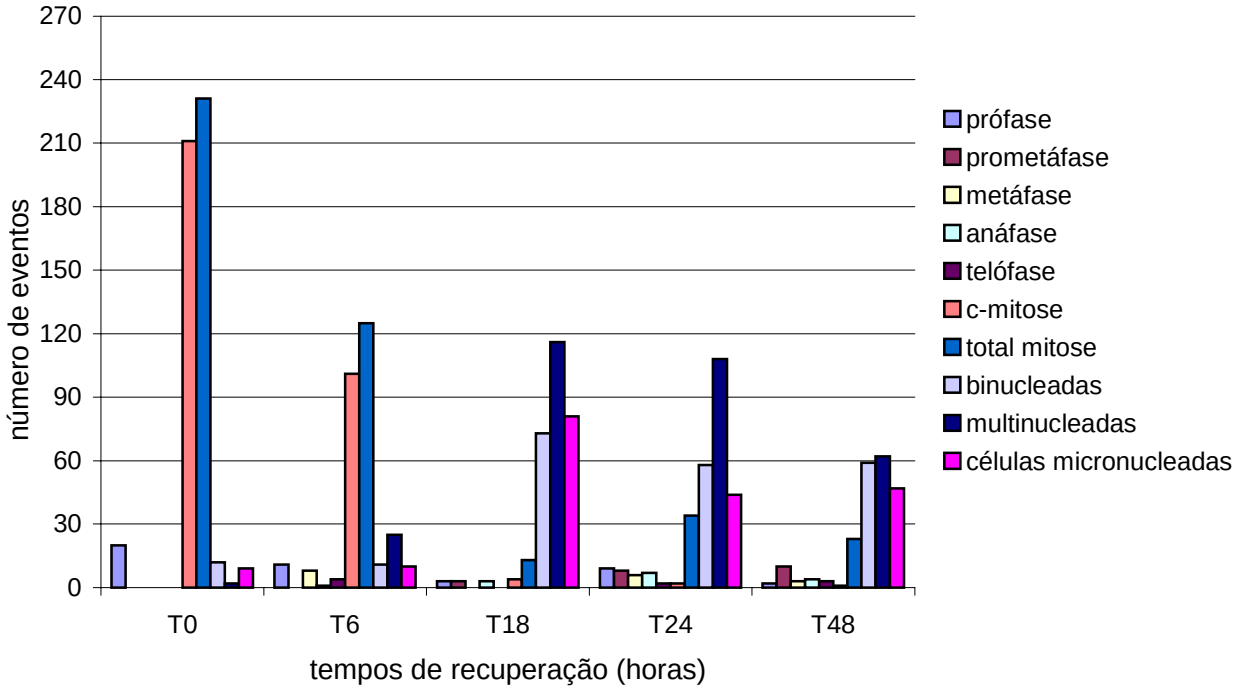


Figura 19. Efeito do duplo bloqueio (privação de SFB e vincristina 0,05 μg/mL) em células da linhagem A549. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células.

A proporção de células micronucleadas também seguiu esta tendência ao longo do experimento (Figuras 19 e 20 C, D e E). Em T0 e T6, as freqüências de micronúcleos esteve próxima do basal para A549, cerca de 1%, enquanto alcançou valor máximo em T18, com 8,1% das células apresentando pelo menos um micronúcleo. Em T24 e T48, esse valores foram, respectivamente, 4,4% e 4,7% (Tabela III).

Tabela III. Efeito do duplo bloqueio (privação de SFB e vincristina 0,05 μg/mL) em células A549. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células. Dados apresentados em números absolutos e porcentagem.

concentração	**T0**		**T6**		**T18**		**T24**		**T48**	
0,05 μg/mL	**total**	**%**	**total**	**%**	**total**	**%**	**total**	**%**	**total**	**%**
c-mitose	211	21,1	101	10,1	4	0,4	2	0,2	1	0,1
total mitose	231	23,1	125	12,5	13	1,3	34	3,4	23	2,3
binucleadas	12	1,2	11	1,1	73	7,3	58	5,8	59	5,9
multinucleadas	2	0,2	25	2,5	116	11,6	108	10,8	62	6,2
micronucleadas	9	0,9	10	1,0	81	8,1	44	4,4	47	4,7

A análise estatística mostrou que o aumento no número de c-mitoses observado entre T0 e T6 foi realmente significativo. O acréscimo no número de células binucleadas tornou-se importante em T18, com diminuição significativa em T24 e T48. A elevação no índice de multinucleação já é representativa em T6, mantendo-se nos dois tempos seguintes. A queda observada em T48 também é estatisticamente significativa em relação a T24. O número de células micronucleadas passa a ser relevante em T18, ocorrendo diminuição significativa em T24 e mantendo-se em T48.

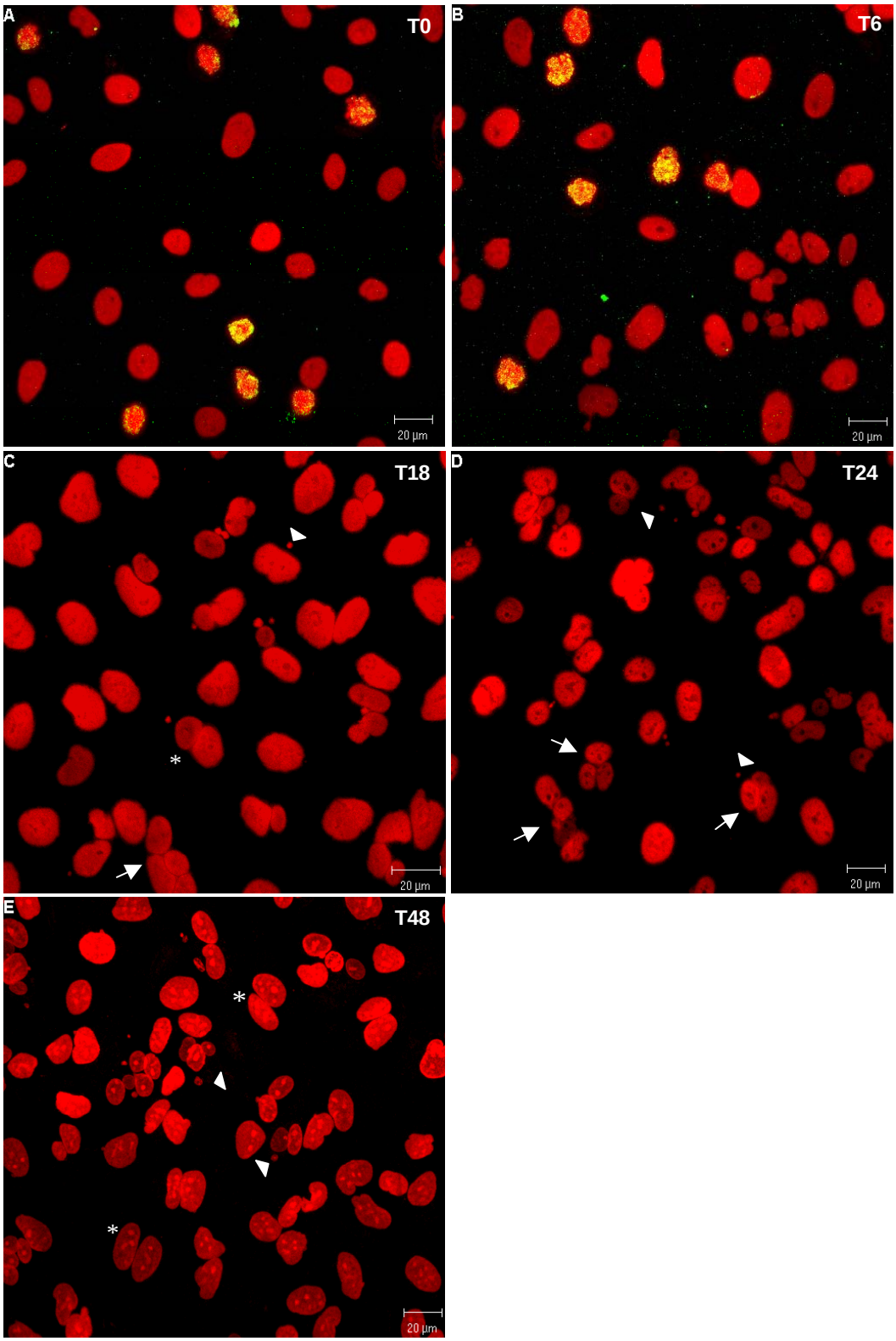


Figura 20. Aspecto das células A549 após duplo bloqueio por privação de soro fetal bovino e vincristina (0,05 µg/mL). Núcleos corados por iodeto de propídeo (vermelho) e marcação para histona H3 fosforilada (verde). C-mitoses em A e B. Setas: células multinucleadas; asteriscos: binucleadas; cabeças de setas: micronúcleos. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

Os dados obtidos até este ponto mostraram-se promissores, por isso, foram realizados estudos com outras concentrações de vincristina, além do acompanhamento das alterações morfológicas após a retirada da droga do meio.

A concentração máxima de vincristina (0,5 μg/mL) utilizada na segunda etapa do bloqueio trouxe perturbações mais severas à população celular. Em T0 e T6, é possível observar c-mitoses com cromossomos soltos (Figura 21 A e B). Diferentemente do observado no experimento anterior, a quantidade máxima de c-mitoses foi observada em T6 (Figura 22, Tabela IV). Nesse momento, 31,5% das células estavam bloqueadas, contra 14,4% em T0. Novamente, estes valores tendem a diminuir nos tempos posteriores: 1,0%, 1,8% e 0,4% em T18, T24 e T48, respectivamente. Com este tratamento, a quantidade de células binucleadas e multinucleadas também aumentou, totalizando 31,9% em T18, 45,8% em T24 e 53% em T48. Novamente, em T0 e T6, a freqüência de micronúcleos manteve-se próximo da basal. Em T18, o número de células micronucleadas foi semelhante ao observado para o tratamento com vincristina a 0,05 μg/mL. No entanto, em T24 e T48, esse valor subiu para 15,4% e 23,7%, respectivamente (Tabela IV).

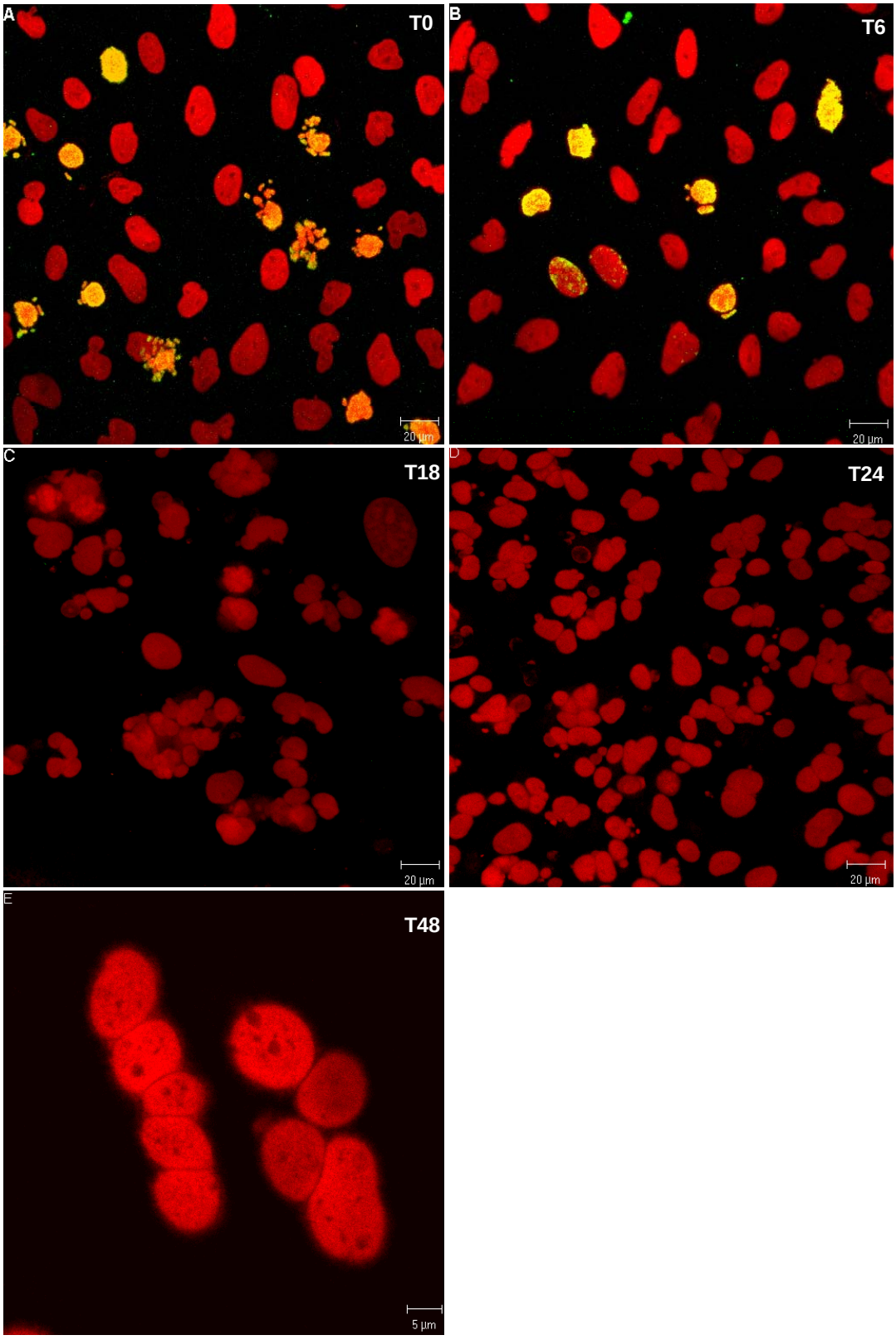


Figura 21. Aspecto das células A549 após duplo bloqueio por privação de soro fetal bovino e vincristina (0,5 µg/mL). Núcleos corados por iodeto de propídeo (vermelho) e marcação para histona H3 fosforilada (verde). Várias c-mitoses em A e B, com cromossomos soltos. Em C, núcleos com morfologia bastante alterada. Em D, duas células multinucleadas. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

Tabela IV. Efeito do duplo bloqueio (privação de SFB e vincristina 0,5 μg/mL) em células da linhagem A549. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células. Dados apresentados em números absolutos e porcentagem.

concentração 0,5 μg/mL	**T0**		**T6**		**T18**		**T24**		**T48**	
	total	%	total	%	total	%	total	%	total	%
c-mitose	144	14,4	315	31,5	10	1,0	18	1,8	4	0,4
total mitose	150	15,0	322	32,2	21	2,1	31	3,1	12	1,2
binucleadas	14	1,4	12	1,2	70	7,0	68	6,8	80	8,0
multinucleadas	1	0,1	1	0,1	249	24,9	390	39,0	450	45,0
micronucleadas	6	0,6	3	0,3	108	10,8	154	15,4	237	23,7

A análise estatística comprovou que o aumento de c-mitoses e mitoses observado entre T0 e T6 é significativo. Os valores observados entre T18 e T24 podem ser considerados semelhantes, enquanto a queda no número de mitoses e c-mitoses observada após T24 é relevante. O aumento de células binucleadas é estatisticamente importante em T18, já entre T18, T24 e T48 não houve diferença. A partir de T18, a elevação no total de células multinucleadas e micronucleadas é significativa em cada tempo analisado.

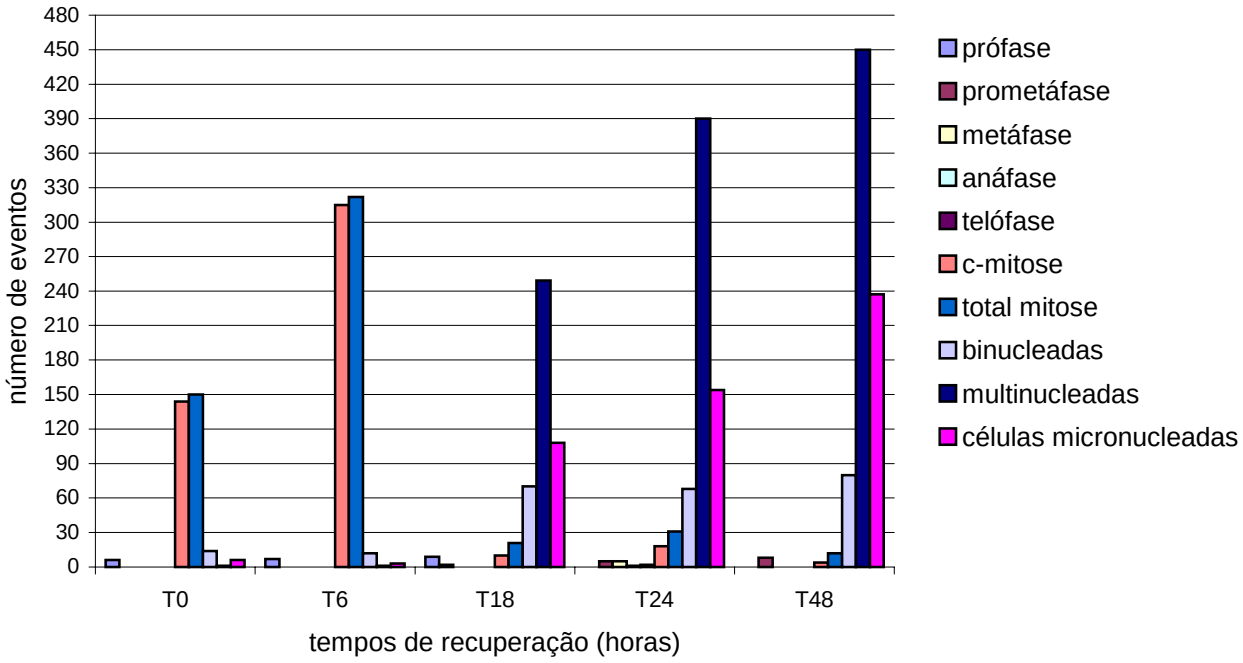


Figura 22. Efeito do duplo bloqueio (privação de SFB e vincristina 0,5 μg/mL) em células da linhagem A549. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células.

