Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

BEATRIZ DE ARAUJO CORTEZ

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

Novembro 2009

Universidade de São Paulo

Instituto de Biociências

Beatriz de Araujo Cortez

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

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

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

São Paulo

2009

Ficha Catalográfica

Cortez, Beatriz de Araujo

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

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Aneuploidia 2. Crisotila 3. Mitose 4. Videomicroscopia 5. Amplificação centrossômica
I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Tadeu e Leda.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli, pela orientação, incentivo e amizade nestes 6 anos de laboratório, pela confiança nos momentos difíceis e por me mostrar quão bonita a biologia pode ser;

A todos os meus professores da graduação e pós-graduação, por tudo o que me ensinaram sobre biologia e acrescentaram na minha formação;

Aos meus pais, Leda e Tadeu, por acreditarem em mim e na minha escolha, além de me darem todas as condições necessárias e principalmente amor para que eu chegasse até aqui;

Aos meus irmãos Isabel e Fernando pelos conselhos e críticas já cotidianas, e por me darem segurança, pois que sei que sempre estaremos juntos;

Ao Raphael, meu namorado, por compartilhar comigo suas idéias e seu tempo, pelo seu sempre bom humor e tranquilidade, e pelos deliciosos jantares em Córdoba;

Ao Prof. Alberto Augusto Ribeiro, por me orientar e apoiar nas monitorias de Biologia Celular, tão importantes na minha formação;

Ao Dr. Alfredo Cáceres, por me receber em seu laboratório dentro do Instituto de Investigación Medica Mercedes & Martin Ferreyra, e pela grande ajuda nos experimentos de *time-lapse*;

Ao pessoal da Olympus do Brasil, em especial a Sara, João e Edu, por me cederem alguns meses de microscópio além de todo o apoio para a viagem à Argentina;

Ao Prof. Dr. Fabio Siviero e à Dra. Paula Rezende, por me mostrarem o incrível mundo da biologia molecular, e por estarem presentes em todos esses anos compartilhando ótimos momentos de laboratório;

Ao Jonatas, Paula e Amanda pelas conversas, discussões (úteis ou nem tanto), confidências e muitas risadas dentro do quadrado;

Ao Marcel, pela amizade desde o primeiro dia de laboratório, sempre com seu bom humor, bom gosto e disposição a ajudar;

À Raquel, Camila, Marina, Michelle, Ludi e Evandro, por todas as conversas sobre experimentos e pela ajuda constante no fluxo, bancada, e citômetro, e por deixarem o laboratório tão animado;

À Dra. Vanessa Freitas, pela companhia, ajuda e incentivo nas inúmeras tentativas de *time-lapse*;

À Dra. Marisa Ionta, por sempre estar disposta a discutir e ajudar nos experimentos, ajudando a todos nas dificuldades da biologia celular;

Ao Mingau (André), pelos gelos no bolso, gelo seco no cabelo, e pela trilha sonora ao vivo do laboratório, ou seja, por me divertir mesmo quando me pentelha;

À Natalia, pelas fundamentais aulas de espanhol e pela companhia;

Ao Felipe Lourenço Claro por ser meu companheiro de monitorias e por me ajudar com as questões do departamento a distância;

À Dona Nancy, pela companhia e paciência, e por colocar o laboratório em ordem diariamente;

A Laura, Moni, José, Sole, Luján, Ivan, Viky, Flor e Ceci, meus amigos argentinos de laboratório, por toda a ajuda com os experimentos e por terem me recebido tão bem, e ao Gonzalo e Nacho, pelas muitas conversas sobre biologia e principalmente microscopia;

À Elly, Viviane e Marisa Prado, que estiveram presentes nos meus primeiros anos de laboratório, por me ensinaram tantas coisas;

Aos meus amigos queridos da graduação Ari, Bira, Carol, Cyrus, Diogro, Débora, Huno, Jucks, Lau, Otite, Ph, Ricky, que continuam sempre presentes tornando qualquer programa tão legal, e a Ana, Ju Zampis, Luisa, Carolzinha e Karina, por serem amigas tão diferentes e tão especiais;

À Dani, Cassi, Dafne, Bruno, Rudi e Pedro, meus amigos da escola que ainda se fazem presentes, por nos nossos encontros esporádicos porém essenciais;

Ao meu Tio Márcio, pela ajuda com a revisão do texto;

Às secretárias do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Deisy e Helenice, pela ajuda e atenção;

Ao pessoal da Secretaria de Pós Graduação do IB, em especial a Érika e Helder, por sempre estarem dispostos a ajudar;

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB;

A CAPES, FAPESP e Red de MacroUniversidades da América Latina e Caribe/SANTANDER pelas bolsas concedidas, e também ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Índice

Capítulo I. Conceitos Introdutórios

1.1 O Amianto	9
1.2 A Divisão Celular e a Aneuploida	13
1.3 Objetivos	20
1.4 Referências Bibliográficas	21

Capítulo II. Formação de População Aneuploide Após Tratamento com Crisotila: Alterações no Ciclo Celular e Potencial Genotóxico

<i>Abstract/Resumo</i>	27
2.1 Introdução	29
2.2 Materiais e Métodos	32
2.3 Resultados	37
2.4 Discussão	54
2.5 Considerações Finais Conclusões	60
2.6 Referências Bibliográficas.....	62

Capítulo III. Tubulinas Fusionadas às Proteínas Fluorescentes e Microscopia em Tempo Real: Estudos dos Efeitos da Crisotila na Divisão Mitótica

<i>Abstract/Resumo</i>	66
3.1 Introdução.....	68
3.2 Materiais e Métodos.....	72
3.3 Resultados	78
3.4 Discussão	120
3.5 Considerações Finais Conclusões	125
3.6 Referências Bibliográficas.....	126

Capítulo IV. Considerações Finais 131

Capítulo I

Conceitos Introdutórios

1.1 O Amianto

Encontrado naturalmente na crosta terrestre, o asbesto ou amianto é uma fibra mineral cujas características como a resistência à tração maior que a do aço, aos ácidos e a temperaturas de até 1.000°C , não sendo oxidável nem combustível, o tornam muito importante para o uso humano – há registros de sua utilização já na Grécia Antiga. Com exploração comercial iniciada em 1878 na região de Quebec, Canadá, a produção mundial das fibras de amianto atingiu cerca de 4 milhões de toneladas nos últimos anos. Suas aplicações industriais chegam a 3 mil produtos, sendo os mais numerosos o fibrocimento (que também dá origem a telhas e caixas d'água), os produtos de fricção de automóveis e os isolantes térmicos. Em consequência do crescente interesse comercial que despertaram, tanto a mineralização como a industrialização das fibras de amianto têm levado um grande número de trabalhadores a ficar exposto a este mineral (MURRAY, 1990).

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

A

B

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

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

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

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

Os tecidos pulmonares de pessoas expostas ao asbesto que morreram de doenças a ele relacionadas foram também analisados a fim de identificar os tipos de fibras presentes. Normalmente são encontradas fibras do tipo amosita, crisotila e crocidolita,

porém estas raramente se encontram puras, dificultando a análise do potencial carcinogênico de cada uma (LANGER & NOLAN, 1998).

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

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

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

BERNSTEIN e col. (2005) verificaram que as fibras de crisotila não se acumulam como as do tipo anfibólio em pulmões de camundongos expostos às fibras por 5 dias. Os tecidos observados em microscopia de luz apresentam fibras do tipo anfibólio maiores que 20 µm até 400 dias após o final da exposição, enquanto as fibras de crisotila maiores que 20 µm não foram encontradas nos pulmões de animais após 10

dias da exposição. Entretanto, foram encontradas fibras de crisotila de até 5µm nos tecidos dos pulmões dos camundongos até 400 dias após a exposição, sugerindo que as fibras de crisotila sofram uma fragmentação em pedaços pequenos quando se alojam nos tecidos. Se estes fragmentos pequenos são eliminados dos organismos e como seriam eliminados são pontos ainda não elucidados.