Os melhores resultados foram obtidos com duplo bloqueio utilizando vincristina na concentração intermediária de 0,1 μg/mL. Conforme é possível observar na figura 23 e tabela V, o número de c-mitoses foi mais elevado em T6, ponto no qual 33,8% da população estava bloqueada em mitose, contra 18% em T0. Não foram observadas c-mitoses em T18, T24 e T48. O valor observado em T6 é superior ao obtido com a concentração de 0,5 μg/mL. No entanto, a quantidade de células binucleadas e multinucleadas nos pontos

subseqüentes foi bem menor do que o relatado anteriormente. Em T18, T24 e T48 células com estes tipos de alterações representavam, respectivamente, 19%, 25,3% e 24,9% da população avaliada. A freqüência de micronúcleos foi intermediária em relação aos tratamentos com menor e maior concentração da droga. A tendência de aumento ocorreu a partir de T18, como nos experimentos anteriores. Neste ponto, 7,4% das células portavam micronúcleos. Em T24 eram 5,8% e em T48, 6,2%.

Tabela V. Efeito do duplo bloqueio (privação de SFB e vincristina 0,1 μg/mL) em células da linhagem A549. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células. Dados apresentados em números absolutos e porcentagem.

concentração	**T0**		**T6**		**T18**		**T24**		**T48**	
0,1μg/mL	total	%	total	%	total	%	total	%	total	%
c-mitose	180	18,0	338	33,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0
total mitose	197	19,7	350	35,0	12	1,2	11	1,1	18	1,8
binucleadas	21	2,1	21	2,1	58	5,8	92	9,2	103	10,3
multinucleadas	2	0,2	27	2,7	132	13,2	161	16,1	146	14,6
micronucleadas	7	0,7	7	0,7	74	7,4	58	5,8	62	6,2

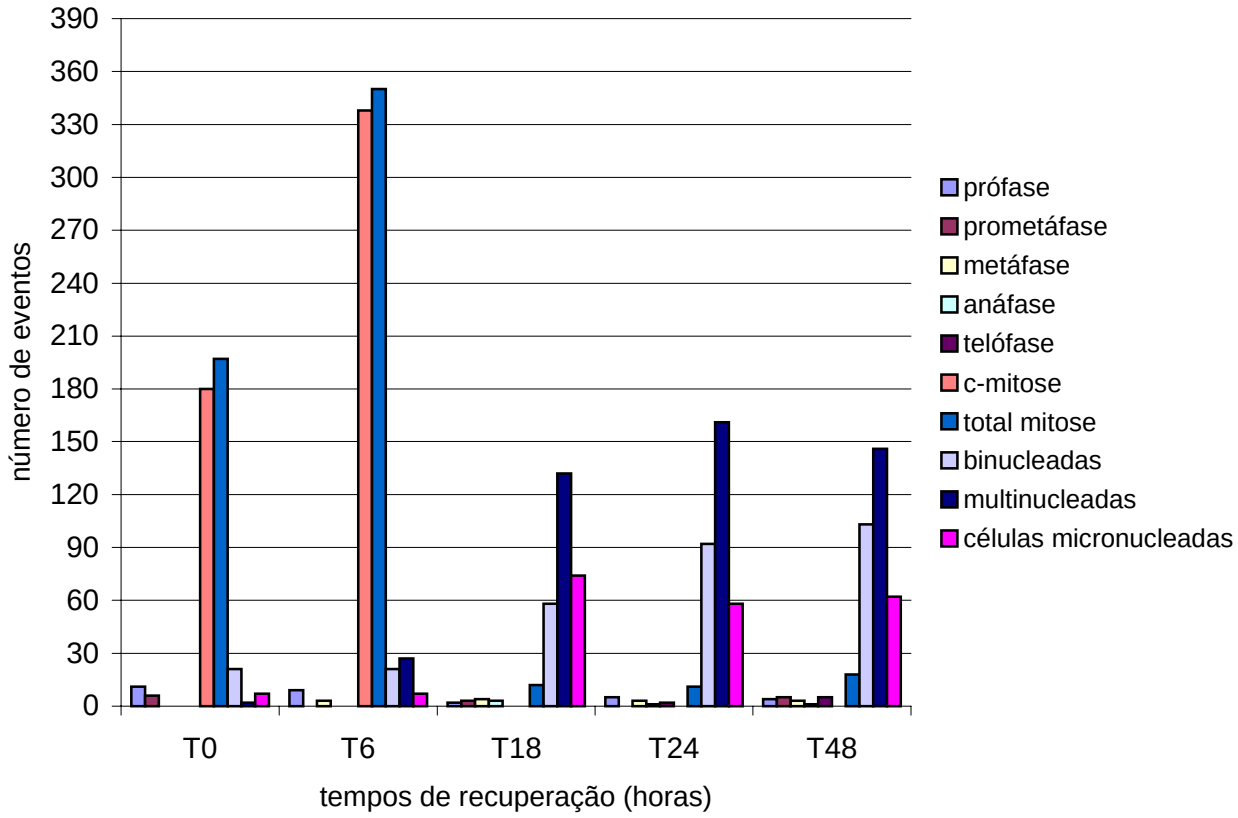


Figura 23. Efeito do duplo bloqueio (privação SFB e vincristina 0,1 μg/mL) em células da linhagem A549. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células.

A análise estatística mostrou que o aumento de c-mitoses observado entre T0 e T6 é significativo. O aumento de células binucleadas passou a ser significativo entre T6, T18 e T24. O valor observado em T48 pode ser considerado igual ao obtido em T24. O número de multinucleadas sofreu aumento significativo já em T6; a diferença observada entre T6 e T18 também foi significativa. As células micronucleadas sofreram aumento relevante entre T6 e T18, mantendo índices iguais nos demais tempos.

A comparação dos três protocolos mostrou que os melhores resultados foram obtidos após bloqueio por ausência de soro fetal bovino e tratamento com vincristina a 0,1 μg/mL. Por isso, o experimento foi repetido a fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados (Figura 24).

Os dados obtidos nos dois experimentos foram bastante coerentes, mantendo o padrão de elevadas freqüências de c-mitoses em T0 e T6 e de células binucleadas, multinucleadas e micronucleadas em T18, T24 e T48 (Tabela VI).

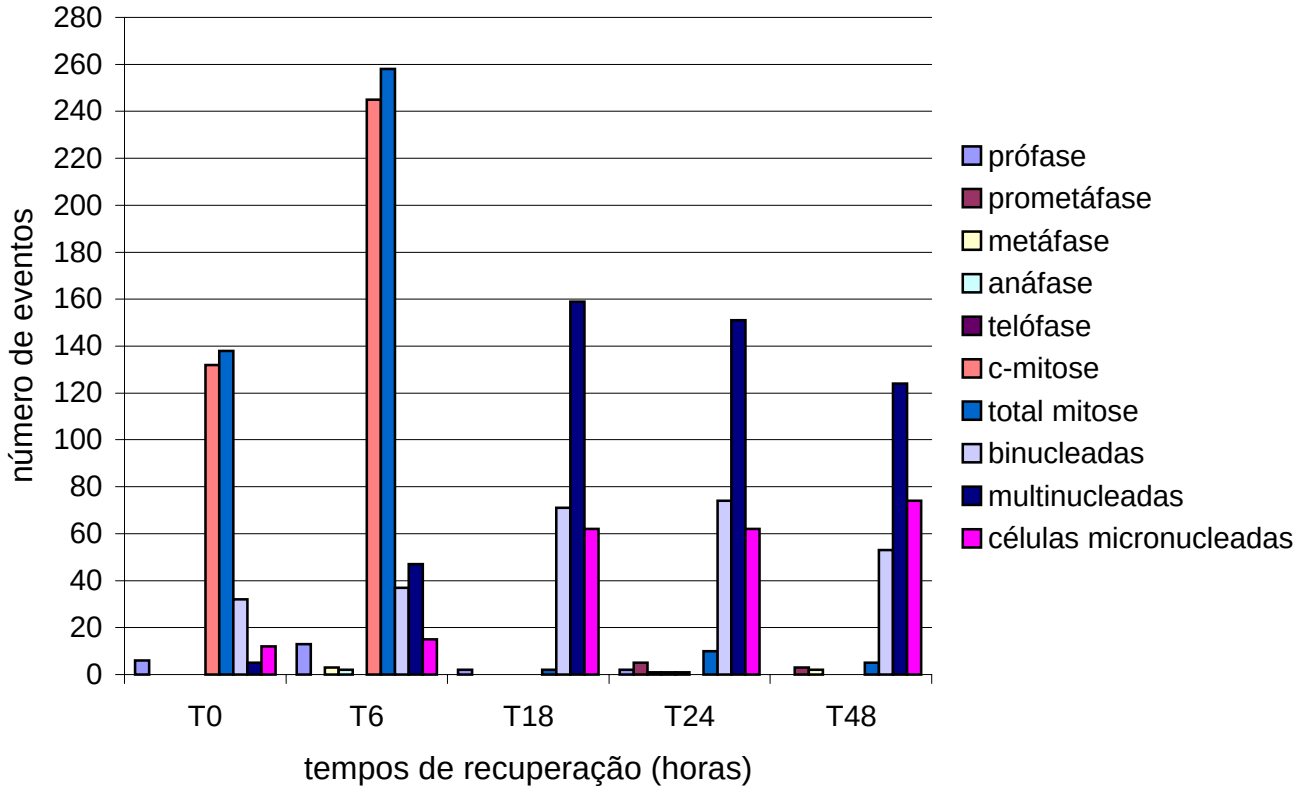


Figura 24. Efeito do duplo bloqueio (privação SFB e vincristina 0,1 μg/mL) em células da linhagem A549 – repetição do experimento. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células.

Tabela VI. Efeito do duplo bloqueio (privação de SFB e vincristina 0,1 μg/mL) em células A549 – repetição do experimento. Os tempos representam horas após o término do tratamento. Em cada ponto foram avaliadas 1000 células. Dados apresentados em números absolutos e porcentagem.

concentração 0,1ug/mL - repetiçao	**T0**		**T6**		**T18**		**T24**		**T48**	
	total	%	total	%	total	%	total	%	total	%
c-mitose	132	13,2	245	24,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0
total mitose	138	13,8	258	25,8	2	0,2	10	1,0	5	0,5
binucleadas	32	3,2	37	3,7	71	7,1	74	7,4	53	5,3
multinucleadas	5	0,5	47	4,7	159	15,9	151	15,1	124	12,4
micronucleadas	12	1,2	15	1,5	62	6,2	62	6,2	74	7,4

A avaliação estatística realizada para a repetição do experimento trouxe os mesmos resultados citados para o primeiro experimento.

Portanto, o protocolo escolhido para sincronização de A459 incluiu privação de SFB e tratamento com vincristina 0,1 μg/mL. Com esta abordagem metodológica, a freqüência de células bloqueadas em mitose foi a mais elevada e as alterações morfológicas observadas posteriormente foram menos drásticas, conforme se infere a partir da observação de alterações nucleares como binucleação e multinucleação na figura 25.

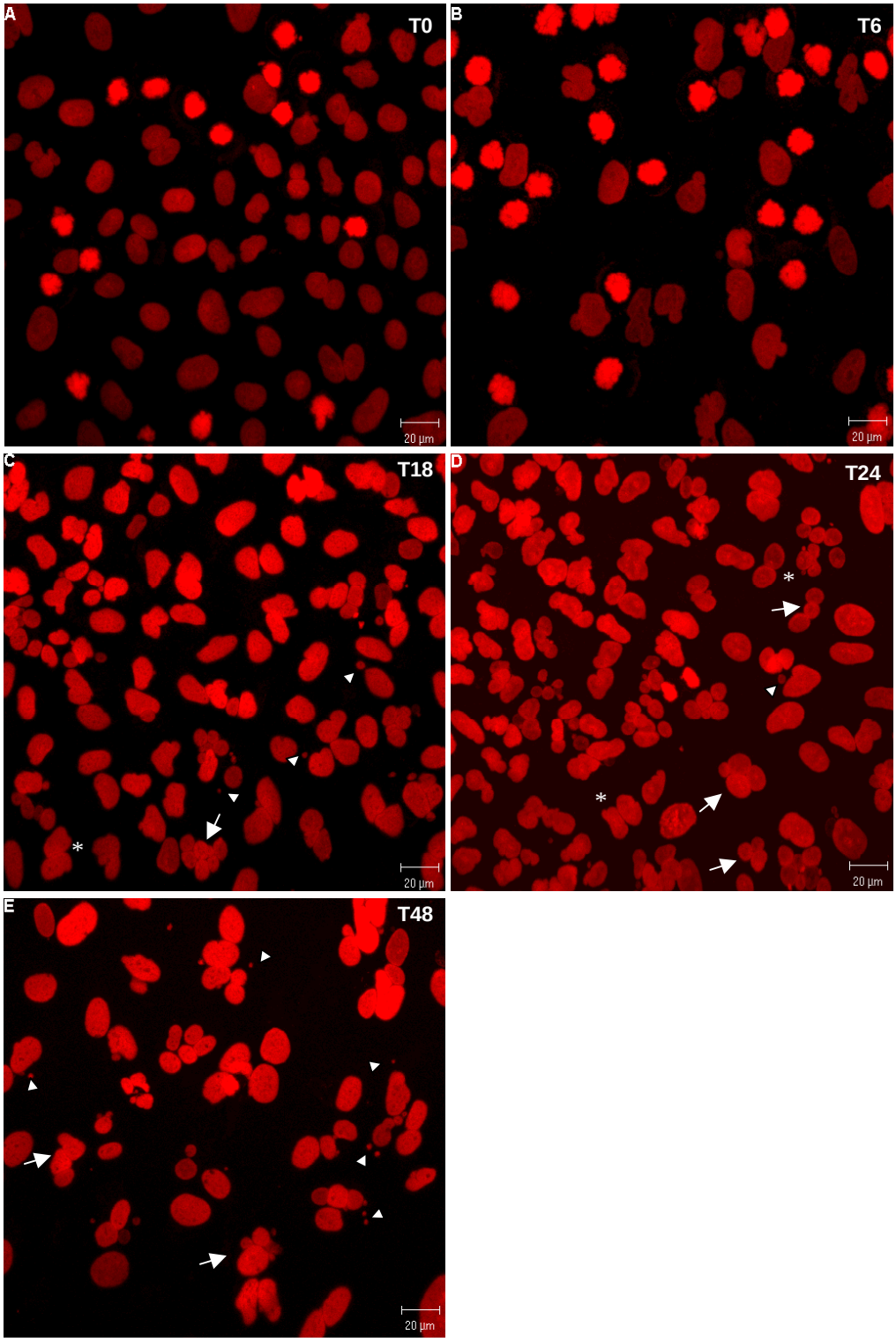


Figura 25. Aspecto das células A549 após duplo bloqueio por privação de soro fetal bovino e vincristina (0,1 µg/mL). Núcleos corados por iodeto de propídeo (vermelho). A marcação para histona H3 fosforilada não resistiu ao escaneamento. Em A e B, c-mitoses coradas mais intensamente. Setas: células multinucleadas; asteriscos: binucleadas; cabeças de setas: micronúcleos. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

4.5 Caracterização de elementos do citoesqueleto

4.5.1 Microtúbulos e filamentos de actina

A vincristina utilizada para o duplo bloqueio é uma droga que interfere na dinâmica dos microtúbulos. Portanto, a extensão do dano causado por sua utilização nas células da linhagem A549 foi avaliada por meio de imunofluorescência com anticorpos para as tubulinas α e β (Figura 26). A figura 26 C mostra que em c-mitoses, os microtúbulos apresentam-se reduzidos e desorganizados e os microfilamentos de actina parecem fragmentados. Em células multinucleadas, freqüentemente observadas 18 horas após a liberação do bloqueio, a marcação para tubulina também evidenciou alteração no padrão do citoesqueleto em relação a células interfásicas controle (figura 26 B e D). Nas células multinucleadas, os microtúbulos são mais curtos, fragmentados e não apresentam distribuição homogênea. A marcação para actina mostrou microfilamentos encurtados e concentrados em determinados pontos da célula multinucleada.