1.2 A divisão Celular e a Aneuploidia

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

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

O processo de divisão mitótica é classicamente dividido em quatro fases: fase G1, fase S, fase G2 e fase M (quando o material genético duplicado em S e o citoplasma são divididos entre as duas células filhas). Estas quatro fases são estritamente controladas e só podem ocorrer quando a fase anterior for corretamente completada, e para tanto existem diversos mecanismos de verificação e controle do ciclo celular. Para que cada fase do ciclo se inicie é necessário que ciclinas específicas se liguem a Cdks (quinases dependentes de ciclinas), e o complexo então formado é capaz de fosforilar diferentes substratos, promovendo os eventos necessários para cada fase do ciclo

(HUNTER, 1993). Existem também proteínas capazes de inibir estes complexos, que são chamadas de Cdkis, que mantêm os sítios ativos das Cdks inativos. As mais estudadas são p15, p16, p21 e p27, e o equilíbrio entre as Cdks, Cdkis e ciclinas é essencial à manutenção de uma população celular (KAMB, 1995).

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

Após a fase S ocorre a fase G2, intervalo entre a fase S e a fase M, quando ocorre a transcrição e tradução da maquinaria necessária à divisão celular, além do amadurecimento dos centríolos que também foram duplicados na fase S. Ao final da fase G1 e ao final da G2 ocorrem os pontos de checagem de G1/S e G2/M, que verificam se as condições do ambiente são favoráveis ao crescimento e divisão celular e se o material genético sofreu algum dano, e se o DNA foi totalmente replicado e de forma correta, respectivamente. Caso o material genético contenha algum dano, a proteína p53 é ativada e leva a transcrição de p21, que vai desencadear o reparo do dano ou o encaminhamento da célula para a morte celular programada (HUNTER, 1993).

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

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

Quando os cromossomos apresentam seus cinetócoros ligados a microtúbulos provenientes de pólos opostos do fuso e passam a se localizar na região equatorial da célula formando a placa metafásica, é caracterizada a metáfase. Neste momento ocorre o ponto de checagem do fuso mitótico, que é capaz de verificar se todos os cinetócoros dos cromossomos estão ligados aos microtúbulos e se as cromátides irmãs estão ligadas aos microtúbulos provenientes de pólos opostos. Cinetócoros livres, ou seja, não ligados a microtúbulos, são capazes de reter proteínas deste ponto de checagem, as quais retêm a proteína Cdc20 nos cinetócoros. Quando microtúbulos estão ligados aos cinetócoros os sítios de ligação das proteínas do ponto de checagem se tornam fracos e elas se desligam dos cinetócoros, liberando Cdc 20, que então se liga e ativa o APC (complexo promotor da anáfase). Este, por sua vez, leva à ubiquitinação da securina, que assim libera a separase para clivar a coesina que mantém as cromátides irmãs unidas, permitindo a segregação dos cromossomos. Além disso, o APC ativa a degradação da

ciclina B, que fará com que as alterações ocorridas para entrada na mitose sejam revertidas (MUSACCHIO & HARDWICK, 2002; RIEDER & MAIATO, 2004).

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

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

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

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

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

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

A hipótese de que a aneuploidia estaria relacionada ao desenvolvimento de tumores foi feita por BOVERI há quase 100 anos (BOVERI, 1914), quando observou que,

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

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

Já está bem estabelecido que a perda ou ganho de um único cromossomo ou parte dele pode acarretar o desequilíbrio dos níveis de expressão de certos genes e a introdução de diversas mutações envolvidas em transformações malignas, além de erros na segregação cromossômica, motivando uma maior instabilidade genética (LENGAUER *et al.*, 1997; FUKASAWA 2005). Erros em eventos relacionados à divisão mitótica podem ocasionar instabilidade cromossômica e levar à formação de células aneuploides. Entre

estes erros podemos destacar a falha no processo de citocinese, a perda da função do ponto de checagem mitótico, a falha na função do cinetócoro e a amplificação anormal do número de centríolos. A falha na citocinese e a amplificação centríolômica são eventos relacionados, já que a primeira leva à formação de uma célula com conteúdo de DNA e de centríolos duplicados.

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

A duplicação do centríolo tem início no final de G1/início de S, e durante S e G2 os novos centríolos se alongam e a matriz pericentriolar é recrutada, e no final de G2 os dois centríolos já estão totalmente formados. A sincronização da duplicação dos centríolos e do DNA ocorre pela ativação no final de G1 do complexo Cdk2-ciclina E. Este complexo está envolvido na replicação do DNA pela fosforilação da proteína Rb, e foi descoberto que a duplicação dos centríolos também é iniciada por Cdk2-ciclina E (NEVINS, 1992; MATSUMOTO *et al.*, 1999; HINCHCLIFFE & SLUDER, 2001, MATSUMOTO & MALLER, 2004).

Recentemente os centríolos estão sendo vistos como um centro de reações, organizando espaço-temporalmente os componentes dos pontos de checagem (LOFFLER *et al.*, 2006), e até foram postulados como centros de controle do ciclo celular (DOXSEY, 2001; DOXSEY *et al.*, 2005). Chk1 e Chk2 estão entre as proteínas reguladoras do ponto

de checagem encontradas nos centrossomos, o que sustenta a proposta destas funções adicionais.

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

1.3 OBJETIVOS

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

- análise do ciclo celular, formação de células aneuploides e índice mitótico após tratamento com crisotila e recuperação por 48 horas, 4 dias e 8 dias;
- avaliar o potencial genotóxico da exposição à crisotila pela determinação da frequência de micronúcleos;
- análise da presença de fibras de crisotila durante todos os períodos de recuperação;
- estabelecimento das condições necessárias para observação das células vivas por *time-lapse*, e análise da formação de mitoses multipolares e destinos destas células.

1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- HUNTER, T. Braking the cycle. **Cell**, 75: 839-841, 1993.
- JOHNSON, D. G; SCHNEIDER-BROUSSARD, R. Role of E2F in cell cycle control and cancer. **Front. Biosc.**, 3: 447-8, 1998.
- KAMB, A. Cell-cycle regulator and cancer. **TIG**, 11: 136-140, 1995.
- KOFF, A.; GIORDANO, A.; DESAI, D.; YAMASHITA, K.; HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. et al. Formation and activation of a cyclin E–cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. **Science**, 257: 1689–1694, 1992.
- LANDRIGAN, P. J. Asbestos- Still a carcinogen. **N. Engl. J. Med.**, 338: 1618- 1619, 1998.
- LANGER, A. M.; NOLAN, R. P. Asbestos in the lungs of persons exposed in the USA. **Monaldi Arch. Chest Dis.**, 53: 168-80, 1998.
- LENGAUER, G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, 386: 623-7, 1997.
- LOFFLER, H.; LUKAS, J.; BARTEK, J.; KRAMER, A. Structure meets function: centrosomes, genome maintenance and the DNA damage response. **Exp. Cell. Res.**, 312: 2633-40, 2006.
- MACHADO–SANTELLI, G. M.; MORI, L.; PEREIRA, C. A. Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Anal Cell Pathol.**, 7: 321-34, 1994.
- MANNING, C. B.; VALLYATHAN, V.; MOSSMAN, B. T. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. **Int. Immunopharmacol.**, 2: 191-200, 2002.
- MATSUMOTO, Y.; HAYASHI, K.; NISHIDA, E. Cyclin-dependent kinase 2 (cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells, **Curr. Biol.**, 9: 429–432, 1999.
- MATSUMOTO, Y.; MALLER, J. L. A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. **Science**, 306: 885-8, 2004.