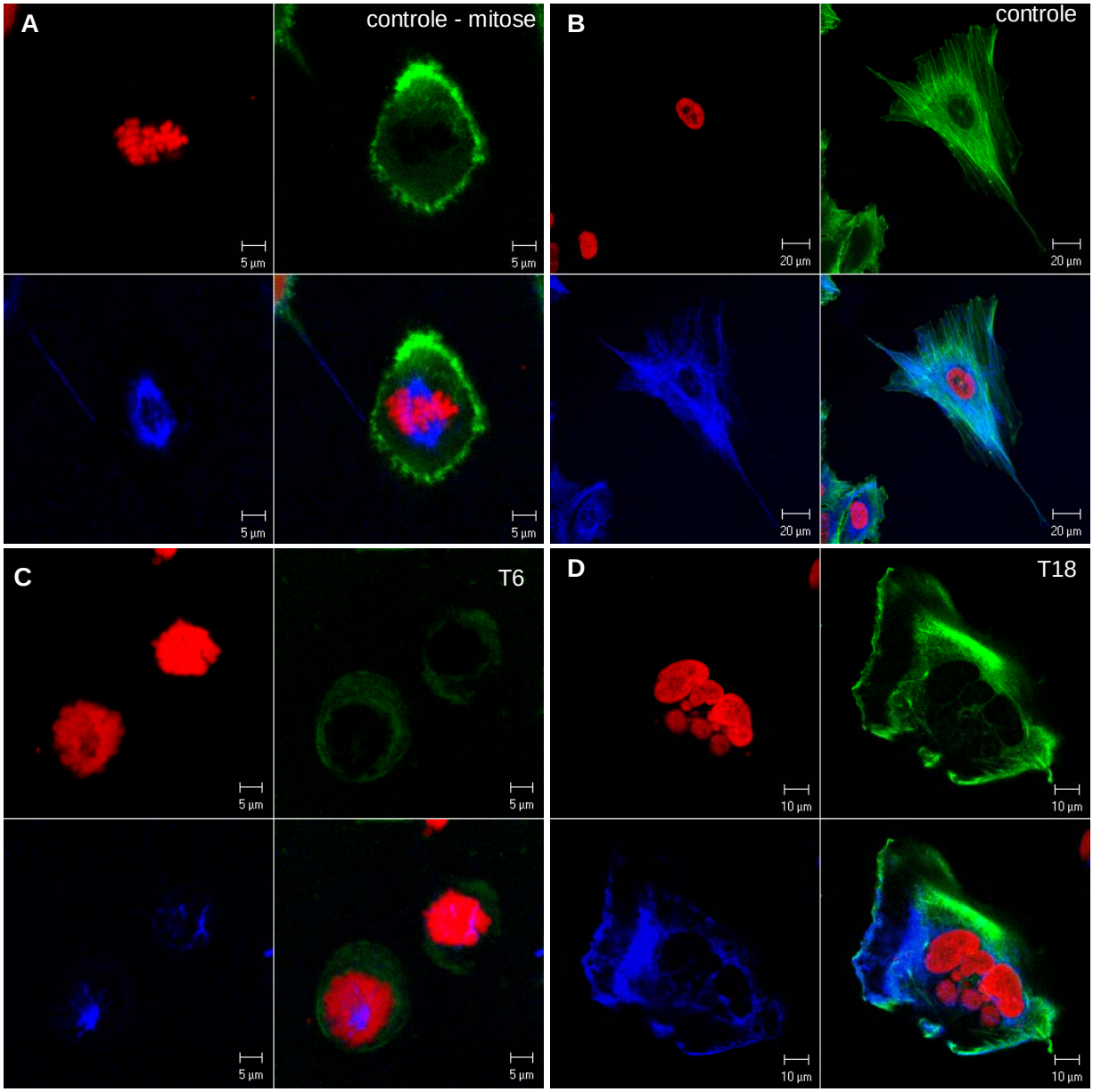


Figura 26. Células A549 submetidas a imunofluorescência para evidenciar tubulinas α e β (azul), núcleos corados por iodeto de propídio (vermelho) e actina em verde, após tratamento para sincronização. T6: c-mitoses com alterações no citoesqueleto. T18: células multinucleadas. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

4.5.2 Lamina B

Após o tratamento realizado para a obtenção da sincronização celular, as células foram fixadas e submetidas a imunofluorescência para lamina B. O objetivo foi caracterizar os micronúcleos com relação a constituição de seu envelope nuclear e verificar que as estruturas consideradas micronúcleos, após o tratamento de sincronização, realmente correspondiam ao esperado.

Morfologicamente, não há diferença entre os micronúcleos de preparações controles e aqueles visualizados após o tratamento. O mesmo padrão de marcação foi observado em todas as amostras analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser (Figura 27). Foram realizados experimentos em duplicata para análise do número de micronúcleos envoltos por lamina, conforme observa-se na tabela VII e figura 28. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os dois experimentos.

A grande parte das estruturas classificadas morofologicamente como micronúcleos estava envolta por lamina B, ou seja, possuía pelo menos um componente do envoltório nuclear. Nas preparações controle, entre 74% e 78% dos micronúcleos apresentavam marcação para lamina B. Este número apresentou pouca variação ao longo do experimento. Apenas no experimento A, em T18 e T48 houve diferença estatisticamente significativa entre estes tempos e o controle (Figura 28). Assim, a ausência prolongada de soro fetal bovino e o uso de vincristina não interferem de maneira importante na distribuição da lamina B, constituinte do envoltório nuclear dos micronúcleos.

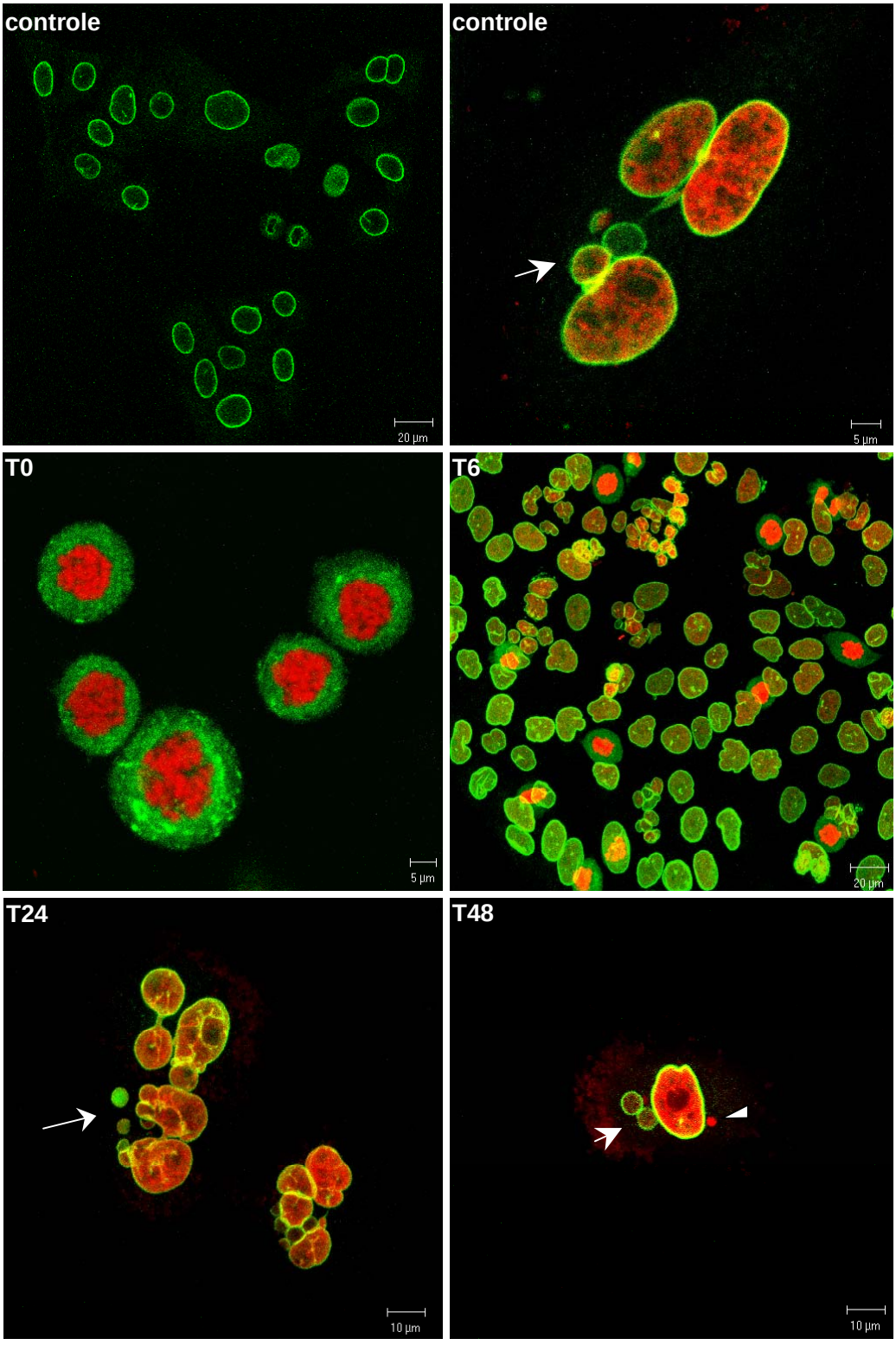


Figura 27. Células A549 submetidas a imunofluorescência para evidenciar a lamina B (verde) e núcleos corados por iodeto de propídio (vermelho), após tratamento para sincronização. T0: c-mitoses com lamina fragmentada. Setas apontam micronúcleos envoltos por lamina e cabeça de seta indica micronúcleo sem lamina. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

Tabela VII. Número total e porcentagem de micronúcleos envoltos por lamina B, em dois experimentos independentes, na linhagem A549. P-valores indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os experimentos.

	Exp A		Exp B		p-valor
	total	%	total	%	
controle	37	74,0	39	78,0	0,640
T0	37	74,0	40	80,0	0,476
T6	40	80,0	39	78,0	0,806
T18	47	94,0	42	84,0	0,110
T24	43	86,0	45	90,0	0,538
T48	44	88,0	41	82,0	0,401

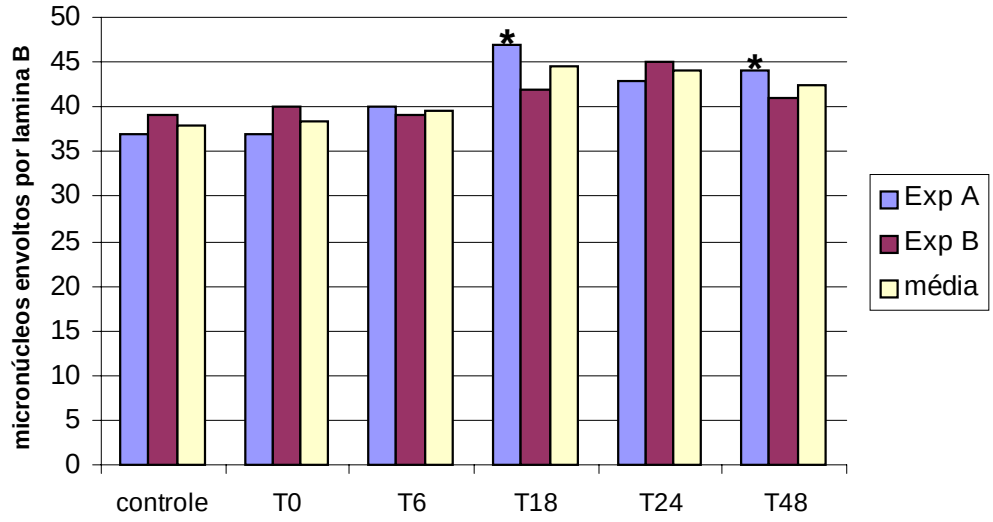


Figura 28. Número de micronúcleos envoltos por lamina B. Foram analisadas 50 estruturas em cada ponto, em dois experimentos independentes. ***** : presença de diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

4.6 Cinética do surgimento de micronúcleos em células sincronizadas

A etapa seguinte foi verificar em que momento os micronúcleos estavam surgindo após a sincronização. Para tanto, a incorporação de BrdU foi utilizada como um marcador e alguns esquemas experimentais foram propostos.

No primeiro experimento (Figura 29), denominado BrdU-A, o tratamento de sincronização completo foi feito. Na metade do tempo da recuperação em SFB 10%, foi dado um pulso de BrdU e as células foram fixadas 0, 6 e 18 horas após o fim do tratamento com vincristina (0,1μg/mL).

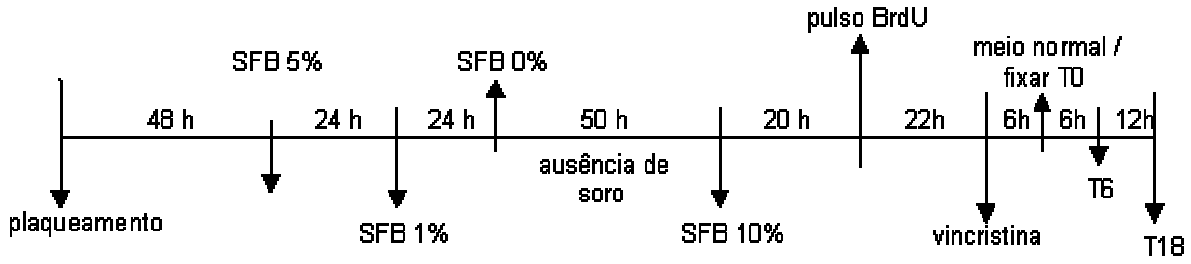


Figura 29. Esquema do experimento BrdU-A. O pulso de BrdU teve duração de uma hora. As células foram fixadas em T0, T6 e T18 e submetidas à reação de imunofluorescência com anti-BrdU.

Após a reação de imunofluorescência com anticorpo anti-BrdU, os seguintes aspectos foram avaliados: núcleos interfásicos, c-mitoses e micronúcleos. Também foram observadas células com núcleos não marcados, contendo micronúcleos marcados (núcleo-/MN+) e vice-versa (núcleo+/MN-). A figura 30 mostra as estruturas estudadas.

A tabela VIII e figura 31A mostram que houve um aumento gradativo na quantidade de núcleos positivos para BrdU. Em T0, 40,1% dos núcleos estavam marcados. Em T6 e T18 eram, respectivamente, 42,1% e 47,3%. O número de c-mitoses marcadas diminuiu ao longo do experimento. Eram 67% em T0, 64,6% em T6 e 44,8% em T18.

A análise estatística mostrou que não há diferença significativa no número de c-mitoses marcadas pelo BrdU entre T0 e T6, mas entre T6 e T18, a diferença é relevante.