- MERCHANT, J. A. Human Epidemiology: A Review of Fiber Type and Characteristics in the Development of Malignant and Nonmalignant Disease. **Environ. Health Perspec.**, 88: 287-293, 1990.
- MOSSMAN, B. T.; BIGNON, J. B.; CORN, M.; EATON, A.; GEE, J. B. L. Asbestos: scientific developments and implications for public policy. **Science**, 247: 294–301, 1990.
- MURRAY, R. Asbestos: a chronology of its origins and health effects. **Br. J. Ind. Med.**, 47: 361-365, 1990.
- MUSACCHIO, A.; HARDWICK, K. G. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 3: 731–741, 2002.
- NEVINS, J. R.. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. **Science**, 258: 424-9, 1992.
- OSINUBI, O. Y.; GOCHFELD, M.; KIPEN, H. M. Health effects of asbestos and nonasbestos fibers. **Environ. Health Perspect.**, 108: 665-74, 2000.
- PATHAK, S.; MULTANI, A. S. Aneuploidy, stem cells and cancer. **Exs.**, 96: 49-64, 2006.
- REHEN, S. K.; MCCONNELL, M. J.; KAUSHAL, D.; KINGSBURY, M. A.; YANG, A. H.; CHUN, J. Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98: 13361-6, 2001.
- RIEDER, C. L.; MAIATO, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. **Dev. Cell**, 7: 637–651, 2004.
- STORCHOVA, Z., PELLMAN, D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 5: 45-5, 2004.
- ZHANG, L.; ROTHMAN, N.; WANG, Y.; HAYES, R. B.; LI, G.; DOSEMECI, M.; YIN, S.; KOLACHANA, P.; TITENKO-HOLLAND, N.; SMITH, M. T. Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene. **Carcinogenesis**, 19: 1955-61, 1998.

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

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

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

Capítulo II

Indução de População Aneuploide após Tratamento com crisotila: alterações no ciclo celular

ABSTRACT

Studies *in vivo* and *in vitro* are trying to elucidate the asbestos effects in cells that could be related to the development of asbestos associated diseases. Chrysotile is one of the six types of asbestos naturally found on earth, and it is the only that still can be commercialized in most of the countries. Exposure to others types of asbestos are associated serious health disease, such as asbestosis, carcinomas and pleural mesotheliomas. The association of chrysotile exposure and health diseases is controversy, however *in vitro* studies show the mutagenic potential of this fiber that can induce DNA and cell damage. The present work aimed to analyze alterations in lung small cell carcinoma culture after 48 h of chrysotile exposure followed to 48 h, 4 days and 8 days of recovery in fiber-free culture medium. Some alterations such as aneuploid cell formation, increased frequencies of G2/M cell, decreased frequencies of G1 cells, and increased frequencies of cells in early M phases as metaphase were found in cell culture even after 8 days of recovery. The presence of chrysotile fibers in cell culture and the cell morphology were observed by confocal microscopy and after 4 and 8 days of recovery were observed only few chrysotile fragments inside some cells, and the morphology of cell culture are similar to control situation, formed mostly by mononucleated cells. The induction of micronuclei occurred after chrysotile treatment followed to 48 h and 4 days of recovery, however after 8 days of recovery the number of micronucleated cells was similar to control situation. We conclude that HK2 cells exposed to chrysotile fibers for 48 h show alterations in cell culture such as aneuploid cell formation, and these alterations can persist in cell culture even in absence of chrysotile fibers

RESUMO

Estudos *in vivo* e *in vitro* tentam elucidar as alterações causadas por asbesto que podem ter a ver com o desenvolvimento das doenças vinculadas a essas fibras. Células em

cultura expostas a asbesto por até 72 horas apresentam produção de espécies reativas de oxigênio, além de aumento da expressão de enzimas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo. Após a exposição ao asbesto também são encontradas maior frequência de micronúcleos, quebras da dupla fita de DNA e formação de células aneuploides. Já alterações do ciclo celular foram investigadas por citometria de fluxo, e o tratamento com asbestos parece levar ao acúmulo de células em G2/M. O presente estudo tem como objetivo verificar a presença de alterações causadas em células em cultura expostas à crisotila por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias. As seguintes alterações foram verificadas em células expostas à crisotila por 48 horas: formação de população de células aneuploides, diminuição de frequência de células em G0/G1, aumento de células em G2/M, aumento do número de células micronucleadas e aumento relativo de células em metáfase quanto à porcentagem de células em fases mais tardias do ciclo celular, como anáfase e telófase. Após 8 dias de recuperação, apenas a frequência de células micronucleadas voltou a ser semelhante a células controle. Por microscopia confocal verificou-se que após 4 dias e 8 dias de recuperação fibras longas de crisotila não estão mais presentes na cultura, e pequenos pontos de fibra são observados raramente após 8 dias de recuperação. Conforme os dados revelaram, a exposição à crisotila leva a alterações que são mantidas na cultura, mesmo após 8 dias de recuperação em meio livre de fibras, e podem estar relacionadas a problemas na divisão celular.

2.1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* procuram esclarecer os efeitos que a exposição ao asbesto tem sobre as células, tentando assim entender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das doenças relacionadas ao asbesto. Trabalhos utilizando cultura de diferentes tipos celulares expostas ao asbesto por períodos de 1 a 72 horas mostraram alguns efeitos citotóxicos e mutagênicos das fibras.

A exposição ao asbesto foi primeiramente relacionada ao estresse oxidativo, levando à formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres que podem causar danos ao material genético. SUZUKI & HEI (1996) estudaram a presença de uma enzima hemioxigenase, que tem sua expressão induzida em resposta a estresse oxidativo, em células em cultura expostas à crisotila por 8 horas. Eles observaram que após o tratamento com a fibra o aumento da presença da enzima foi de até 4,5 vezes em relação a células controle, e de forma dose-dependente. Já radicais livres são encontrados em células em cultura após 24 horas de exposição à crisotila (DOPP *et al.*, 2005).

O estresse oxidativo causado pela exposição à crisotila pode estar relacionado a danos ao material genético. Foi observado que células em cultura expostas à crisotila por 3 e 24 horas apresentam aumento do número de quebras na dupla fita de DNA e também de forma dose-dependente (OKAYASU *et al.*, 1999; BERMEISTER *et al.*, 2004). Já a utilização de sondas específicas para cromossomos 1 e 9 humanos possibilitou o estudo de quebras nestes cromossomos em células do líquido amniótico humano expostas a diferentes fibras por 48 horas. Células expostas à crisotila apresentaram aumento significativo no número de quebras destes cromossomos, e o tratamento com a fibra crocidolita gerou o maior número de quebras observado (DOPP *et al.*, 1997).

Dano ao material genético e quebras nos cromossomos estão comumente relacionados à formação de micronúcleos, corpos cromatínicos que contêm partes de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram corretamente alinhados na placa metafásica, gerados a partir de quebras cromossômicas ou erros durante a mitose, como a incorreta formação dos fusos. Em células expostas à crisotila por 24, 48 e 72 horas é encontrado um aumento do número de micronúcleos de até cinco vezes em relação às células controle, dos quais o maior número é encontrado após 48 horas de exposição às fibras (DOPP *et al.*, 2005). Quanto maior a concentração de fibra utilizada, maior o número de micronúcleos, até uma concentração máxima de fibra, depois da qual a maior parte das células em cultura é encaminhada à morte celular, enquanto o número de micronúcleos na cultura diminui (DOPP *et al.*, 1997). Células apoptóticas já foram observadas em diferentes culturas expostas à crisotila por 3 a 72 horas, evidenciando que os danos causados pelas fibras podem ser severos e irreversíveis, fazendo com que a célula seja encaminhada para a morte (BERMEISTER *et al.*, 2004; LEVRESSE *et al.*, 1997).

A exposição ao asbesto também está relacionada a alterações no ciclo celular, como foram observadas por citometria de fluxo. Células mesoteliais de pleura de rato expostas à crisotila por 24 e 48 horas apresentam acúmulo de células em G0/G1 e diminuição de células em fase S. Diferentemente, células tratadas com crocidolita mostram atraso em G1/S, porém não ocorre retenção em fase S. Já ambos os tratamentos são capazes de levar a um acúmulo de células em G2/M. Quando estas células tratadas com asbesto são visualizadas ao microscópio, vêem-se células binucleadas, sugerindo que as células chegam à fase M quando ocorre alguma anormalidade que pode induzir à formação das células bi e multinucleadas, e logo o acúmulo observado seja na fase M, e não em G2 (LEVRESSE *et al.*, 1997).

Alterações no ciclo celular estão relacionadas à formação de células aneuploides, que por sua vez já foram observadas em culturas expostas ao asbesto. Células poliploides foram identificadas por citometria de fluxo após exposição à crisotila e à crocidolita por 48 horas em frequências semelhantes, apresentando um aumento de até duas vezes em relação ao controle (DOPP *et al.*, 1997). Já por sistema de análise de imagem é possível quantificar o conteúdo de DNA de núcleos de células em cultura, e com o uso deste sistema observou-se que após o tratamento com crisotila por 48 horas se forma uma população de células aneuploides. Tempos de recuperação em meio livre de fibras de 24 a 72 horas após as 48 horas de exposição às fibras não são suficientes para que a população aneuploide diminua na cultura. No mesmo trabalho também foram observadas células apoptóticas e altas frequências de células bi e multinucleadas, indicando que as fibras deveriam estar interferindo na mitose, e estas alterações poderiam estar relacionadas à formação de células aneuploides (CORTEZ & MACHADO-SANTELLI, 2008).

O presente estudo teve como objetivo analisar a formação de células aneuploides formadas após exposição à crisotila em três diferentes concentrações seguidas de longos períodos de recuperação em meio livre de fibras. Alterações no ciclo celular que podem estar envolvidas na formação de células aneuploides também foram investigadas, utilizando citometria de fluxo, incorporação de BrdU, contagem de micronúcleos e índice mitótico.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Cultura Celular

Foi utilizada linhagem celular HK2, proveniente de carcinoma de células não pequenas de pulmão, estabelecida em nosso laboratório (BONALDO *et al.*, 1991). As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle modificado por Dubelco (DMEM) com nutriente F-12 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As culturas foram mantidas em estufa a 37⁰C, com alta umidade relativa (maior que 90%) e em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias e as células foram subcultivadas regularmente. As subculturas foram obtidas por dissociação com solução de tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02% (citada apenas como solução de tripsina durante o texto).

Nessa parte do estudo também foram realizados experimentos com células da linhagem BRL3A, proveniente de fígado de rato, e VERO, proveniente de células epiteliais de rim de macaco-verde. Estas linhagens foram cultivadas nas mesmas condições que as células HK2, com exceção da porcentagem de soro fetal bovino acrescido ao meio de cultura para a linhagem BRL3A, que foi de 5%.

Os estoques celulares de cada linhagem foram congelados em meio de cultura com 10% de soro fetal bovino e 10% de crioprotetor (Dimetilsulfóxido – DMSO), acondicionados em ampolas, mantidos em nitrogênio líquido.

2.2.2 Tratamento com Crisotila

Para o tratamento com crisotila as células foram transferidas para placas de Petri de 35 mm de diâmetro onde permaneceram por 24 horas, quando o meio foi substituído por uma mistura meio de cultura e fibras de crisotila. Para os experimentos de

quantificação de DNA por análise de imagem foram utilizadas as concentrações de crisotila de 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL, e para todos os outros experimentos empregou-se apenas a concentração de 125 µg/mL. As fibras continuaram em contato com as células por 48 horas, quando o meio de cultura com fibras foi substituído por meio livre de fibras, dando início ao período de recuperação. Os tempos de recuperação foram: 24 horas (para experimentos de incorporação de BrdU), 48 horas, 4 dias e 8 dias (para experimentos de quantificação de DNA, citometria de fluxo, contagem de micronúcleos e índice mitótico). O meio de cultura foi trocado sempre a cada dois dias durante os períodos de recuperação, e para cada tratamento foram feitos controles que permaneceram em cultura pelos mesmos períodos e tiveram seus meios de cultura trocados nos mesmos dias que as células tratadas.

2.2.3 Quantificação de DNA – Reação de Feulgen

O conteúdo nuclear de DNA das células HK2 tratadas e controle foi quantificado com auxílio do *software* CIRES (Cell Image Retrieval and Evaluation System - Kontron Elektronik) instalado em um microscópio Axioskop (Zeiss). Para análise as células foram submetidas a reação de Feulgen (MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994). Inicialmente foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 30 minutos, lavadas com PBSA três vezes, e o DNA foi então desnaturado com HCl 5N por 30 minutos. As células foram lavadas em água corrente e, após secas foram, coradas com reativo de Schiff por 90 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos.

A quantificação de DNA foi feita de células HK2 tratadas com crisotila (250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL) por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias. Foram quantificados 400 núcleos de células mononucleadas, 400 de binucleadas e 400 de multinucleadas para cada situação tratada e controle.

2.2.4 Citometria de Fluxo

Células HK2 controle e tratadas com crisotila (125 µg/mL) por 48 horas e recuperadas por 48 horas, 4 dias e 8 dias tiveram seu ciclo celular analisado por citometria de fluxo. Para tanto as células foram dissociadas com uso de solução de tripsina, centrifugadas a 800 rpm por 10 minutos, lavadas com PBSA e novamente centrifugadas. Após foram fixadas em metanol gelado por 1 h a 4⁰C, lavadas com PBSA e novamente centrifugadas. Foram então ressuspensas em uma mistura de 200 µL de PBSA + 20 µL de RNase + 20 µL de iodeto de propídio. Após 1 hora a leitura foi feita por meio do sistema Guava (GE Healthcare), e foram analisadas 5.000 células a cada leitura, e para cada tempo foram feitas três placas controle e três tratadas, então coradas e lidas independentemente.

2.2.5 Incorporação de BrdU

Foi feita incorporação de BrdU em células HK2 controle, tratadas com crisotila (125 µg/mL) por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 24 horas, para que fossem analisados efeitos proliferativos/antiproliferativos da exposição à fibra. A incorporação de BrdU se deu por 30 minutos a 0,3 mM, e o reagente foi diluído em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Depois da incorporação as células foram fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 20 minutos, lavadas três vezes com PBSA e permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 10 minutos. Após três lavagens com PBSA o DNA foi hidrolisado com HCl 2N por 30 min, e as células lavadas três vezes com PBSA por 5 minutos em cada lavagem. A revelação foi feita com 10 µL do anticorpo anti-BrdU (1:1000, Sigma) por 1 hora, seguido de 10 µL do anticorpo anti-mouse FITC (1:200, Sigma) após três lavagens com PBSA. As células foram incubadas

com RNase por 30 minutos, lavadas novamente com PBSA e a lâmina montada com 4 µL de iodeto de propídio e 10 µL de Vecta Shield.

2.2.6 Imunofluorescência

Para imunofluorescência as células foram subcultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro e após os períodos de tratamento e recuperação foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos; depois de três lavagens com PBSA foram tratadas com Triton X-100 0,5% durante 15 minutos. As placas foram lavadas novamente e 5µl do anticorpo anti- α e 5 µl de anti- β tubulina (1:250, Sigma) foram colocados sobre cada lamínula e deixados em contato com as células *over night* em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBSA, e 7 µl do anticorpo anti-mouse FITC (1:200, Sigma) foram colocados sobre a lamínula por 2 horas, sendo o material mantido em câmara úmida e escura neste período. Após as placas foram lavadas três vezes com PBSA e as lamínulas montadas em lâminas com 4µl de iodeto de propídio para coloração dos núcleos e 10 µl de *anti-fadding*.

2.2.7 Índice Mitótico

Foi determinado o índice mitótico a partir da contagem de células em diferentes fases da mitose. Para tanto utilizaram-se células HK2 tratadas com crisotila por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias, e submetidas a imunofluorescência conforme descrito antes. Foram contadas 1.000 células por lâmina, e para cada tempo foram analisadas 3 lâminas tratadas e 3 lâminas controles. As figuras de divisão foram divididas em metáfase e anáfase + telófase, e ao final da contagem foram calculadas as frequências em porcentagem.

2.2.8 Frequência de Micronúcleos

As mesmas lâminas utilizadas para a contagem do índice mitótico serviram para a contagem de micronúcleos. Foram analisadas células HK2 tratadas por 48h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias, e as células controle permaneceram em cultura pelos mesmos períodos. Para cada tempo de recuperação foram analisadas 3 lâminas controle e 3 lâminas tratadas.

Foi contado o número de células com micronúcleos (chamadas células micronucleadas) presentes em 1.000 células em cada lâmina. Ao final foram calculadas as frequências em porcentagem.

2.2.9 Morfologia das Células e Presença de Fibras

A morfologia das células HK2, BRL3A e VERO tratadas com crisotila foi acompanhada por microscopia. Para tanto as células foram submetidas à imunofluorescência, conforme descrito acima, e observadas ao microscópio de fluorescência (X-81, Olympus).