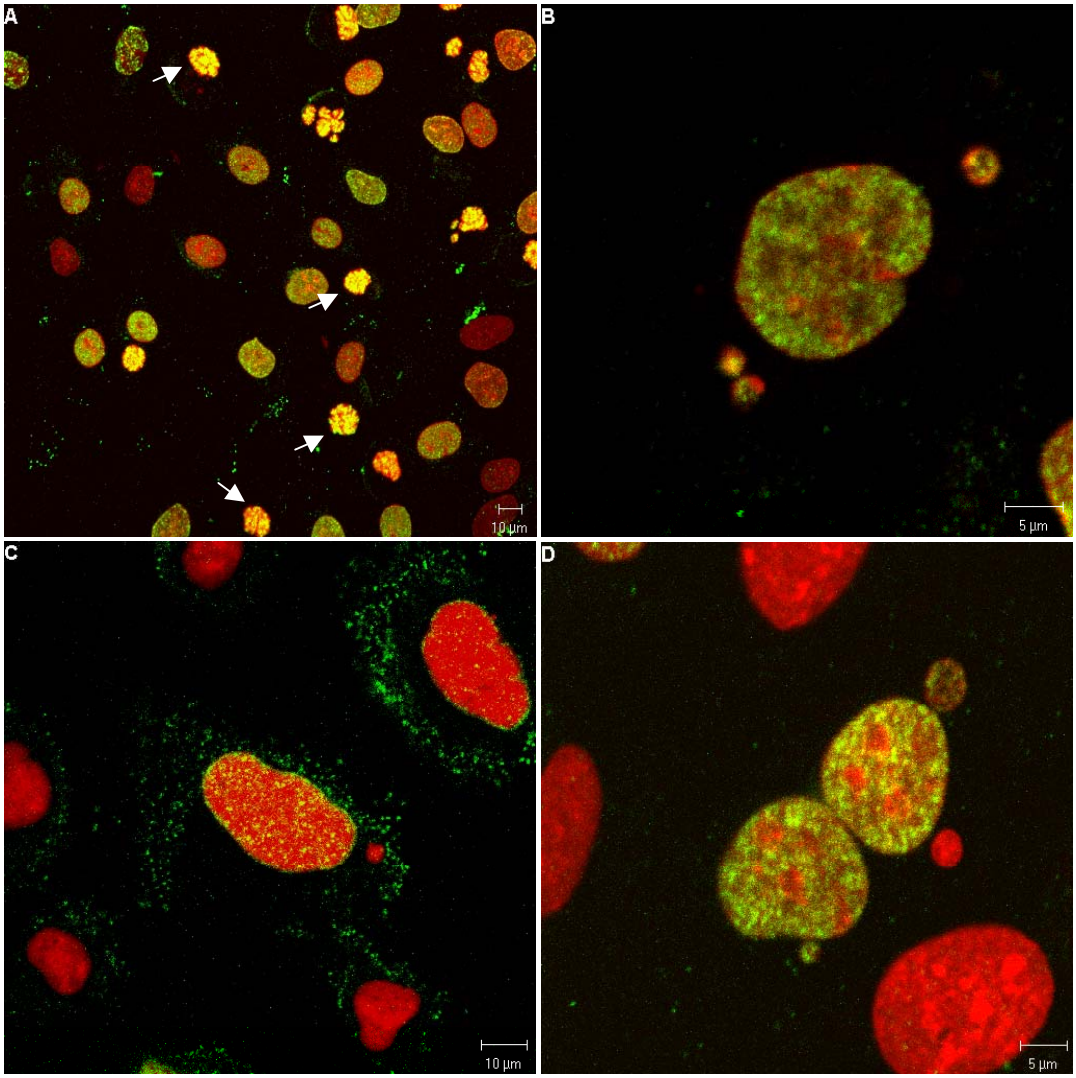


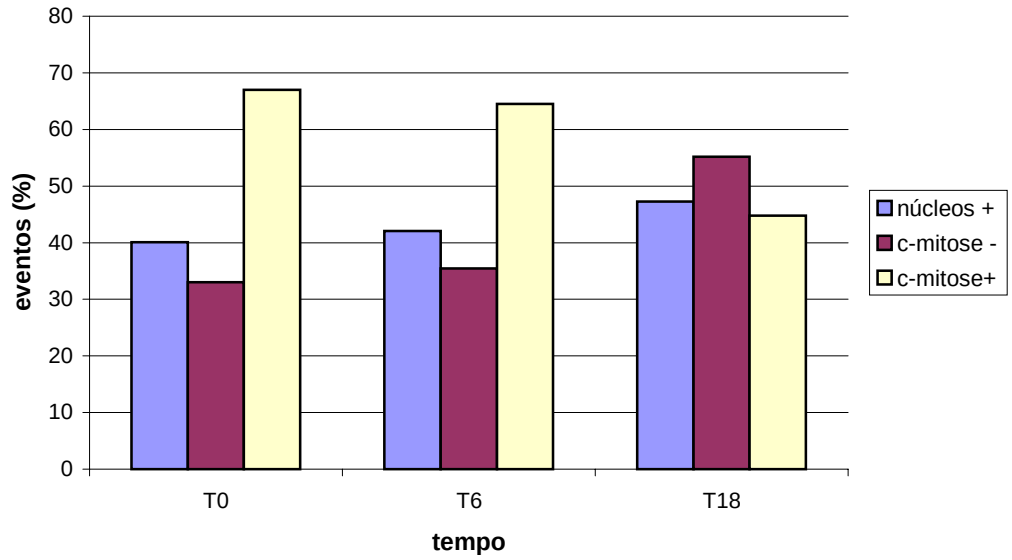
Figura 30. Células A549 submetidas a incorporação de BrdU durante o procedimento de sincronização. Núcleos corados por iodeto de propídeo (vermelho) e marcação com anti-Brdu (verde). A. Aspecto geral, setas indicam c-mitoses marcadas pelo anti-BrdU. B. Núcleo e micronúcleos marcados. C. Micronúcleo não marcado ao lado de núcleo com marcação. D. Núcleos marcados e micronúcleos com e sem marcação. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

Dentre os 100 micronúcleos analisados, 40% eram BrdU-positivos em T0, 23% em T6 e 36% em T18 (Figura 31B e Tabela VIII). Estes dados também receberam tratamento estatístico. A quantidade de micronúcleos marcados em cada um dos tempos difere estatisticamente entre si. Para os micronúcleos não marcados, a situação é oposta, não há diferença.

Tabela VIII. Experimento Brdu-A. O sinal + indica marcação positiva para BrdU e o sinal -, marcação negativa. Para núcleos e c-mitoses, 1000 células foram analisadas. Para micronúcleos, 100 destas estruturas foram avaliadas.

	T0	T6	T18
núcleos +	40,1%	42,1%	47,3%
c-mitose -	33%	35,47%	55,17%
c-mitose+	67%	64,56%	44,82%
Total c-mitose	100	327	29
MN +	40%	23%	36%
MN -	49%	67%	53%
núcleo - / MN +	3%	0	0
núcleo + / MN -	7%	10%	11%

A



B

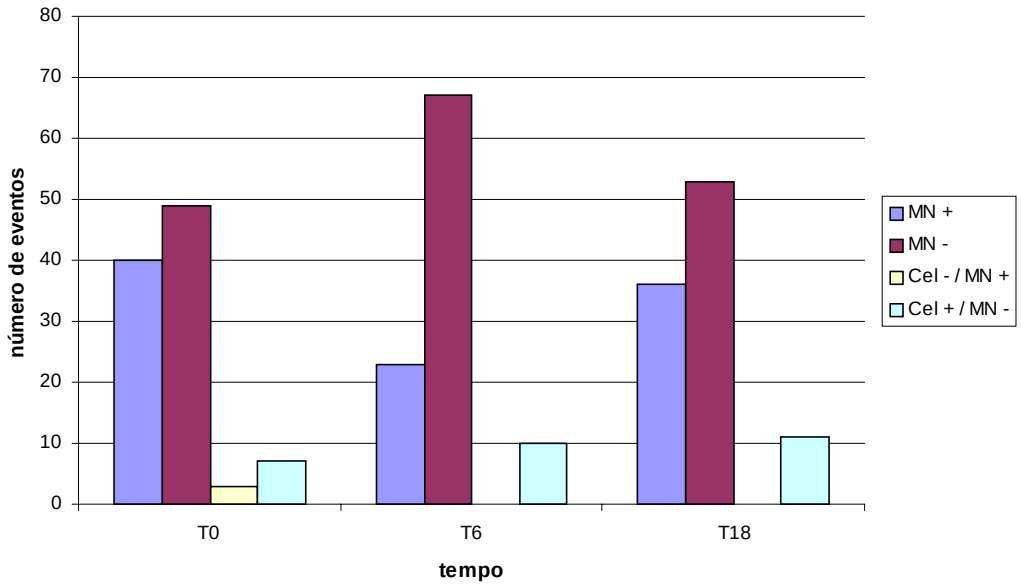


Figura 31. Número de núcleos, micronúcleos e c-mitoses observados no experimento BrdU-A, esquematizado na figura 29. O sinal + indica presença de marcação pelo anticorpo anti-BrdU e o sinal – indica ausência. **A.** Núcleos e c-mitoses. **B.** MN: micronúcleo. Cel-/MN+: núcleo sem marcação contendo micronúcleo marcado; Cel +/MN-:situação inversa.

Foram observadas células sem marcação para BrdU portando micronúcleos marcados apenas em T0. Esta é uma situação bastante rara e foi observada apenas quatro vezes em todos os experimentos. Células positivas para marcação com micronúcleos que não incorporaram BrdU também foram observadas em T0, T6 e T18. Não houve diferença estatística significativa entre cada tempo.

No experimento seguinte, BrdU-B, o pulso de BrdU foi dado na última hora do tratamento com vincristina, como mostra o esquema da figura 32.

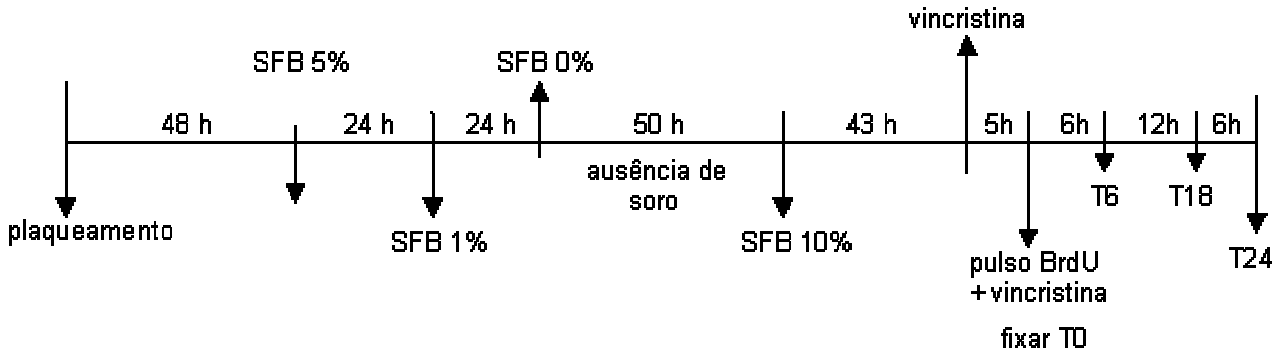


Figura 32. Esquema do experimento BrdU-B. O pulso de BrdU teve duração de uma hora. As células foram fixadas em T0, T6, T18 e T24 e submetidas a reação de imunofluorescência com anti-BrdU.

Os dados apresentados na tabela IX e figura 33 apontam um aumento no número de núcleos interfásicos com marcação positiva para BrdU ao longo do ensaio, variando de 36,3% a 62,4%. Em T0, nenhuma c-mitose apresentava marcação para BrdU. Já em T6, T18 e T24, 10,4%, 80% e

66,6% das c-mitoses, respectivamente, apresentavam marcação positiva. Tanto para núcleos interfásicos, quanto para c-mitoses, há diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos analisados.

O número de micronúcleos marcados pelo anti-BrdU foi sempre menor do que o número destas estruturas não marcadas. Durante os tempos analisados, há uma tendência de aumento de micronúcleos marcados. Em T0 eram 24%, em T6, 34% e em T18 e T24 eram, respectivamente, 47% e 43%. Há diferença estatisticamente significativa entre T6 e T18, para micronúcleos marcados por BrdU.

Tabela IX. Experimento Brdu-B. O sinal + indica marcação positiva para BrdU e o sinal -, marcação negativa. Para núcleos e c-mitoses, 1000 células foram analisadas. Para micronúcleos, 100 destas estruturas foram avaliadas.

	T0	T6	T18	T24
núcleos +	36,3%	56,2%	69,7%	62,4%
c-mitose -	100%	89,6%	20%	33,3%
c-mitose+	0	10,4%	80%	66,6%
Total c-mitose	118	203	10	3
MN +	24%	34%	47%	43%
MN -	61%	53%	51%	51%
núcleo - / MN +	1%	0	0	0
núcleo + / MN -	14%	13%	2%	6%

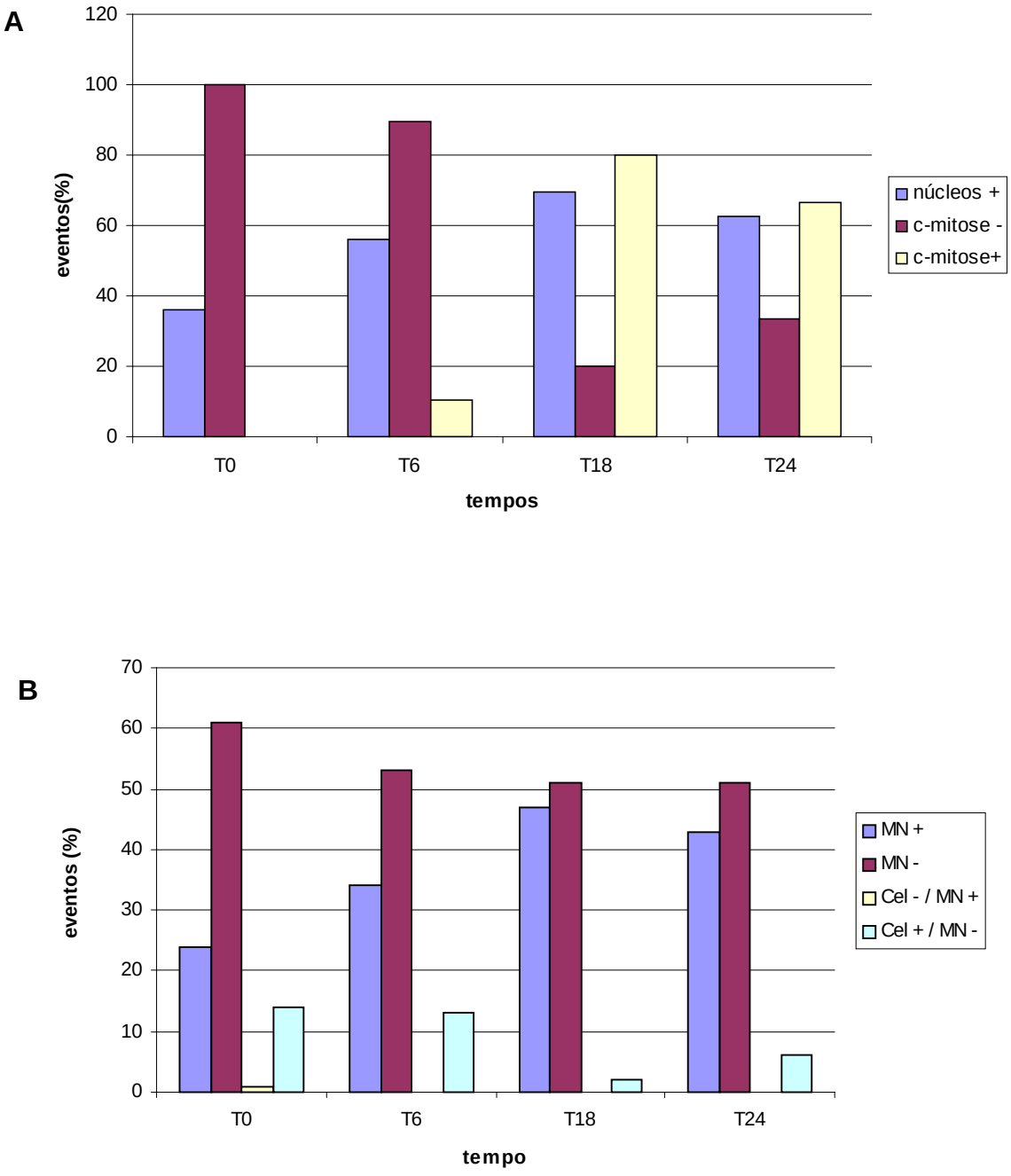


Figura 33. Número de núcleos, micronúcleos e c-mitoses observados no experimento BrdU-B, esquematizado na figura 32. O sinal + indica presença de marcação pelo anticorpo anti-BrdU e o sinal – indica ausência. **A.** Núcleos e c-mitoses. **B.** MN: micronúcleo. Cel -/MN+: núcleo sem marcação contendo micronúcleo marcado; Cel +/MN -:situação inversa.

Novamente foram observados micronúcleos sem marcação para BrdU ao lado de núcleos marcados. Em T0 foram 14%, em T6 13%, em T18 2% e em T24 foram 6%. O inverso foi observado apenas uma vez neste experimento.

No experimento BrdU-C, o pulso de BrdU foi dado 12 horas após a liberação do bloqueio, ou seja, 12 horas após o tratamento com vincristina. As células foram fixadas imediatamente após o pulso (T12), 18 (T18) e 24 (T24) horas após o término do tratamento de sincronização (Figura 34).

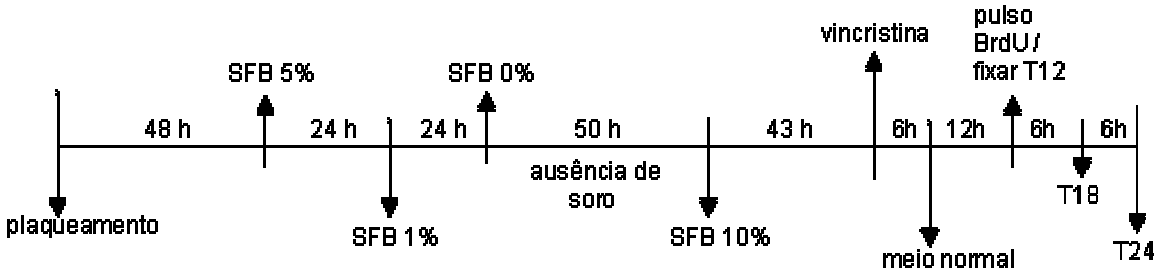


Figura 34. Esquema do experimento BrdU-C. O pulso de BrdU teve duração de uma hora. As células foram fixadas em T12, T18 e T24 e submetidas à reação de imunofluorescência com anti-BrdU.

Os dados deste experimento estão expressos na tabela X e figura 35. Logo após o pulso de BrdU, apenas 8,7% dos núcleos estavam em fase S. Em T18, neste caso seis horas após o pulso, 13,6% das células eram positivas para a marcação e em T24, eram 28,5% dos núcleos. A diferença

estatística é significativa em todos os tempos. Apenas uma c-mitose positiva em T24 foi observada.

Em todos os tempos analisados, o número de micronúcleos sem marcação esteve próximo de 90%. Não há diferença estatística significativa quando são comparados os resultados de cada tempo para cada tipo de evento estudado. Apenas núcleos positivos para marcação portando micronúcleos negativos foram observados. Não houve registro da situação inversa.

Tabela X. Experimento Brdu-C. O sinal + indica marcação positiva para BrdU e o sinal -, marcação negativa. Para núcleos e c-mitoses, 1000 células foram analisadas. Para micronúcleos, 100 destas estruturas foram avaliadas.