As células HK2 foram também observadas ao microscópio confocal de varredura a *laser*, que a partir de uma configuração de *lasers* e filtros permite a visualização das fibras de crisotila por sua autofluorescência. Foi então avaliada a presença de fibras em cultura após 48 horas, 4 dias e 8 dias de recuperação após o tratamento com crisotila.

2.2.10 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo teste χ^2 de tendência, tomando-se como referência o grupo controle e, em alguns casos, o

tratamento/recuperação no tempo anterior. Em todas as análises o nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Formação de células aneuploides é dependente da concentração após o tratamento com crisotila e longos períodos de recuperação

Células HK2 tratadas com três diferentes doses de crisotila (250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$) por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias tiveram seus conteúdos de DNA nuclear quantificados por sistema de análise de imagem. O programa, a partir de valores de IOD (densidade ótica integrada) e da definição dos valores correspondentes a células diploides, fornece os valores de ploidia de cada núcleo analisado, e estes valores foram então divididos em cinco classes: hipodiploide (conteúdo de DNA menor que 1,49 C), diplóide (conteúdo de DNA entre 1,5 e 2,39 C), hiperdiploide (conteúdo de DNA entre 2,4 e 3,5 C), tetraploide (conteúdo de DNA entre 3,6 e 5,1 C) e hipertetraploides (conteúdo de DNA maior que 5,1 C). Núcleos da última classe foram chamados também de aneuploides.

O tratamento com crisotila levou a um aumento da frequência de núcleos hipertetraploides quando comparado à situação controle, quando a frequência de núcleos hipertetraploides era aproximadamente 0,25% em todos os tempos testados. Quando analisados núcleos de células tratadas com crisotila por 48 horas e recuperadas em meio normal por 48 horas, a frequência de núcleos aneuploides foi de 7% em células tratadas com a mais alta concentração de crisotila testada (250 $\mu\text{g/mL}$) e de 3,5% em células tratadas com a menor concentração de crisotila testada (62,5 $\mu\text{g/mL}$). Em células tratadas com a concentração intermediária de crisotila (125 $\mu\text{g/mL}$) a frequência de núcleos aneuploides foi de 4,5%. Quando analisados tempos mais longos de recuperação, a

frequência de núcleos aneuploides aumentou, chegando a 10,5% em células tratadas com 250 µg/mL de crisotila e recuperadas por 8 dias. Células tratadas com 125 µg/mL e 62,5 µg/mL de crisotila e recuperadas por 8 dias apresentaram 5,9% e 4,67% de núcleos aneuploides, respectivamente (Fig. 1, Tab. 1)

Tabela 1: Porcentagem de núcleos hipodiploides, diploides, hiperdiploides, tetraploides e hipertetraploides de células HK2 controle e tratadas com crisotila. Foram quantificados os conteúdos de DNA dos núcleos de células HK2 controle e tratadas com 3 diferentes concentrações de crisotila (250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL) por 48 h, seguidas de 48 h, 4 e 8 dias de recuperação em meio livre de fibras. Os núcleos foram divididos em 5 classes de acordo com seu conteúdo: hipodiploides (conteúdo de DNA $\leq 1,49$ C), diploides (conteúdo de DNA entre 1,5C and 2,39C), hiperdiploides (conteúdo de DNA entre 2,4C e 3,59C), tetraploides (conteúdo de DNA entre 3,6C e 5,1C), e hipertetraploide (conteúdo de DNA $>5,1$ C).

		hipodiploide e (%)	diploide (%)	hiperdiploide (%)	tetraploide (%)	hipertetraploid e (%)
	Células Controle	3,83 (46/1200)	58,92 (707/1200)	20,17 (242/1200)	16,83 (202/1200)	0,25 (3/1200)
250 µg/mL crisotila	48 h recuperação	8,83 (106/1200)	28,75 (345/1200)	29,08 (349/1200)	26,27 (320/1200)	7,4 (89/1200)
	4 dias recuperação	5,83 (70/1200)	31,67 (380/1200)	27,58 (331/1200)	26,17 (314/1200)	9,17 (110/1200)
	8 dias recuperação	5,92 (71/1200)	31,08 (373/1200)	29,83 (358/1200)	22,58 (271/1200)	10,58 (127/1200)
125 µg/mL crisotila	48 h recuperação	5,50 (66/1200)	35,08 (421/1200)	32,17 (386/1200)	22,75 (273/1200)	4,5 (54/1200)
	4 dias recuperação	5,50 (66/1200)	43,0 (516/1200)	20,92 (251/1200)	26,17 (314/1200)	4,42 (53/1200)
	8 dias recuperação	4,50 (54/1200)	53,42 (641/1200)	16,42 (197/1200)	20,08 (241/1200)	5,58 (67/1200)
62,5 µg/mL crisotila	48 h recuperação	8,0 (96/1200)	44,5 (534/1200)	26,42 (317/1200)	17,58 (211/1200)	3,5 (42/1200)
	4 dias recuperação	7,67 (92/1200)	45,75 (549/1200)	19,33 (232/1200)	23,83 (286/1200)	3,42 (41/1200)
	8 dias recuperação	4,50 (54/1200)	51,17 (614/1200)	15,42 (185/1200)	24,25 (291/1200)	4,67 (56/1200)

Figura 1: **Aumento da frequência de núcleos aneuploides de células HK2 expostas a crisotila por 48 h seguidas de longos tempos de recuperação.** Células HK2 foram tratadas com três diferentes concentrações de crisotila por 48 h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 h, 4 dias, 6 dias e 8 dias. Os núcleos das células foram quantificados e a porcentagem de núcleos aneuploides (hipertetraploides, conteúdo de DNA > 5,1C) foi calculada. O gráfico mostra o aumento da frequência dos núcleos aneuploides, já desconsiderando a porcentagem de núcleos aneuploides encontradas na situação controle (0,25%)

Foram analisados núcleos de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas independentemente para identificação dos núcleos que formam a população aneuploide. Após 48 horas de exposição à crisotila seguidas de 48 horas de recuperação a população aneuploide era formada principalmente de núcleos de células bi ou multinucleadas. Porém, após 4 dias e 8 dias de recuperação, os núcleos aneuploides encontrados foram principalmente de células mononucleadas (Tab. 2).

Tabela 2: **Número de núcleos aneuploides de células mono, bi e multinucleadas.** Por análise de imagem, foram quantificados o conteúdo de DNA de 400 núcleos de células mononucleadas, 400 de células binucleadas e 400 de células multinucleadas independentemente, tanto para culturas controle quanto para tratadas com crisotila. Foram considerados aneuploides núcleos com conteúdo de DNA > 5,1C, e identificados os núcleos de que quais células (mono, bi ou multinucleadas) formam a população aneuploide em cada condição de tratamento e recuperação (células foram tratadas com diferentes concentrações de crisotila e recuperadas por 48 h, 4 dias e 8 dias).

	Núcleos aneuploides de cél. mononucleadas	Núcleos aneuploides de cél. binucleadas	Núcleo aneuploides de cél. multinucleadas
Controle	3	0	0
250 µg/mL + 48 h	22	27	31
250 µg/mL + 4 d	40	38	27
250 µg/mL + 8 d	65	36	26
125 µg/mL + 48 h	17	14	23
125 µg/mL + 4 d	27	7	19
125 µg/mL + 8 d	30	22	15
62,5 µg/mL + 48 h	10	14	18
62,5 µg/mL + 4 d	17	16	8
62,5 µg/mL + 8 d	28	14	14

Enquanto a frequência de núcleos aneuploides aumentou após o tratamento com crisotila e longos períodos de recuperação, a frequência de núcleos hipodiploides aumentou após 48 horas de recuperação em relação ao controle e, após 4 dias de recuperação, diminuiu e não mais apresentou efeito dose-dependente. A porcentagem de núcleos hipodiploides nas células HK2 controle foi de aproximadamente 5%, enquanto em células tratadas com 250 µg/mL de crisotila recuperadas por 48 horas chegou a 8,83% e a 8% quando analisadas células tratadas com 62,5 µg/mL de crisotila. Após 8 dias de recuperação, apenas células tratadas com a concentração mais alta de crisotila (250 µg/mL) apresentaram uma frequência de núcleos hipodiploides maior que o controle, entretanto esta diferença não é estatisticamente significativa.