	T12	T18	T24
núcleos +	8,7%	13,6%	28,5%
c-mitose -	100%	0	0
c-mitose+	0	0	100%
Total c-mitose	11	0	1
MN +	3%	8%	6%
MN -	94%	90%	91%
núcleo - / MN +	0	0	0
núcleo + / MN -	3%	2%	3%

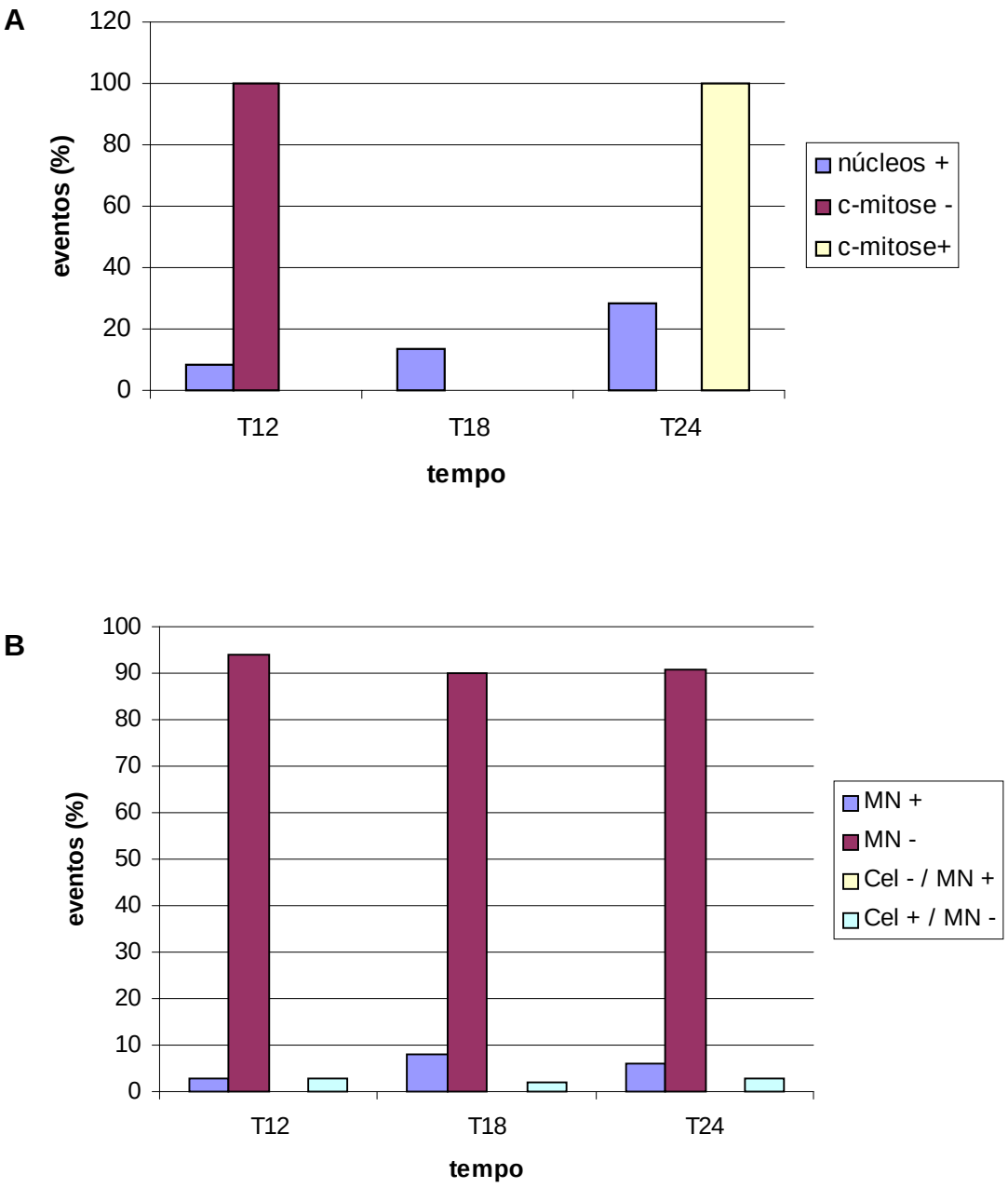


Figura 35. Número de núcleos, micronúcleos e c-mitoses observados no experimento BrdU-C, esquematizado na figura 34. O sinal + indica presença de marcação pelo anticorpo anti-BrdU e o sinal – indica ausência. **A.** Núcleos e c-mitoses. **B.** MN: micronúcleo. Cel -/MN+: núcleo sem marcação contendo micronúcleo marcado; Cel +/MN -:situação inversa.

4.7 Caracterização do conteúdo dos micronúcleos

O conteúdo dos micronúcleos foi estudado por meio de hibridizações *in situ* (FISH), utilizando o gene EGFR como sonda. Os resultados obtidos indicam presença de marcação no interior de micronúcleos e também em núcleos interfásicos. A figura 36 mostra micronúcleos marcados em células controle e em células que passaram pelo duplo bloqueio para sincronização. É possível notar marcação bastante evidente, indicativa de que cópias do gene EGFR podem ter sido expulsas da célula pela formação de micronúcleos.

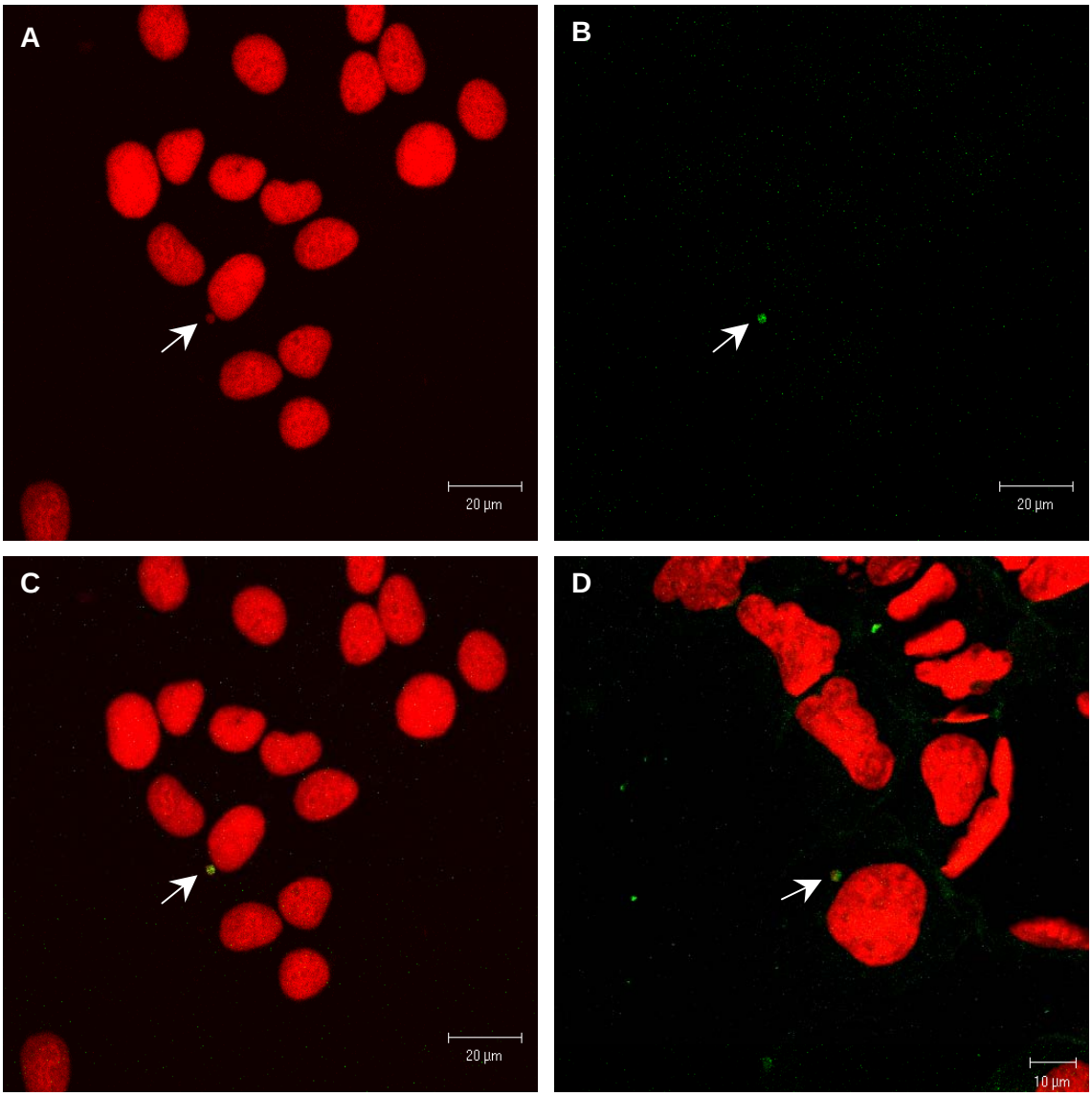


Figura 36. Hibridização fluorescente *in situ* com a sonda EGFR. A, B e C: células controle.A. marcação dos núcleos (vermelho), B. marcação da sonda (verde), C. sobreposição de A e B. D: células submetidas ao tratamento para sincronização por privação de soro fetal bovino e vincristina (0,5 µg/mL), 6 horas após a liberação do bloqueio. Setas indicam micronúcleos marcados pela sonda. Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser.

5 DISCUSSÃO

A duração do ciclo celular pode variar grandemente em função do tipo de célula ou tecido, fase do desenvolvimento ou situação metabólica do organismo. De modo geral, fibroblastos humanos em cultura gastam em torno de 24 horas para completar um ciclo celular. Quando estão proliferando rapidamente, a duração média da fase G1 é de 11 horas, S dura oito horas, G2 cerca de quatro horas e M dura uma hora (COOPER, 2000). Células HeLa têm um ciclo de 19h30 e G1, S, G2 e M duram, respectivamente, 8h15, 6h15, 4h30 e 30 minutos (UZBEKOV *et al.*, 1998). Já células embrionárias em estágio iniciais podem ter ciclos muito mais curtos, durando 30 minutos ou menos, com G1 e G2 ausentes e fase S muito curta, seguida pela mitose. Células mesodermais e ectodermais de roedores possuem duração de ciclo variando entre três e sete horas, dependendo do estágio considerado (MAC AULEY *et al.*, 1993).

O ciclo das células A549 é muito mais longo do que o esperado para células humanas em cultura. Para completar um ciclo, a linhagem A549 precisa de quase o dobro de tempo em relação às células humanas típicas. Normalmente, para células de vertebrados em cultura, a duração da fase S abrange cerca de 40% da duração total do ciclo. O tempo necessário para que a linhagem A549 complete a fase S representa 41,3% da duração de seu ciclo, portanto, consistente com a literatura. Wilson *et al.* (1988), estudando a cinética celular de diversos tumores através da incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina, verificaram que há grande variação na duração de S, dependendo do tipo de tumor considerado. Os valores obtidos variaram entre

5,8 e 30,7 horas, mas são semelhantes entre tumores originados do mesmo tecido. A duração média de S nos tumores de pulmão analisados alcançou 24 horas. Esse valor é próximo do obtido para as células A549 (19 horas).

O índice de marcação em A549 obtido após o pulso de BrdU por uma hora foi de 36,75%, representando a população de células em fase S. Em uma cultura assincrônica, entre 30 e 40% das células estarão nesta fase em qualquer instante. Chang e colaboradores (2004), estudaram o ciclo celular de A549 por citometria de fluxo e verificaram que entre 32,1 e 38,9% das células analisadas estavam em S. Os mesmos autores verificaram que cerca de 54% da população estava em G1, indicando, portanto, que a duração dessa fase em A549 é bastante longa.

O conhecimento da duração de cada uma das fases do ciclo celular de uma linhagem específica é uma excelente ferramenta para a determinação de protocolos de sincronização. Células sincronizadas têm tido grande aplicação em diversos trabalhos, como por exemplo, o estudo da expressão de diferentes proteínas ao longo do ciclo celular e das mudanças moleculares e bioquímicas que acontecem durante esse período. O modo mais simples de se obter uma população de células sincronizadas é por meio de drogas que bloqueiam o ciclo em pontos específicos. No entanto, os métodos devem ser padronizados para cada tipo celular, considerando a duração de cada fase do ciclo e a variabilidade das respostas de cada linhagem ao tratamento utilizado.

Várias drogas têm sido utilizadas para essa finalidade. Timidina, afidicolina, mimosina, hidroxiuréia e 5-fluorodesoxiuridina são utilizadas para bloquear o ciclo celular em S. N-acetil-leucil-leucil-norleucinal (ALLN), nocodazole, colchicina, e colcemide param o ciclo na mitose. Já lovastatina e Hoechst 768159 podem causar bloqueio em G1 (revisões desses métodos em UZBEKOV, 2004). O uso de substâncias químicas para sincronização pode trazer perturbações à célula, como mudanças em seu estado metabólico e dissociação de eventos citoplasmáticos e nucleares. Muitas dessas drogas causam apoptose e outras podem levar a poliploidização, como por exemplo, o nocodazole (KUNG *et al.*, 1990; URBANI *et al.*, 1995).

Uma alternativa a essas drogas são os métodos físicos, os quais trazem menos perturbações às células. Esses métodos incluem a separação de células por citometria. Nessa técnica, as células devem ser coradas com corantes vitais e separadas em um citômetro, de acordo com a intensidade da coloração, a qual é diretamente proporcional à ligação do corante ao DNA (RICE *et al.,* 1984). Porém, é difícil separar células em G2 daquelas que estão em mitose somente com base na quantidade de DNA, havendo necessidade de tratamentos adicionais. A elutriação por centrifugação permite separar células em G1, G2 e S de acordo com seu tamanho e diferentes densidades de flotação durante a centrifugação, mas, geralmente, as frações obtidas não são puras, a menos que se associe o uso de agentes químicos (KIM *et al.*, 1999). A obtenção de células mitóticas pode ser feita através de “shake-off”. Esse método baseia-se no fato de células mitóticas

normalmente estarem pouco aderidas e serem facilmente soltas do substrato. Outra alternativa é a obtenção de frações ricas em células em G0/G1, prolongando o tempo de culturas que apresentam densidade de saturação ou retirando o soro fetal bovino do meio de cultivo (DAVIS *et al.*, 2001; UZBEKOV, 2004).

O resfriamento ou tratamento hipotérmico tem sido utilizado na sincronização de diversas linhagens. As respostas celulares ao frio, além de alterações na progressão do ciclo, abrangem desnaturação e desarranjo de proteínas, inibição de transcrição e tradução, alterações nos elementos do citoesqueleto e mudanças na permeabilidade da membrana plasmática (SONNA *et al.*, 2002).

Boucher & Norman (1980) utilizaram esse tipo de tratamento em granulócitos imaturos de pacientes com leucemia aguda não linfoblástica e com leucemia mielóide crônica. Os autores obtiveram freqüência aumentada de células em mitose, principalmente em metáfase e sugerem esse tratamento para estudos citogenéticos de rotina. Utilizando células de ovário de hamster chinês, Yoon *et al.* (2003) verificaram que o tratamento a 30ºC e 33ºC causava acúmulo de células em G0/G1 após 24 horas de cultura, aumentando ainda mais após 78 horas de cultivo nessas temperaturas. No entanto, esses resultados ficam comprometidos pelo fato dessas células terem sido cultivadas na ausência de soro.

Dewey (1987) submeteu células HP2 a 8ºC durante a transição G0/G1 e observou que essas células apresentavam atraso para entrar em S.

Quando o tratamento hipotérmico foi feito a 25ºC, o atraso era superior ao período em que as células haviam sido submetidas à hipotermia. O autor ainda observou que culturas submetidas à baixa temperatura na passagem de G0 para G1 apresentavam maior número de células em fase S.

No presente trabalho, células A549 foram submetidas à 15ºC e apresentaram queda no número de células em fase S, quando comparadas aos controles. Os resultados obtidos nos dois experimentos com BrdU indicam que o tratamento hipotérmico inibe a síntese de DNA, possivelmente atrasando a progressão das células pelo ciclo. Aparentemente, esses dados independem da concentração de BrdU utilizada e apontam para um possível atraso da transição S/G2 após o tratamento hipotérmico.

Houve, ainda, um pequeno aumento do índice mitótico, avaliado por duas metodologias diferentes. O uso do marcador de mitose tornou a análise mais fácil e precisa, em relação ao uso de preparações coradas com iodeto de propídio, permitindo, inclusive, melhor distinção entre cada uma das fases da mitose. Os índices obtidos com esse marcador foram maiores que os obtidos pela metodologia tradicional. Apesar disso, os índices alcançados não foram suficientes para afirmar que o método foi eficiente na obtenção de populações sincrônicas.

As respostas quanto ao ciclo celular são bastante variáveis e, provavelmente, dependentes da linhagem considerada, da temperatura e do tempo de exposição. Em recente revisão, Rieder & Cole (2002) afirmam que

o bloqueio do ciclo em células submetidas a hipotermia pode acontecer em G2 ou M, dependendo dos fatores considerados acima.

Esse trabalho e os demais citados anteriormente indicam que a sincronização de células em qualquer fase do ciclo é dependente de vários aspectos, como o agente utilizado e o tempo de tratamento. Além disso, linhagens celulares diferentes podem apresentar resultados diversos quando a mesma metodologia é utilizada.

Os resultados apresentados anteriormente demonstram a grande dificuldade para obtenção de populações celulares sincrônicas em A549 por hipotermia. Evidentemente, um novo método de sincronização, possivelmente utilizando agentes químicos, deveria ser testado. A obtenção de populações sincrônicas em células tumorais é bastante complicada pelo fato destas células possuírem mecanismos de escape ao efeito das mais diversas drogas, como por exemplo, a expressão de genes responsáveis pelo fenótipo MDR ou Multidrug Resistance. Um dos mecanismos mediados por estes genes é uma bomba de efluxo capaz de expulsar das células tumorais drogas usadas no tratamento do câncer. O fenótipo MDR é caracterizado pela resistência cruzada a uma variedade de agentes químicos cujas estruturas não são semelhantes, trazendo sérias dificuldades para terapias anti-câncer efetivas (DUMONTET & SIKIC, 1999).

Kang e colaboradores (2005), utilizando “imunoblotting”, verificaram que a linhagem A549 possui expressão elevada de MRP1, codificada pelo gene *mdr 1*. A proteína MRP1 é membro de uma família de transportadores

que funcionam como bombas, responsáveis pela aquisição do fenótipo de resistência à drogas citado acima. Também estudando A549, mas com auxílio de RT-PCR, Lehman e colaboradores (2001) encontraram expressão muito baixa do RNAm codificado por *mdr 1*. Os dados, embora controversos, levantam a possibilidade da existência de mecanismo do tipo MDR nesta linhagem.

Favorecendo a hipótese da presença do fenótipo MDR em células A549, Manelli-Oliveira (2004) mostrou que a linhagem não responde ao tratamento com colchicina. As células foram tratadas com 0,02 μg/mL da droga por 24, 48 e 72 horas e foram acompanhadas por 0, 7, 24 e 48 horas após o término da exposição. Não foi registrado aumento do índice mitótico em nenhum momento, fato indicativo de que esta linhagem possui mecanismos de resistência à ação da colchicina. Em uma revisão sobre agentes que atuam nos microtúbulos, Mollinedo & Gajado (2003) ressaltam que colchicina é um alvo das bombas de efluxo em células expressando o fenótipo MDR. Tomando-se o conjunto de evidências, é muito provável que A549 realmente expresse genes responsáveis por esta característica.

Considerando que a linhagem não responde a colchicina, o tratamento com vincristina foi avaliado com o propósito de obter células bloqueadas em mitose. Em trabalhos realizados no laboratório de Biologia Celular e Molecular, a vincristina é utilizada com sucesso no bloqueio de células das linhagens MDCK e BBnt. Após 12 horas de tratamento com vincristina a 0,05 μg/mL, 37% das células BBnt param em mitose. A

exposição de células MDCK à droga por 16 horas bloqueia 46,4% da população nesta fase (NAKAGAWA, comunicação pessoal). Esta mesma concentração de vincristina foi testada em A549 por 12, 24, 48 e 72 horas. Nenhum dos tratamentos elevou o número de células em mitose, além de trazer severas perturbações à população celular. Os índices mitóticos obtidos foram 3,4%, 4,8%, 0,9% e 0%, respectivamente, para os tempos de tratamento citados anterormente.

Alguns autores propõem o uso de bloqueio duplo para obtenção de células em diversas fases do ciclo (UZBEKOV *et al.*, 1998). No entanto, os métodos devem ser padronizados para cada tipo celular, considerando a variabilidade das respostas de cada linhagem ao tratamento utilizado e a duração de cada fase do ciclo. Uma alternativa interessante para o duplo bloqueio é a ausência de soro fetal bovino (SFB) em culturas assincrônicas. Essa condição resulta na parada em G1 ou, na maior parte das vezes, entrada em G0 (DAVIS *et al.*, 2001 e UZBEKOV, 2004). Assim, a opção foi aliar dois métodos diferentes para obter populações de células A549 sincrônicas: a retirada de soro fetal bovino e o uso da vincristina.

Os alcalóides de vinca, incluindo a vincristina, são derivados da *Vinca rosea Linn* e vêm sendo utilizados no tratamento de diversos tipos de tumores há mais de 35 anos, entre os quais estão linfomas, câncer de mama, neuroblastoma e câncer de pulmão. O modo de ação da vincristina se assemelha ao dos demais compostos que interferem no arranjo dos microtúbulos. Porém, esta droga possui afinidade por dois tipos de sítios de

ligação à tubulina. Os sítios de alta afinidade localizados no final dos microtúbulos respondem a baixas concentrações de vincristina, levando ao desarranjo por acelerar sua desmontagem. Nesta situação, não há desorganização significativa. Na presença de altas concentrações, a droga se liga aos sítios de baixa afinidade nas paredes dos microtúbulos, causando sua desmontagem e desorganização (MOLLINEDO & GAJATE, 2003). Assim, a vincristina induz ao aparecimento de c-mitoses, caracterizadas por cromossomos muito condensados e não alinhados na placa equatorial, as quais surgem tipicamente após o uso de agentes que desarranjam o fuso mitótico.

O esquema de sincronização foi proposto de acordo com a caracterização do ciclo celular. A retirada total do SFB poderia causar drásticas alterações morfológicas e metabólicas nas células, por isso a alternativa foi reduzir gradualmente a quantidade de SFB nas culturas. Após 50 horas de cultivo na ausência de SFB, uma fração da população celular deveria estar em G0. As células foram então, estimuladas a retomar o ciclo sincronicamente com o restabelecimento das condições normais de cultura, por 44 horas. A seguir, vincristina foi adicionada às culturas por um período de seis horas.

Todas as concentrações utilizadas são consideradas doses altas e, portanto, deveriam causar desorganização da rede de microtúbulos (DUMONTET & SIKIC, 1999). Para avaliar este aspecto, células submetidas ao duplo bloqueio com vincristina na concentração intermediária (0,1 μg/mL)

foram analisadas por imunofluorescência. A reação com anticorpos contra α e β tubulinas evidenciaram alteração no padrão de distribuição de microtúbulos mitóticos e interfásicos. O mesmo ocorreu com a actina, visualizada após coloração com faloidina.

A primeira concentração de vincristina testada, 0,05 μg/mL, bloqueou 21,1% das células em mitose ao final do tratamento. Após a retirada da droga, o bloqueio é revertido e começam a surgir células binucleadas e multinucleadas. O pico de micronúcleos ocorreu 18 horas após a liberação do bloqueio, ou seja, quando as células estavam passando por G1.

Com as concentrações de 0,1 μg/mL e 0,5 μg/mL, o pico de c-mitoses acontece seis horas depois da retirada da droga, sugerindo que concentrações mais elevadas necessitam de mior tempo para a metabolização. Este fato é indicativo de que, embora A549 possua um mecanismo para expulsar colchicina de seu citoplasma, o mesmo não ocorre para vincristina. Novamente, à medida que o número de c-mitoses diminui, aumentam os números de células binucleadas e multinucleadas. O pico de micronúcleos ocorreu em T18, com a concentração 0,1 μg/mL e em T48 com 0,5 μg/mL de vincristina. O tratamento com 0,5 μg/mL induziu um número muito elevado de alterações nucleares, inclusive micronúcleos. Depois de 48 horas de liberação do bloqueio, poucas células podiam ser consideradas morfologicamente normais.

Em todas as amostras analisadas, raramente foram observadas células apoptóticas. Isto não significa que não houve morte celular programada, pois muitas células em processo de morte descolam do substrato e são detectadas apenas quando o sobrenadante é analisado. Ainda assim, é possível afirmar que o número de células em apoptose após os tratamentos foi pequeno, considerando as observações em células aderidas. Outra possibilidade é que o tempo de observação após os tratamentos não tenha sido longo o suficiente para a detecção de morte celular, considerando a duração de um ciclo celular completo.

A indução de alterações como binucleação e multinucleação por agentes que despolimerizam microtúbulos, como vincristina e colchicina, tem sido relatada em outros sistemas celulares (WEITZEL & VANDRÉ, 2000, MASUDA *et al*., 2003). No entanto, a relação entre multinucleação e outros processos celulares como a apoptose ainda não foi completamente elucidada.

Os resultados mostraram que células A549 sincronizadas em mitose pelo método proposto não ficam bloqueadas nesta fase. Isto indica que, embora haja desorganização dos microtúbulos, o ponto de checagem di fuso mitótico não é ativado, permitindo que as células progridam pelo ciclo mesmo com falhas na ligação dos cromossomos ao fuso, resultando em células binucleadas, multinucleadas e micronúcleos (JORDAN *et al.*, 1996). É bastante provável que o ponto de checagem do fuso mitótico de A549 não seja funcional. O principal papel deste ponto de checagem é monitorar a

estrutura dos microtúbulos do fuso, o alinhamento dos cromossomos e a ligação de seus cinetócoros ao fuso mitótico. Se alguma anormalidade é detectada, a segregação cromossômica durante a anáfase é atrasada, até que o problema seja corrigido.

Weitzel & Vandré (2000) utilizaram o composto CI-980 para tratar células A459, com o propósito de verificar o efeito desta droga em células tumorais. CI-980 é um agente antimitótico que se liga a tubulina no mesmo sítio da colchicina, causando distúrbios na rede de microtúbulos. Após duplo bloqueio por timidina, as células foram tratadas continuamente com 5 nM de CI-980 e fixadas a cada três horas. Surpreendentemente, os autores obtiveram bloqueio em mitose, alcançando 80% de células nessa fase. De acordo com estes dados, sugerem que o desarranjo dos microtúbulos mitóticos levou a ativação do ponto de checagem mitótico, mantendo estas células bloqueadas nesta fase. Após analisarem o número de células em mitose durante tratamento com nocodazole, Masuda e colaboradores (2003) também afirmam que o ponto de checagem do fuso mitótico de A549 é normal.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o ponto de checagem do fuso mitótico em A549 não é funcional, ao contrário do que afirmam os autores citados acima. É possível que isso seja reflexo da alta instabilidade genética das células A549, o que eleva a possibilidade de ocorrerem mutações permitindo que uma mesma linhagem adquira diferentes características e contribuindo para a heterogeneidade da população.

De acordo com o estudo de Nakamura e colaboradores (2003), 28% dos tumores de pulmão analisados por FISH apresentaram variabilidade cariotípica para os cromossomos 3, 10, 11 e 17 e podem ser considerados portadores de instabilidade cromossômica. A própria linhagem A549 possui um cariótipo muito alterado, também indicativo da existência de instabilidade nestas células. A549 possui cerca de 62 cromossomos, sendo que os cromossomos 1, 2 e 19 são os que apresentam maiores índices de anormalidades. Também há muitas alterações estruturais, incluindo fragmentos extracromossômicos, quebras e fusões (ISAKA *et al.*, 2003, LUK *et al*., 2001). Atualmente, a perda de controle de pontos de checagem do ciclo celular tem sido considerada a causa central da instabilidade cromossômica (SAMUEL *et al*., 2002; RAJAGOPALAN & LENGAUER, 2004). Assim, a presença de instabilidade cromossômica e a ausência de bloqueio mitótico em A549 são fortemente sugestivas de que a população analisada neste trabalho possui falhas no ponto de checagem do fuso mitótico.

Um ponto importante e constante nos experimentos com as duas menores concentrações de vincristina é o momento em que a freqüência de micronúcleos sofre o maior aumento. Nos dois protocolos de sincronização, isso acontece 18 horas após a liberação das células do bloqueio, independentemente da concentração de vincristina utilizada. Estes micronúcleos são o resultado da ação aneugênica da droga e provavelmente contém cromossomos inteiros, que não se ligaram ao fuso mitótico desorganizado e, portanto, não segregaram corretamente. A capacidade das

células A549 de escapar ao bloqueio com vincristina, permitindo-as seguir no ciclo, possibilita que os cromossomos soltos sejam envolvidos por lamina ao final da mitose, originando micronúcleos visualizados na fase G1 seguinte.

Alguns autores têm mostrado que o uso de drogas como óxido de germânio, curcumina e dimetil sulfóxido induz a parada do ciclo celular em fases diferentes dependendo do composto considerado (CHIU *et al*., 2002; HOLY, 2002; FIORE *et al*., 2002). Embora esses autores tenham utilizado o teste do micronúcleo em seus ensaios, não há uma discussão aprofundada a respeito do surgimento dos micronúcleos e a fase do ciclo em que isso ocorreu. Na maioria dos casos, o teste é utilizado somente para avaliar a genotoxicidade dos compostos.

Os experimentos utilizando BrdU como marcador de fase S foram importantes para dar indícios sobre a fase do ciclo celular em que os micronúcleos podem surgir na linhagem A549. No experimento denominado BrdU-A, o pulso de BrdU foi dado durante a reentrada das células no ciclo, após a privação de SFB. Em T0, T6 e T18, uma parte das c-mitoses não estava marcada pelo anti-BrdU, indicando que no momento da incorporação uma fração das células não estava passando por S, mas provavelmente, por G1. Isso é possível, uma vez que a população celular não estava totalmente sincronizada. Dentre os 100 micronúcleos analisados, 40 eram BrdU+ em T0, ou seja, as células que contêm estas estruturas estavam em S no momento do pulso de BrdU. Estes micronúcleos podem ter sido originados na mitose subsequente e visualizados na fase G1 seguinte. Os demais, não marcados,

foram originados a partir de células que estavam em G2 ou G1. Os micronúcleos em T0 e T6 não são induzidos pela vincristina, pois, de acordo com os dados apresentados anteriormente, nesses pontos a freqüência destas estruturas é basal. Em T6, os micronúcleos sem marcação também podem ter sido originados em células que estavam em G2 ou G1 no momento do pulso de BrdU.

Segundo os experimentos para avaliação dos protocolos de sincronização, a maior parte dos micronúcleos observados em T18 é induzida por vincristina, ou seja, são originados a partir de c-mitoses que tenham progredido no ciclo após serem liberadas do bloqueio com a droga. Se parte das células estava em G2 no momento do pulso de BrdU, não haveria tempo suficiente para que elas estivessem entrando em mitose quando a vincristina foi adicionada ao meio. Portanto, os micronúcleos não marcados seriam espontâneos e teriam surgido durante a intérfase.

Como seria esperado, a proporção de núcleos marcados por BrdU aumentou ao longo do experimento, pois células que estavam em meio ou final de S no momento do pulso teriam tido tempo suficiente para dividir, originando duas células marcadas e aumentando a proporção de núcleos BrdU+.

No experimento BrdU-B, o pulso foi dado na última hora do tratamento com vincristina. Os dados revelam que em T0 as c-mitoses não estavam marcadas pelo anticorpo anti-BrdU. Mas em T6, T18 e T24, algumas delas eram positivas para a marcação. Se estas células estivessem em meio ou

final de S no momento do pulso de BrdU, teriam tido tempo para atravessar G2 e serem bloqueadas em mitose, mesmo durante a ausência da droga. Isso reforça a hipótese de que a ação da vincristina acontece mesmo após sua retirada do meio de cultura, ou seja, as células necessitam de um período de tempo maior para metabolizar a droga presente no seu citoplasma.

Em T0, 24 micronúcleos apresentavam marcação para BrdU. Neste ponto, as células foram fixadas imediatamente após o pulso. Portanto, este dado mostra que os micronúcleos são ativos em termos de replicação de DNA. Tanto em T18 quanto nos outros tempos, a maioria dos micronúcleos marcados não deve ter sido originada a partir das c-mitoses, uma vez que a marcação resulta de células que não estavam passando pelo bloqueio mitótico no momento do pulso. Já os micronúcleos não marcados observados a partir de T18 podem ter sido induzidos pela vincristina, porque poucas células poderiam ter incorporado BrdU durante o tratamento com a droga, a menos que estivessem em final de S.

Como dito anteriormente, os micronúcleos observados em T0 e antes de T18 são espontâneos. Em T0, os micronúcleos marcados poderiam ter surgido tanto em S quanto em qualquer outra fase do ciclo. Portanto, este dado é importante por indicar qual a quantidade basal de micronúcleos BrdU positivos em uma cultura (24%). Em T6 há maior número de micronúcleos marcados que devem ter surgido entre S e G2, pois no período de seis horas após o pulso, é pouco provável que tenham surgido após uma mitose, seria

um intervalo de tempo curto para isso, dada a duração das fases do ciclo desta célula. Outra hipótese seria que os micronúcleos observados em T6 tenham surgido em uma mitose anterior ao pulso mantendo a capacidade de replicação de seu DNA, tenham progredido até S e assim incorporaram BrdU. Em T6, teriam passado por outra mitose e mantido o micronúcleo. Isso seria mais provável se o micronúcleo contivesse um fragmento acêntrico, que não se religaria ao fuso mitótico, sendo incapaz de se incorporar novamente ao núcleo principal. Esta é uma hipótese pouco provável, pois dependeria de muitos eventos sobre os quais não se conhece a real chance de acontecerem.

No experimento BrdU-C, o pulso foi dado 12 horas após a liberação do bloqueio com vincristina: Em T12 e T18 não houve presença de c-mitoses marcadas, já que o pulso de BrdU aconteceu após o tratamento com vincristina. No entanto, em T24 uma c-mitose marcada foi observada, ou seja, embora tenha entrado em contado com a droga 24 horas antes, o efeito foi bastante tardio. No momento do tratamento com vincristina, a célula deveria estar em final de G1, passando por S na hora do pulso de BrdU e quando foi fixada estava bloqueada em mitose, devido ao efeito tardio da droga.

Em T12, a maior parte dos micronúcleos observados é induzida pela vincristina e poucos micronúcleos estavam marcados pelo anti-BrdU. No entanto, estes não se originaram das c-mitoses, pois no momento do pulso, as células que escaparam ao bloqueio deveriam estar em G1 e não em S.

Assim, realmente seria esperado que poucos micronúcleos estivessem marcados. Os micronúcleos não marcados podem ter sido originados a partir das células que estavam em c-mitose, escaparam ao bloqueio e no momento do pulso de BrdU estavam em G1.