2.3.2 Alterações no Ciclo Celular de Células HK2 Tratadas com Crisotila

Foi analisado o ciclo celular de células HK2 tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias. A análise foi feita por citometria de fluxo depois de as células coradas com iodeto de propídio. Os eventos puderam ser divididos em cinco classes: hipodiploides/apoptoses, G1, S, G2/M e hipertetraploides.

Nos histogramas a primeira alteração notada foi que o tratamento com crisotila levou à formação de uma população hipodiploide/apoptótica (Fig. 2). A frequência destas células aumentou após longos tempos de recuperação, chegando a 6,13% após 8 dias de recuperação, enquanto nas células controle esta frequência foi de 1,79% (Tab. 3, Fig. 2).

Analisando o ciclo celular das células HK2 tratadas com crisotila, observou-se que elas apresentaram diminuição de aproximadamente 12% nas frequências de células em G1 quando comparada à frequência de células nesta fase na situação controle (Tab. 3). Esta diferença entre frequências de células em G1 ocorreu em todos os tempos de recuperação testados e sofreu um pequeno aumento nos tempos mais longos de recuperação.

A frequência das células hipertetraploides aumentou após o tratamento com crisotila, mas diminuiu com tempos longos de recuperação. Já quando analisadas células na fase de síntese, não se observou nenhuma diferença significativa (Tab. 3).

A frequência de células em G2/M aumentou após o tratamento com crisotila, e este aumento foi mais acentuado com períodos mais longos de recuperação. A diferença entre a porcentagem de células em G2/M tratadas em relação ao controle com apenas 48 horas de recuperação foi de 2%, enquanto após 8 dias de recuperação esta diferença passou para 8%.

Histogramas de DNA de células HK2 controle e tratadas com crisotila por 48h + 4 dias de recuperação

Figura 2. **Análise do ciclo células de células HK2 controle e tratadas com crisotila por citometria de fluxo.** Células HK2 e tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 h seguidas de 48 h, 4 dias e 8 dias de recuperação tiveram seus núcleos corados por Iodeto de Propídio e foram analisadas ao citômetro de fluxo. Aqui estão representados os histogramas referentes às células tratadas e recuperadas por 4 dias, e os respectivos controles. Foram gerados histogramas em escala linear (vermelhos) e em escala *log* (coloridos). Nos histogramas em mono *log* foi possível dividir as células em hipodiploides/apoptóticas (vermelho), células em fases G1 (azul), S (rosa), G2/M (verde) e células hipertetraploides (azul claro). O tratamento com crisotila levou a um aumento de células hipodiploides/apoptóticas, diminuição de células em G1 e aumento de células hipertetraploides, em todos os tempos de recuperação testados.

Tabela 3: Porcentagens de células HK2 tratadas e controle em diferentes fases do ciclo celular. Células HK2 tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 h e recuperadas por 48 h, 4 dias e 8 dias foram coradas com iodeto de propídio e analisadas ao citômetro de fluxo. Os eventos foram divididos em hipodiploides/apoptoses, G1, S, G2/M e hipertetraploides.

	Hipodiploide (%)	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)	Hipertetraploide (%)
Controle 4 dias em cultura	1,55	57,08	15,36	22,56	3,36
48h crisotila + 48h recuperação	3,13	45,31	17,13	24,45	8,33
Controle 6 dias em cultura	2,66	56,44	16,27	21,83	2,49
48h crisotila + 4 dias recuperação	5,15	43,19	16,7	26,5	7,57
Controle 12 dias em cultura	3,01	55,95	16,53	22,21	2,30
48h crisotila + 8 dias recuperação	3,54	46,32	13,06	30,96	6,12

2.3.3 Alterações no Índice Mitótico e Incorporação de BrdU após Tratamento com Crisotila

Células HK2 foram tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 horas e recuperadas em meio livre de fibras por 48 horas, 4 dias e 8 dias, e depois submetidas a imunofluorescência para visualização da cromatina e dos microtúbulos. Foi determinado então o Índice Mitótico, e foram contadas células em metáfase e em fases mais avançadas da mitose (anáfase + telófase).

Após o tratamento com crisotila, o número total de células em mitose não foi diferente do número total de células controle em mitose, então, para a análise, foram utilizadas porcentagens de células em metáfase e anáfase + telófase do total de células em M, e estas porcentagens apresentaram pequenas diferenças quando comparadas células controle e tratadas.

Quando analisada a frequência de células em metáfase, verificou-se uma tendência de aumento desta frequência após o tratamento com crisotila. Na situação controle, células

mantidas em cultura por 4 dias, 6 dias ou 8 dias sempre apresentaram frequência de células em metáfase menor ou similar à frequência de células em anáfase + telófase. Já células tratadas com crisotila revelaram frequência de células em metáfase sempre maior do que a frequência de células em anáfase + telófase, em todos os tempos de recuperação testados (Fig. 3).

Figura 3: Porcentagem de células HK2 controle e tratadas com crisotila em metáfase e anáfase + telófase. Células HK2 foram tratadas com crisotila por 48 h, recuperadas por 48 h, 4 dias e 8 dias e submetidas à imunofluorescência. Foram contadas células em metáfase, anáfase e telófase de cada tempo de recuperação e de seus respectivos controles, e foi calculada a porcentagem de células em metáfase e anáfase+telófase do total de células em mitose.

As frequências de células em mitose, incluindo metáfase, anáfase e telófase, são muito similares quando comparadas células tratadas e controle, sugerindo que o tratamento com crisotila não tenha um efeito proliferativo ou antiproliferativo. Experimentos com incorporação de BrdU em células controle e tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 horas e recuperadas por 24 horas também apresentam frequências semelhantes de células em fase de síntese, e em todos os experimentos analisados a porcentagem de células em fase S foi de 25% a 30%, não ocorrendo diferença entre controle e tratado.

2.3.4 Potencial Mutagênico das Fibras de Crisotila: Indução de Micronúcleos

Células HK2 tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 horas e recuperadas por 48 horas, 4 dias e 8 dias foram analisadas em relação à formação de micronúcleos. Foi contado o número total de células micronucleadas (células MN): 1.000 células por lâmina.

O tratamento com crisotila levou a um aumento no número de células MN. Nas células controle a porcentagem de células MN ficou ao redor de 0,35%. Após o tratamento seguido de 48 horas de recuperação esta porcentagem passou para 0,75% (Fig. 4).

Quando analisados tempos mais longos de recuperação, a presença de células MN diminuiu após 4 dias de recuperação, mas ainda foi maior do que a frequência nas células controle. Já após 8 dias de recuperação a frequência de células MN é similar à encontrada nas células controle (Fig. 4).

Figura 4: **Porcentagens de células HK2 micronucleadas controle e tratadas com crisotila.** Células HK2 tratadas com 125 µg/mL de crisotila por 48 h e recuperadas por 48 h apresentaram porcentagem de células MN aumentada em relação ao controle. Quando analisados tempos maiores de recuperação, a porcentagem de células MN diminuiu e ficou similar à porcentagem encontrada na situação controle.

2.3.5 Presença de Crisotila em Células HK2 Após Longos Períodos de Recuperação

Células HK2 controle e tratadas com crisotila foram submetidas a imunofluorescência para visualização dos microtúbulos e cromatina, e as fibras de crisotila puderam ser observadas pela sua autofluorescência ao microscópio confocal.

A cultura de células HK2 é formada predominantemente por células mononucleadas, e as figuras de mitose encontradas são bipolares, sendo que as citocineses normalmente resultam em duas células filhas (Fig. 5, A e B).