Os micronúcleos marcados observados em T18 não podem ter sido originados a partir de c-mitoses geradas por ação tardia da vincristina, pois o tempo necessário para que a célula incorpore BrdU em S, atravesse G2 e ainda sofra bloqueio não é compatível com o momento em que os micronúcleos foram observados, ou seja, seis horas após o pulso. Já em T24, isso seria possível. Os micronúcleos não marcados em T18 e T24 são resultantes da ação da vincristina.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, na linhagem A549, micronúcleos podem surgir tanto durante a mitose, quanto durante a intérfase. Embora o mecanismo clássico para formação de micronúcleos postule sua origem a partir da mitose, alguns autores e o presente trabalho apontam outras possibilidades.

É possível que micronúcleos surjam a partir de sítios frágeis comuns, presentes em muitos indivíduos e vistos em cromossomos metafásicos após inibição parcial da síntese de DNA com drogas como afidicolina, um inibidor de DNA polimerase (ARLT *et al*., 2003). Estudos mostram um acréscimo na freqüência de micronúcleos em diversas linhagens celulares tratadas com essa droga (MANELLI-OLIVEIRA, 2004; SHIMIZU *et al*., 1998). Além disso, alguns autores têm mostrado que há relação entre a instabilidade de sítios

frágeis e a presença de tumores, considerando deleções ou amplificações nestas regiões (ALBERTSON, 2006; GLOVER *et al*., 2005). Poderia se esperar uma associação entre esses fatos e uma possível origem de micronúcleos durante a fase S, por falha de replicação de DNA nos sítios frágeis. Assim, seria interessante avaliar o conteúdo de micronúcleos procurando por regiões de quebras de sítios frágeis, tendo em vista que algumas delas já tiveram suas seqüências caracterizadas.

Estes locais são considerados “hot spots” para o surgimento de ciclos de quebra-fusão-ponte. Esse mecanismo pode fazer parte do processo de formação de micronúcleos, mesmo na ausência de quebras em sítios frágeis. De acordo com esse mecanismo, cromátides irmãs quebradas fundem sua parte distal, formando um cromossomo dicêntrico e com duas cópias de genes homólogos. Esse cromossomo é replicado na fase S e puxado para pólos opostos da célula durante a anáfase. Na citocinese este cromossomo pode se quebrar e originar um cromossomo com duas cópias ou mais de um gene e um fragmento cromossômico em que o gene está ausente (FENECH, 2002). Durante a intérfase, os cromossomos com cópias múltiplas podem formar um novo cromossomo dicêntrico ou pode ocorrer recombinação entre as seqüências homólogas da mesma cromátide, resultando em “double minutes” (DMs).

O mecanismo de expulsão de Dms foi estudado em células COLO320, obtidas a partir de tumor neuroendócrino. Estas células foram sincronizadas por Shimizu e colaboradores (1998) para estudar a cinética de formação de

brotos nucleares e micronúcleos. Os autores verificaram que DMs, fragmentos de DNA circulares e acêntricos, indicativos de amplificação gênica, podem ser eliminados do núcleo por um mecanismo de brotamento durante a fase S, resultando na formação de micronúcleos. Ao final de S, as estruturas resultantes se fundiriam novamente ao núcleo, seriam degradadas no citoplasma ou eliminadas da célula. A última hipótese foi confirmada por Shimizu *et al.*, (2000).

Tanaka & Shimizu (2000) propuseram um modelo para explicar a expulsão de DMs gerados por hidroxiuréia. Normalmente, DMs segregam aderidos aos cromossomos. Na presença de quebras no DNA induzidas por hidroxiuréia, isso pode não ser possível. Uma parte dos DMs que ficaram soltos pode ser envolvida por lamina e formar um micronúcleo ao final da mitose. Aqueles que não se associaram a lamina neste momento, serão envolvidos pela proteína na fase S seguinte, replicam, se destacam do núcleo e são eliminados para o espaço extracelular. É preciso lembrar que este modelo só será válido para células mutantes para p53, pois só assim, uma célula com falha na replicação de DNA poderia prosseguir no ciclo. Antes de assumir o modelo de Tanaka & Shimizu (2000) como possível, é preciso lembrar que o mesmo foi proposto para uma situação muito específica, envolvendo o uso de hidroxiuréia e micronúcleos contendo unicamente DMs.

Hoffelder *et al.*, (2004) mostraram que as pontes anafásicas formadas durante os ciclos de quebra-fusão-ponte podem originar micronúcleos. Este foi um dos primeiros trabalhos que caracterizou alguns aspectos de

micronúcleos espontâneos. Foram utilizadas células de carcinoma oral, filmadas em tempo real, por vídeo-microscopia. Dentre as pontes anafásicas acompanhadas, 70% resultaram em micronúcleos. Os autores também observaram que o micronúcleo é uma estrutura dinâmica, se movimenta livremente no citoplasma e não se reincorpora ao núcleo interfásico. No entanto, não foi possível visualizar o destino destas estruturas durante a mitose.

Ainda segundo Hoffelder e colaboradores (2004), a grande maioria dos micronúcleos não possui nível de atividade transcricional detectável, conforme verificado por imunofluorescência para RNA polimerase II. Os autores associam esse fato ao reduzido tráfego nuclear determinado por complexos do poro nuclear ausentes. Portanto, genes contidos em micronúcleos inativos são perdidos. As mesmas análises em outras linhagens celulares trouxeram resultados diversos, comprovando que parâmetros idênticos podem variar em função do tipo celular considerado.

Os micronúcleos de A549 possuem capacidade de replicar DNA e muitas vezes não há sincronia entre a replicação do DNA nuclear e a do micronúcleo. As observações mais freqüentes foram de núcleos com marcação acompanhados de micronúcleos sem indícios de replicação (73 eventos em 1000 análises). O inverso foi observado apenas quatro vezes num total de 1000 micronúcleos analisados. Uma explicação possível é que os cromossomos ou fragmentos cromossômicos incorporados em micronúcleos sejam constituídos por heterocromatina, repliquem tardiamente

e por isso, durante um curto pulso de incorporação de BrdU, não tenham incorporado o composto. A linhagem A549 é proveniente de um paciente do sexo masculino, por isso, embora alguns autores sugiram a incorporação preferencial do cromossomo X inativo, não é possível assumir esta hipótese no presente trabalho (TUCKER *et al*., 1996). Por outro lado, Fauth *et al*. (1998, 2000) mostraram que o cromossomo 9 fazia parte de 9,8% dos micronúcleos de linfócitos de três doadores analisados. Os autores sugerem que essa incorporação preferencial se deve ao grande bloco de heterocromatina que constitui esse cromossomo. Estudos mais aprofundados sobre este fenômeno em A459 seriam possíveis por meio da caracterização do conteúdo dos micronúcleos, utilizando técnicas como a cariotipagem espectral.

A proposição de terapias mais efetivas contra o câncer depende do avanço no conhecimento das etapas envolvidas no surgimento e progressão desta doença, além da melhor compreensão de processos como a micronucleação e sua relação com a tumorigênese. Alguns autores, como Shimizu *et al.* (2000) e Tanaka & Shimizu (2000), citados anteriormente, têm mostrado que os micronúcleos serviriam como uma via de eliminação de oncogenes amplificados, o que explicaria a freqüência mais elevada destas estruturas em células tumorais. O mesmo fato foi observado em células de neuroblastoma por Ambros *et al*. (1997) e Valent *et al.* (2001). Em todos estes trabalhos, o oncogene amplificado localizado no interior dos micronúcleos por FISH, era *c-myc* ou *n-myc*.

Ainda não há relatos na literatura sobre a expulsão do gene que codifica o Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) em células tumorais de pulmão pelo mecanismo de micronucleação. Esta proteína é membro de uma família de quatro receptores (erbB) que possuem uma estrutura semelhante, com domínios extracelular, transmembrana e intracelular. O último é responsável pela atividade de transdução de sinal, devida à presença de um domínio tirosina-quinase. A união de um ligante, como o fator de crescimento epidérmico a esse receptor, causa ativação da tirosina-quinase resultando em uma cascata de sinalização que culmina em efeitos como migração e diferenciação celular, metástase, angiogênese e inibição de apoptose (WOODBURN, 1999; YARDEN & SLIWKOWISKI, 2001). Estima-se que entre 40% e 80% dos carcinomas de pulmão de células não pequenas possuam EGFR super expresso. A linhagem A549, originária deste mesmo tipo de carcinoma, possui 3.4 cópias de EGFR (AMANN *et al*., 2005). Este fato é muito relevante, pois a super expressão desta proteína está associada ao avanço na progressão da doença e resistência a radioterapia e quimioterapia (CIARDIELLO *et al*., 2004).

Os resultados apresentados no presente trabalho indicam, pela primeira vez, que a seqüência gênica que codifica EGFR pode ser encontrada no interior dos micronúcleos de células tumorais de pulmão, sugerindo que as células podem expulsar estas seqüências. Testa e colaboradores (1997) afirmam que em 10% dos carcinomas de pulmão de células não pequenas há “double minutes”. Embora não tenham sido

visualizados na linhagem A549, é possível que o mecanismo de expulsão de EGFR aconteça por micronucleação de DMs, como sugerido por Shimizu *et al.* (2000) e Tanaka & Shimizu (2000). De modo geral, a expulsão de oncogenes amplificados poderia contribuir para a reversão do fenótipo maligno em alguns tipos de tumores, além de reduzir as chances de resistência a terapias, pois muitas seqüências que são amplificadas podem conferir este tipo de vantagem às células (VON HOFF *et al*., 1992).

O aprofundamento de questões relacionadas à biologia do micronúcleo, principalmente, sobre seu conteúdo, mecanismo de formação e papel no desenvolvimento de tumores contribuirá para o estabelecimento de terapias coadjuvantes mais efetivas no tratamento do câncer.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que na linhagem A549, derivada de carcinoma de pulmão humano:

- o melhor protocolo para sincronização é o duplo bloqueio por privação de soro fetal bovino e adição de vincristina às culturas;
- micronúcleos podem surgir durante a mitose ou durante a intérfase, especialmente durante S ou G2;
- micronúcleos possuem capacidade de replicar DNA;
- o ponto de checagem de ligação ao fuso mitótico não é funcional;
- seqüências amplificadas de EGFR são encontradas no interior dos micronúcleos.

Referências

ABOU-EISHA, A.; AFIFI, M**.** Genotoxic evaluation of antimalarial drug, fansidar, in cultured human lymphocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 20, p. 303-311, 2004.

ALBERTSON, D. G. Gene amplification in cancer. **Trends in Genetics**, in press, 2006.

AMANN, J.; KALYANKRISHNA,S.; MASSION, P. P.; OHM, J. E.; GIRARD, L.; SHIGEMATSU,H.; PEYTON, M.; JUROSKE, D.; HUANG, Y.; SALMON, J. S.; KIM, Y. H.; POLLACK, J. R.; YANAGISAWA, K.; GAZDAR, A.; MINNA, J. D.; KURIE, J. M.; CARBONE, D. P. Aberrant Epidermal Growth Factor Receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 1, p. 226-235, 2005.

AMBROS, I.M.; RUMPLER, S.; LUEGMAYR, A.; HATTINGER, C. M.; STREHL, S.; KOVAR, H.; GADNER, H.; AMBROS, P. F. Neuroblastoma cells can activelly eliminate supernumerary MYCN gene copies by micronucleus formation – sign of tumour revertance? **European Journal of Cancer**, v. 33, p. 2043-2049, 1997.

ARLT, M. F.; CASPER, A. M.; GLOVER, T. W. Common fragile sites. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 100, p. 92-100, 2003.

ARNOLD, A.; PAPANIKOLAOU, A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 19, p. 4215-4224, 2005.

BALSARA, B. R.; TESTA, J. R. Chromosomal imbalances in human lung cancer. **Oncogene**, v. 21, p. 6877-6883, 2002.

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

BLACKBURN, E. H.; CHALLONER, P. B. Identification of a telomeric DNA sequence in *Trypanosoma brucei*. **Cell**, v. 36, p. 447-457, 1984.

BLAJESKI, A. L.; PHAN, V. A.; KOTTKE, T. J.; KAUFFMANN, S. H. G(1) and G(2) cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 1, p. 91-99, 2002.

BLYTH, K.; CAMERON, E. R.; NEIL, J. C. The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 376-387, 2005.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. **Mutation Research**, v. 557, n. 2, p. 109-117, 2004.

BOUCHER, B.; NORMAN, C. S. Cold synchronization for the study of peripheral blood and bone marrow chromosomes in leukemias and other hematologic disease states. **Human Genetics**, v. 54, n. 2, p. 207-211, 1980.

BOVERI, T. **Zur Frage der Enstehung Maligner Tumoren**. Jena: Gustav Fisher Verlag. 1914.

CALDON, C. E.; DALY, R. J.; SUTHERLAND, R. L.; MUSGROVE, E. A. Cell cycle control in breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 261-274, 2006.

CARNERO, A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. **British Journal of Cancer**, v. 87, p. 129-133, 2002.

CATALÁN, J.; FALCK, G. C.; NORPPA, H. The X chromosome frequently lags behind in female lymphocyte anaphase. **American Journal of Human Genetics**, v. 66, n. 2, p. 687-691, 2000.

CAVAS, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005.

CERQUEIRA, E. M .M.; SANTORO, C. L.; DONOZO, N. F.; FREITAS, B. A.; PEREIRA, C. A. B.; BEVILACQUA, R. G.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix: association and interaction between cigarette smoking and the progression to malignant transformation? **Acta Cytologica**, v. 42, p. 639-649, 1998.

CHANG, G-C.; HSU, S-L.; TSAI, J-R.; LIANG, F-P.; LIN, S-Y.; SHEU, G-T.; CHEN, C-Y. Molecular mechanisms of ZD1839-induced G1-cell cycle arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 6, p. 1453-1464, 2004.

CHIU, S-J.; LEE, M-Y.; CHEN, H-W.; CHOU, W-G.; LIN, L-Y. Germanium oxide inhibits the transition from G2 to M phase of CHO cells. **Chemico-Biological Interactions***,* v. 141, p. 211-228, 2002.

CHO, S. R.; OCK, S. A.; YOO, J. G.; MOHANA-KUMAR, B.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Effects of confluent, roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 171-176, 2005.

CHUNG, H. W.; KANG, S. J.; KIM, S. Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. **Mutation Research***,* v. 516, n. 1-2, p. 49-56, 2002.

CIARDIELLO, F.; DE VITA, F.; ORDITURA, M.; TORTORA, G. The role of EGFR inhibitors in non small cell lung cancer. **Current Opinion in Oncology**, v.16, p. 130–135, 2004.

CLASSON, M.; HARLOW, E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. **Nature Reviews Cancer***,* v. 2, p. 910-917, 2002.

COOPER, G. M. **The Cell – a Molecular Approach**. 2nd ed. Sunderland (MA). Sinauer Associates Inc. 2000.

COURJAL, F.; LOUASON, G.; SPEISER, P.; KATSAROS, D.; ZEILLINGER, R.; THEILLET, C. Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: evidence for the selection of cyclin D1 in breast and cyclin E in ovarian tumors. **International Journal of Cancer**, v. 69, n. 4, p. 247-253, 1996.

DAVIES, J. J.; WILSON, I. M.; LAM, W. L. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. **Chromosome Research**, v. 13, p. 237-248, 2005.

DAVIS, P. K.; HO, A.; DOWDY, S. F. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. **BioTechniques**, v. 30, p. 1322-1331, 2001.

DEWEY, D. L. Cycle reset in a melanoma cell line caused by cooling. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 20, n. 6, p. 603-609, 1987.

DIAS, V. M.; MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Using fluorescence for improvement of the quantitative analysis of micronucleus in cell culture. **Mutation Research**, v. 565, p. 173-179, 2005.

DING, G. R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-ray. **Mutagenesis**, v. 18, n. 5, p. 439-43, 2003.

DUMONTET, C.; SIKIC, B. I. Mechanisms of action and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport and cell death. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 3, p. 1061-1070, 1999.

EASTMAN, A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. **Journal of Cellular Biochemistry***,* v. 91, p. 223-231, 2004.

FALCK, G. C.; CATALAN, J.; NORPPA, H. Nature of anaphase laggards and micronuclei in female cytokinesis-blocked lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 111-117, 2002.

FAUTH, E.; ZANK, H. Comparision of spontaneous and idoxuridine-induced micronuclei by chromosome painting. **Mutation Research**, v. 440, p. 147-156, 1999.

FAUTH, E.; SCHERTHAN, H.; ZANK, H. Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C and diethylstilboesterol-induced micronuclei. **Mutagenesis**, v. 15, p. 459-467.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002a.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. **Toxicology**, v. 181-182, p. 411-416, 2002b.

FENECH, M.; CROTT, J. W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research***,* v. 504, p. 131-136, 2002.

FIORI, M.; ZANIER, R.; DEGRASSI, F. Reversible G_1 arrest by dimethyl sulfoxide as a new method to synchronize Chinese hamster cells. **Mutagenesis**, v. 17, n. 5, p. 419-424, 2002.

GALBIATI, F.; VOLONTE, D.; LIU, J.; CAPOZZA, F.; FRANK, P. G.; ZHU, L.; PESTELL, R. G.; LISANTI, M. P. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G0/G1 arrest via a p53/p21$^{waf1/Cip1}$-dependent mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, p. 2229-2244, 2001.

GAUTHIER, J. M.; DUBEAU, H.; RASSART, É.; JARMAN, W. M.; WELLS, R. S. Biomarkers of DNA damage in marine mammals. **Mutation Research***,* v. 444, p. 427-439, 1999.

GISSELSSON, D.; BJÖRK, J.; HÖGLUND, M.; MERTENS, F.; CIN, P. D.; AKERMAN, M.; MANDAHL, N. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. **American Journal of Pathology***,* v. 158, n. 1, p. 199-206, 2001.