O tratamento com crisotila por 48 horas seguidas de 48 horas de recuperação levou à formação de muitas células bi e multinucleadas, figuras de mitoses multipolares, citocineses resultando em mais de duas células filhas (Fig. 5, C e D), e muitas fibras longas e pequenos fragmentos de fibra foram observados na cultura (Fig. 6). Já após 4 dias de recuperação a cultura voltou a apresentar predomínio de células mononucleadas, mas células bi e multinucleadas ainda foram identificadas (Fig. 5, E e F). Fibras longas de crisotila foram raramente observadas, e as fibras encontradas estavam normalmente na forma de pequenos fragmentos dentro das células (Fig. 7). Após 8 dias de recuperação a cultura estava forma muito similar à situação controle: predomínio de células mononucleadas e figuras de mitoses bipolares (Fig. 5, G). Não se observaram fibras longas de crisotila, mas apenas pequenos fragmentos dentro de poucas células (Fig. 8).

Figura 5. Imagens de células HK2 controle e tratadas com crisotila. Células HK2 foram observadas ao microscópio confocal de varredura a laser após imunofluorescência para visualização dos microtúbulos (verde) e da cromatina (vermelho). **A e B)** Cultura controle, formada basicamente de células mononucleadas. Metáfases se apresentaram de forma bipolar, e as citocineses resultaram em duas células filhas. **C e D)** Após 48 h de tratamento com crisotila seguido de 48 h de recuperação, foram observadas muitas células bi e multinucleadas, mitoses multipolares e citocineses resultando em três células filhas; **E e F)** Após 48 h de tratamento de 4 dias de recuperação, a cultura ainda apresentava células bi e multinucleadas, e divisões mitóticas normais e anormais (multipolares resultando em mais de duas células filhas; **G)** Após 8 dias de recuperação a cultura era similar à controle, formada basicamente por células mononucleadas e divisões bipolares.

Figura 6. **Presença de fibras de crisotila em cultura de células HK2 após 48 h de exposição e 48 h de recuperação.** Células HK2 foram tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas por 48 h, e submetidas à imunofluorescência para visualização dos microtúbulos (verde) e cromatina (vermelho). As células foram observadas ao microscópio confocal de varredura a laser, e as fibras foram observadas por sua autofluorescência (azul). **A e B)** Fibras longas de crisotila e também pequenos fragmentos foram observados dentro de muitas células, e citocineses dando origem a mais que duas células filhas foram muito frequentes (setas em A e B'); **C)** Mitoses anormais com fusos multipolares foram observadas, com diversos pontos de crisotila dentro das células (projeção ortogonal).

Figura 7. **Presença de fibras de crisotila em células HK2 tratadas por 48 h e recuperadas por 4 dias.** Células HK2 foram tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas por 4 dias, submetidas a imunofluorescência para visualização dos microtúbulos (verde) e cromatina (vermelho). As células foram observadas ao microscópio confocal de varredura a laser e as fibras de crisotila foram observadas pela sua autofluorescência (azul). A e B) Fibras de crisotila foram observadas dentro de células, porém apenas como fragmentos médios e pequenos principalmente na região perinuclear das células.

Figura 8. **Presença de fibras de crisotila em células HK2 tratadas por 48h e recuperadas por 8 dias.** Células HK2 foram tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas por 8 dias, submetidas à imunofluorescência para visualização dos microtúbulos (verde, em A) e cromatina (vermelho, em A e A'). As células foram observadas ao microscópio confocal de varredura a laser e as fibras de crisotila foram observadas pela sua autofluorescência (azul, em A'). Apenas pequenos fragmentos de fibras foram observados dentro de poucas células. Longas fibras não foram observadas.

2.3.6 Alterações Morfológicas em Culturas de Células Normais Causadas por Exposição à Crisotila

Células BRL3A e VERO foram submetidas a tratamento com 125 µg/mL de crisotila por 48 horas seguidas de 48 horas de recuperação, e submetidas a imunofluorescência para visualização dos microtúbulos e cromatina. As células foram então visualizadas ao microscópio de fluorescência para observação de possíveis alterações causadas pelo tratamento.

A linhagem BRL3A na situação controle era formada predominantemente por células mononucleadas e as divisões mitóticas observadas todas bipolares. As citocineses encontradas também sempre davam origem a duas células filhas (Fig. 9, A e B). Após o tratamento com crisotila e 48 horas de recuperação, algumas alterações foram percebidas, como a formação de células bi e multinucleadas, e também a presença de micronúcleos (Fig. 9, C e D). Ainda foram observadas mitoses multipolares e citocineses resultando em três células filhas (Fig. 10).

A linhagem VERO na situação controle era formada por células mononucleadas que apresentava divisões com fusos mitóticos bipolares e citocineses resultando em duas células filhas (Fig. 11, A e B). Quando tratadas com crisotila e recuperadas por 48 horas a cultura não apresentou grandes alterações na morfologia geral (Fig. 11, C), porém foram visualizadas células bi e multinucleadas em meio a células mononucleadas (Fig. 11, D). Também foram visualizadas algumas divisões mitóticas com fusos multipolares (Fig. 11, E).

Figura 9: **Morfologia de células BRL3A controle e tratadas com crisotila.** Células BRL3A foram submetidas à imunofluorescência com anticorpos anti β e α tubulina (verde), e os núcleos foram corados com iodeto de propídio (vermelho). **A e B)** Cultura controle, formada basicamente por células mononucleadas e divisões mitóticas com fusos bipolares; **C e D)** Cultura de células tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 h apresentaram alterações como presença de células multinucleadas e micronucleadas, e mitoses multipolares.

Figura 10: **Mitoses de células BRL3A tratadas com crisotila.** As células foram tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 h, e então submetidas à imunofluorescência com anticorpos anti β e α tubulina, e coloração dos núcleos com iodeto de propídio. Foram observadas figuras de mitoses aberrantes, como metáfases multipolares (A e C) e citocineses resultando em três células filhas.

Figura 11: **Morfologia de células VERO controle e tratadas com crisotila.** As células foram submetidas a imunofluorescência com anticorpos anti α e β tubulinas, e coloração dos núcleos com Iodeto de Propídio. **A e B)** A cultura controle é formada basicamente por células mononucleadas. **C, D e E)** Células tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 h apresentam cultura também formada por células mononucleadas (**C**), porém algumas células multinucleadas foram observadas (**D**), e também algumas mitoses multipolares (**E**).

2.4 DISCUSSÃO

Embora as fibras de crisotila sejam consideradas menos nocivas à saúde humana que os outros tipos de asbesto devido à ausência de forte associação entre desenvolvimento de carcinomas e mesoteliomas, muitos trabalhos *in vitro* vêm mostrando o potencial da crisotila em causar danos ao DNA e às células, e alguns trabalhos *in vivo* referem danos nos pulmões causados pela exposição à crisotila. O presente estudo analisou alterações em culturas de células HK2 causadas pela exposição à crisotila seguida de longos períodos de recuperação de até 8 dias. Os experimentos permitiram identificar a formação de células aneuploides, alterações no ciclo celular e o potencial mutagênico da fibra. A morfologia celular também foi analisada por microscopia confocal de varredura a laser, assim como a presença de fibras de crisotila na cultura durante os períodos de recuperação para que as alterações pudessem ser associadas à presença de fibras naquele período. Foram feitos também experimentos com células normais, para que pudessem ser identificadas algumas alterações causadas por crisotila nestas células e assim compará-las a células tumorais.

Fibras de crisotila permaneceram na cultura de células HK2 durante o tratamento e após 48 horas, 4 dias e 8 dias de recuperação. Porém a presença de fibras diminuiu durante o período de recuperação, e após 8 dias de recuperação foram encontrados apenas alguns pequenos fragmentos de fibra. Isso indica que as alterações que as células apresentaram após 8 dias de recuperação provavelmente foram decorrentes de alterações causadas pelas fibras durante o tratamento e primeiros dias de recuperação, e se mantiveram na cultura.