GLOVER, T. W.; ARLT, M. F.; CASPER, A. M.; DURKIN, S. G. Mechanisms of common fragile site instability. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 2, p. 197-205, 2005.

GOLLIN, S. M. Mechanisms leading to chromosomal instability. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 33-42, 2005.

HARMON, B. V.; TAKANO, Y. S.; WINTERFORD, C. M.; POTTEN, C. S. Cell death induced by vincristine in the intestinal crypts of mice and in human Burkitt's lymphoma cell line. **Cell Proliferation**, v. 25, n. 6, p. 523-526, 1992.

HEDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-192, 1973.

HOFFELDER, D. R.; LUO, L.; BURKE, N. A.; WATKINS, S. C.; GOLLIN, S. M.; SAUNDERS, W. S. Resolution of anaphase bridges in cancer cells. **Chromosoma**, v. 112, p. 389-397, 2004.

HOLY, J. M. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. **Mutation Research**, v. 518, n. 71-84, 2002.

ISAKA, T.; NESTOR, A. L.; TAKADA, T.; ALLISON, D. Chromosomal variations within aneuploid cancer lines. **The Journal of Histochemestry and Cytochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1343-1353, 2003

Instituto Nacional do Câncer – **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999**. Ministério da Saúde, 395 p., 2002.

IZZOTTI, A.; BALANSKY, R. M.; DAGOSTINI, F.; BENNICELLI, C.; MYERS, S. R., GRUBBS, C. J.; LUBET, R. A.; KELLOFF, G. J.; DE FLORA, S. Modulation of biomarkers by chemopreventive agents in smoke-exposed rats. **Cancer Research**, v. 61, n. 6, p. 2472-2479, 2001.

JALLEPALLI, P. V.; LENGAUER, C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. **Nature Reviews Cancer***,* v. 1, p. 109-117, 2001.

JIM, Z.; DICKER, D. T.; EL-DEIRY, W. S. Enhanced sensitivity of G1 arrested human cancer cells suggested a novel therapeutic strategy using a combination of simvastatin an TRAIL. **Cell Cycle**, v. 1, n. 1, p. 82-89, 2002.

JORDAN, M. A.; WENDELL, K.; GARDINER, S.; DERRY, W. B.; COPP, H.; WILSON, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. **Cancer Research**, v. 56, p. 816-825, 1996.

KANG, H-K.; LEE, E.; PYO, H.; L, S-J. Cyclooxygenase-independent down-regulation of multidrug resistance–associated protein-1 expression by celecoxib in human lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 9, p. 1358-1363, 2005.

KIM, H. D.; TOMIDA, A.; OGISO, Y.; TSURUO, T. Glucose-regulated stresses cause degradation of DNA topoisomerase II alpha by inducing nuclear proteasome during G1 cell cycle arrest in cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 180, p. 97-104, 1999.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v. 504, p. 137-148, 2002.

KUES, W. A.; ANGER, M.; CARNWATH, J. W.; PAUL, D.; MOTLIK, J.; NIEMANN, H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 412-419, 2000.

KUNG, A. L.; ZETTERBERG, A., SHERWOOD, S. W., SCHIMKE, R. T. Cytotoxic effects of cell cycle phase specific agents: result of cell cycle perturbation. **Cancer Research**, v. 50, p. 7307-7317, 1990.

LAFFON, B.; PÁSARO, E.; MÉNDEZ, J. Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. **Toxicology***,* v. 171, n. 2-3, p. 175-186, 2002.

LEHMANN, T.; KÖHLER, C.; WEIDAUER, E.; TAEGE, C.; FOTH, H. Expression of MRP1 and related transposters in human lung cells in culture. **Toxicology**, v. 167, p. 59-72, 2001.

LEACH, N. T.; JACKSON-COOK, C. The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent in situ hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei. **Mutation Research**, v. 495, p. 11-19, 2001.

LERIS, A. C.; ROBERTS, T. R.; JIANG, W. G.; NEWBOLD, R. F.; MOKBEL, K. WNT5A expression in human breast cancer. **Anticancer Research**, v. 25 n. 2A, p. 731-734, 2005.

LEWINSKA, D.; STEPNIK, M; KRAJEWSKI, W.; ARKUSZ, J.; STANCZYK, M; WRONSKA-NOFER, T. Increased incidence of micronuclei assessed with the micronucleus assay and the fluorescence in situ hybridization (FISH) technique in peripheral blood lymphocytes of nurses exposed to nitrous oxide. **Mutation Research**, v. 581, p. 1-9, 2005.

LIEBER, M.; SMITH, B.; SKAZAL, A.; NELSON-REES, W.; TODARE, G. A continuous tumour-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **International Journal of Cancer***,* v. 17, n. 62-70, 1976.

LLORENTE, M. T.; MARTOS, A.; CASTANO, A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. **Ecotoxicology***,* v. 11, n. 1, p. 27-34, 2002.

LUK, C.; TSAO, M-S.; BAYANI, J.; SHEPHERD, F.; SQUIRE, J. A. Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 125, p. 87-99, 2001.

MAC AULEY, A.; WERB, Z.; MIRKES, P. E. Characterization of the unusually rapid cell cycles during rat gastrulation. **Development**, v. 117, n. 3, p. 873-83, 1993.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; CERQUEIRA, E. M.; OLIVEIRA, C. T.; PEREIRA, C. A. DE B. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutation Research**, v. 322, p. 203-208, 1994.

MAFFEI F.; FORTI, G. C.; CASTELLI, E.; STEFANINI, G. F.; MATTIOLI, S.; HRELIA, P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research***,* v. 514, p. 49-58, 2002.

MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMULLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research***,* v. 489, n. 2-3, p. 147-172, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature Reviews Cancer***,* v. 1, p. 222-231, 2001.

MANELLI-OLIVEIRA, R. **Mecanismo de formação de micronúcleos em células tumorais de pulmão em cultura.** 2004. __ f. Tese (Doutorado em Ciências/Biologia Celular e Tecidual)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MANELLI-OLIVEIRA, R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cytoskeletal and nuclear alterations in human lung tumour cells: a confocal microscope study. **Histochemical Cell Biology***,* v. 115, p. 403-411, 2001.

MARTINEZ, V.; CREUS, A.; VENEGAS, W.; ARROYO, A .; BECK, J. P.; GEBEL, T. W.; SURRALLÉS, J.; MARCOS, R. Micronuclei assessment in bucal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. **Toxicology Letters**, v. 155, p. 319-327, 2005.

MASTBERGEN, S. C.; DUIVENVOORDEN, I.; VERSTEEGH, R. T.; GELDOF, A. A. Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs. **Anticancer Research**, v. 20, n. 3A, p. 1833-1838, 2000.

MASUDA, A.; TAKAHASHI, T. Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms an potential consequences in the pathogenesis. **Oncogene**, v. 21, p. 6884-6897, 2002.

MASUDA, A.; MAENO, K.; NAKAGAWA, T.; SAITO, H.; TAKAHASHI, T. Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by anti-microtubule agents in human lung cancer. **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 3, p. 1109-1116, 2003.

MAZIERES, J.; ANTONIA, T.; DASTE, G.; MURO-CACJO, C.; BERCHERY, D.; TILLEMENT, V.; PRADINES, A.; SEBTI, S.; FAVRE, G. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 2742-2750, 2004.

MITSUUCHI, Y.; TESTA, J. R. Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. **American Journal of Medical Genetics**, v. 115, p. 183-188, 2002.

MIYAMOTO, H.; SHUIN, T.; TORIGOE, S.; IWASAKI, Y.; KUBOTA, Y. Retinoblastoma gene mutations in primary human bladder cancer. **British Journal of Cancer**, v. 71, n. 4, p. 831-835, 1995.

MOLLINEDO, F.; GAJATE, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, p. 413-450, 2003.

NAKAMURA, H.; SAJI, H.; IDIRIS, A.; KAWASAKI, N.; HOSAKA, M.; OGATA, A.; SAIJO, T.; KATO, H. Chromosomal instability detected by in situ

hybridization in surgical specimens of non-small cell lung cancer is associated with poor survival. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 2294-2299, 2003.

NIGG, E. A. Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? **Nature Reviews Cancer***,* v. 2, p. 1-11, 2002.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I. D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology,** v. 77, n. 4, p. 339-347, 2006.

NORPPA, H.; FALCK, G. C-M. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 221-233, 2003.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **Journal of National Cancer Institute**, v. 25, p. 85-109, 1960.

OLIVEIRA, A. R.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Diphenylhydantoin and mitotic spindle abnormalities in cultured mouse and human cells. **Mutation Research**, v. 187, p. 91-97, 1987.

OSADA, H.; TAKAHASHI, T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. **Oncogene***,* v. 21, p. 7421-7434, 2002.

PANANI, A. D.; ROUSSOS, C. Cytogenetics and molecular aspects of lung cancer. **Cancer Letters**, p. 1-9, 2005.

PANWAR, M.; KUMAR, M.; SAMARTH, R.; KUMAR, A. Evaluation of chemopreventive action and antimutagenic effect of the standardized Panax Ginseng Extract, EFLA400, in Swiss Albino Mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 65-71, 2005.

PORTO, J. I. R.; ARAÚJO, C. S. O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test in Amazonian fish species. **Environmental Research**, v. 97, p. 287-292, 2005.

RAJAGOPALAN, H. & LENGAUER, C. Aneuploidy and cancer. **Nature**, v. 432, p. 338-341, 2004.

RANDOLPH, T. R. Chronic myelocytic leukemia--Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. **Clinical Laboratory Science**, v. 18, n. 1, p. 38-48, 2005.

RESHMI, S. C.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability in oral cancer cells. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 2, p. 107-117, 2005.

RICE, G. C.; DEAN, P. N.; GRAY, J. W.; DEWEY, W. C. An ultra-pure in vitro phase synchrony method employing centrifugal elutriation and viable flow cytometric cell sorting. **Cytometry**, v. 5, n. 3, p. 289-298, 1984.

RIEDER, C. L.; COLE, R. W. Cold-shock and the Mammalian cell cycle. **Cell Cycle**, v. 1, n. 3, p. 169-175, 2002.

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J. P.; SILVA, S.; LAFFON, B.; CUNHA, L. M.; MENDEZ, J.; MAYAN, O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, v. 604, n. 1-2, p. 19-27, 2006.

ROY, M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R. K.; SIDDIQI, M. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 33-41, 2003.

SAMUEL, T.; WEBER, H. O.; FUNK, J. O. Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. **Cell Cycle**, v. 1, n. 3, p. 162-168, 2002.

SATO, N.; MIZUMOTO, K.; NAKAMURA, M.; MAEHARA, N.; MINAMISHIMA, Y. A.; NISHIO, S.; NAGAI, E.; TANAKA, M. Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. **Cancer Genetics and Cytogenetics***,* v. 126, p. 13-19, 2001.

SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, X.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PTERSEN, I.; GOLLIN, S. M.. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 303-308, 2000.

SAWADA, N.; KATAOKA, K.; KONDO, K.; ARIMOCHI, H.; FUJINO, H.; TAKAHASHI, T.; MIYOSHI, T.; KUWABARA, T.; MONDEN, Y.; OHNISHI, Y. Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 8, p. 1672-1678, 2004.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SHIMIZU, N.; KANDA, T.; WAHL, G. M. Selective capture of acentric fragments by micronuclei provides a rapid method for purifying extrachromosomally amplified DNA. **Nature Genetics**, v. 12, p. 65-71, 1996.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 1307-1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T; TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minuts from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research**, v. 448, p. 81-90, 2000.

SORIA, J-C.; JANG, S. J.; KHURI, F. R.; HASSAN, K.; LIU, D.; HONG, W. K.; MAO, L. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. **Cancer Research**, v. 60, p. 4000-4004, 2000.

SONNA, L. A.; FUJITA, J.; GAFFIN, S. L.; LILLY, G. M. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, p. 1725-1742, 2002.

SURH, Y. J.; KIM, S. G.; LIEM, A.; LEE, J. W.; MILLER, J. A. Inhibitory effects of isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbamoyl] acetate (YH439) on benzo[a]pyrene-induced skin carcinogenesis and micronucleated reticulocyte formation in mice. **Mutation Research**, v. 423, n. 1-2, p. 149-53, 1999.

SWARTZ, C. D.; DONNELLY, K. C.; ISLAMZADEH, A.; ROWE, G. T.; ROGERS, W. J.; PALATNIKOV, G. M.; MEKHTIEV, A. A.; KASIMOV, R.; MCDONALD, T. J.; WICKLIFFE, J. K.; PRESLEY, B. J.; BICKHAM, J. W. Chemical contaminants and their effects in fish an wildlife from the industrial zone of Sumgayit, Republic of Azerbaijan. **Ecotoxicology**, v. 12, p. 509-521, 2003.

TAGUCHI, T.; CHENG, G. Z.; BELL, D. W.; BALSARA, B.; LIU, Z.; SIEGFRIED, J. M.; TESTA, J. M. Combined chromosome microdissection and comparative genomic hybridization detect multiple sites of amplified DNA in a human lung carcinoma cell line. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 20, p. 208-212, 1997.

TANAKA, T.; SHIMIZU, N. Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmatic localization at G1 and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 697-707, 2000.

TESTA, J. R.; LIU, Z.; FEDER, M.; BELL, D. W.; BALSARA, B.; CHENG, J. Q.; TAGUCHI, T. Advances in the analysis of chromosome alterations in human lung carcinomas. **Cancer Genetics ad Cytogenetics**, v. 95, p. 20-32, 1997.

TUCKER, J. D.; NATH, J.; HANDO, J. C. Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes. **Human Genetics**, v. 97, p. 471-475, 1996.

TSUTSUI, T.; SUZUKI, N.; MAIZUMI, H.; BARRETT, J. C. Vincristine sulfate-induced cell transformation, mitotic inhibition and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. **Carcinogenesis**, v. 7, n. 1, p. 131-135, 1986.

URBANI, L.; SHERWOOD, S. W.; SCHIMKE, R. T. Dissociation of nuclear end cytoplasmatic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. **Experimental Cell Research**, v. 219, p. 159-168, 1995.

UZBEKOV, R.; CHARTRAIN, I.; PHILIPPE, M.; ARLOT-BONNEMAINS, Y. Cell cycle analysis and synchronization of the *Xenopus* cell line XL2. **Experimental Cell Research**, v. 242, p. 60-68, 1998.

UZBEKOV, R.; PRIGENT, C.; ARLOT-BONNEMAINS, Y. Cell cycle analysis and synchronization of the *Xenopus laevis* cell line XL2: study of the kinesin related protein XIEg5. **Microscopy Research and Techniques**, v. 45, p. 31-42, 1999.

UZBEKOV, R. E. Analysis of the cell cycle and a method employing synchronized cells for study of protein expression at various stages of the cell cycle. **Biochemistry**, v. 69, n. 5, p. 485-496, 2004.

VALENT, A.; BÉNARD, J.; CLAUSSE, B.; BARROIS, M.; VALTEAU-COUANET, D.; TERRIER-LACOMB, M-J.; SPENGLER, B.; BERNHEIM, A. In vivo elimination of acentric double minutes containing amplified MYCN from neuroblastoma tumor cells through the formation of micronuclei. **American Journal of Pathology**, v. 158, n. 5, p. 1579-1584, 2001.

VECCHIONE, A.; ISHI, H.; BALDASSARRE, G.; BASSI, P.; TRAPASSO, F.; ALDER H.; PAGANO, F.; GOMELLA, L. G.; GROCE, C. M.; BAFFA, R. FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. **American Journal of Pathology**, v. 160, p. 1345-1352, 2002.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. Ed. Campus, Rio de Janeiro. 1991.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine***,* v. 10, n. 8, p. 789-799, 2004.

VON HOFF, D. D.; McGILL, J. R.; FORSETH, B. J.; DAVIDSON, K. K.; BRADLEY, T. P.; VAN DEVANTER, D. R.; WAHL, G.M. Elimination of extrachromosomally amplified myc genes from tumor cells reduces their tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, p. 8165-8169, 1992.

WEITZEL, D. H.; VANDRÉ, D. D. Differential spindle assembly checkpoint response in human lung adenocarcinoma cells. **Cell and Tissue Research**, v. 300, p. 57-65, 2000.

WILSON, G. D.; MCNALLY, N. J.; DISHE, S.; SAUNDERS, M. I.; DES ROCHERS, C.; LEWIS, A. A.; BENNETT, M. H. Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow citometry. **British Journal of Cancer**, v. 58, n. 4, p. 423-31, 1988.

WOODBURN, JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, p. 241–250, 1999.

WU, Q.; HOFFMANN, M. J.; HARTMAMM, F. H.; SCHULZ, W. A. Amplification and overexperession of ID4 gene at 6p22.3 in bladder cancer. **Molecular Cancer**, v. 4, p. 16-22, 2005.

YARDEN, Y. & SLIWKOWISKI, M; X. Untangling the ErbB signalling network.
Nature Reviews in Molecular Cell Biology, v. 2, p. 127–137, 2001.

YOON, S. K., KIM, S. H., LEE, G. M. Effect of low culture temperature on specific productivity and transcription level of anti-4-1BB antibody in recombinant Chinese hamster ovary cells. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1383-1386, 2003.

YUEN, K. W. Y.; MONTPETIT, B.; HIETER, P. The kinetochore and cancer: what's the connection? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 576-582, 2005.