A presença de células aneuploides é uma consequência ao tratamento com crisotila observada após 48 horas de exposição e até após 72 horas de recuperação (DOPP *et al.*, 1997; CORTEZ & MACHADO-SANTELLI, 2008). As células aneuploides poderiam estar

relacionadas ao desenvolvimento de tumores, uma vez que a perda ou ganho de cromossomos, ou parte deles, pode introduzir mutações requeridas à transformação maligna. No presente estudo mostramos que a indução de células aneuploides pelo tratamento com crisotila depende da concentração de fibra utilizada e que a porcentagem de células aneuploides na cultura é mantida mesmo após 8 dias de recuperação em meio livre de fibras. A frequência destas células pode ser mantida na cultura se as células aneuploides forem capazes de entrar no ciclo e terminá-lo, formando novas células aneuploides da mesma maneira que células diploides se proliferam na cultura, ou se as fibras de crisotila persistirem na cultura induzindo à formação de novas células aneuploides. Como foram observados poucos fragmentos de fibras após 4 dias e principalmente após 8 dias de recuperação, novas células aneuploides poderiam ocorrer, mas não na mesma frequência que nas primeiras horas de recuperação, o que deveria ocasionar a diminuição da frequência de células aneuploides. Então, para que a frequência de células aneuploides se mantenha na cultura, algumas delas devem entrar e terminar o ciclo celular, gerando novas células aneuploides, que podem ser viáveis ou não.

Dados de microscopia confocal demonstram que após tratamento com crisotila a população de células HK2 apresenta alta frequência de células bi e multinucleadas. Porém foi observado que após longos períodos de recuperação a população volta a ser formada predominantemente por células mononucleadas, como na situação controle. Dados da quantificação de DNA mostram que após longos períodos de recuperação a população aneuploide é formada basicamente por núcleos de células mononucleadas. Provavelmente, algumas células multinucleadas aneuploides devem dar origem a células mononucleadas aneuploides, e isto pode ocorrer se as células multinucleadas forem capazes de entrar no ciclo celular durante o período de recuperação em meio livre de fibras e após a divisão formar células mononucleadas. Dados de incorporação de BrdU mostram que células

multinucleadas podem entrar na fase S do ciclo celular, indicando que é possível que as células multinucleadas entrem no ciclo celular (NAKAGAWA, 2006).

Outra possibilidade para a redução do número de células multinucleadas após os períodos de recuperação seria a incapacidade de algumas delas progredirem no ciclo celular devido às alterações adquiridas, e estas células seriam bloqueadas no ciclo sem completar a citocinese e encaminhadas para a apoptose (FUKASAWA, 2005). Já células mononucleadas aneuploides podem ser mais hábeis para entrar e finalizar o ciclo celular, gerando células também mononucleadas, que podem ainda contribuir para que a população de células aneuploides mononucleadas cresça quando analisados longos períodos de recuperação, além de contribuir na manutenção da população total de células aneuploides.

Analisando a presença de células aneuploides (hipertetraploides) por citometria de fluxo, foi verificada uma porcentagem mais alta desta classe de células quando comparada à porcentagem de núcleos aneuploides em células tratadas com a mesma concentração de crisotila vistos por análise de imagem (8,33% e 4,5%, respectivamente, após 48 horas de recuperação). Esta diferença pode ocorrer devido à passagem de células bi e multinucleadas no capilar que, ao serem analisadas, apresentam conteúdo de DNA hipertetraploide, já que foi considerada a somatória do conteúdo de todos os núcleos da célula. Já os experimentos de quantificação de DNA foram feitos selecionando-se núcleos isoladamente, e uma célula multinucleada pode ser formada por diferentes núcleos com conteúdo menor que 5C, porém juntos somam mais que 5C. Quando analisadas as porcentagens de células hipertetraploides após 4 dias e 8 dias de recuperação por citometria de fluxo, foi verificada uma pequena diminuição nesta porcentagem (7,57% e 6,12%, respectivamente), que deve ocorrer devido à redução de células bi e multinucleadas após estes períodos de recuperação.

Ainda pela análise por citometria de fluxo, o tratamento com crisotila levou a um aumento na porcentagem de células em fase G0/G1, mas não causou alterações na porcentagem de células em fase S, indicando que as células tratadas devem entrar na fase de replicação na mesma frequência que as células controle. Experimentos de incorporação de BrdU também demonstraram que a exposição à crisotila não tem efeitos proliferativos ou antiproliferativos sob as células HK2, concordando com os dados de citometria de fluxo.

Experimentos *in vivo* indicam que a exposição à crisotila está relacionada a efeitos proliferativos em células do epitélio pulmonar e na população de células mesenquimais (BRODY *et al.*, 1989; QUILAN *et al.*, 1995; BRODY *et al.*, 1997). Esta proliferação parece ser uma resposta a danos aos tecidos pulmonares causados pelas fibras, já que seria necessário reparar o epitélio e a matriz extracelular após as injúrias que chegam a persistir por até seis meses após três dias de exposição. Contudo no presente estudo *in vitro* não foram observados efeitos proliferativos após a exposição à crisotila, e isto deve ocorrer porque o efeito proliferativo após tratamento com crisotila envolve a interação de diferentes tipos celulares presentes no pulmão e da matriz extra celular, e ainda da produção de diversos fatores de crescimento que irão regular a proliferação das células próximas à região que sofreu alguma injúria. A maior parte destas condições não está presente em estudos *in vitro*, assim a sinalização que leva à proliferação nos estudos *in vivo* não ocorre nos estudos *in vitro*.

Células HK2 tratadas com crisotila quando analisadas por citometria de fluxo também apresentaram um aumento da frequência de células em G2/M, principalmente quando examinados tempos longos de recuperação. Este aumento pode refletir uma retenção das células em G2 devido a problemas na replicação que podem ser detectados pelo ponto de checagem de G2/M, ou uma retenção das células na fase M devido a

dificuldades no alinhamento dos cromossomos na placa metafásica ou problemas na ligação dos microtúbulos e cinetócoros. Quando analisados os índices mitóticos de células HK2 tratadas com crisotila, não se achou diferença no número total de células em fase M na cultura controle e na cultura tratada. Dessa forma, o aumento de células em G2/M observado por citometria de fluxo poderia ser devido à retenção em G2. Esta retenção poderia ocorrer devido a danos ao DNA causados pelas fibras, que já foram descritos (OKAYASU *et al.*, 1999).

O número total de células em fase M identificadas pelo índice mitótico foi semelhante entre a cultura controle e a tratada, porém foram notadas alterações em relação ao número de células em fases iniciais (metáfase) e tardias (anáfase e telófase) da fase M. Após o tratamento com crisotila o número de células em metáfase aumentou em relação ao controle, indicando que em células tratadas a metáfase pode durar mais tempo que o normal. Também podem ter sido verificadas menos células em fases finais da mitose devido à regressão da citocinese, ou até mesmo a morte celular devido à presença de múltiplos pólos dos fusos ou incapacidade de alinhar os cromossomos corretamente (DOXSEY *et al.*, 2005).

O aumento de células em metáfase também pode ser uma consequência de problemas no alinhamento dos cromossomos durante a metáfase, e devido a problemas no posicionamento dos pólos dos fusos, que podem fazer com que o ponto de checagem do fuso mitótico fique ativado.

Alguns autores demonstraram que células com maquinaria do ponto de checagem fraca, devido à ausência ou baixa expressão de algum componente, podem progredir para a anáfase mesmo com um ou poucos cromossomos não ligados aos microtúbulos. Estas células podem ficar retidas na fase M do ciclo celular, mas são capazes de terminar a citocinese e gerar células filhas geralmente aneuploides (LIU *et al.*, 2003; KAPLAN *et al.*,

2001; WEAVER & CLEVELAND, 2007). Estas células que possuem níveis diminuídos de uma ou mais proteínas relacionadas ao ponto de checagem mitótico parecem necessitar mais que um ou dois cinetócoros livres de microtúbulos para inibir o progresso para a anáfase. Este “ponto de checagem fraco” pode então gerar instabilidade cromossômica, uma vez que permite que células passem para a anáfase e completem a divisão mesmo com cromossomos soltos, fazendo com que células aneuploides sejam geradas (WEAVER & CLEVELAND, 2007).

Células HK2 usadas neste estudo podem apresentar ausência ou baixos níveis de expressão de proteínas relacionadas aos pontos de checagem, já que são tumorais e provavelmente apresentam mutações que permitem que a célula inicie e termine o ciclo celular mesmo com danos ao DNA ou mitoses aberrantes.

O efeito mutagênico das fibras de crisotila foi detectado pela contagem de micronúcleos e foi observado que o tratamento com crisotila leva a formação de micronúcleos, como já demonstrado por outros estudos (DOPP *et al.*, 1997). Entretanto, após 8 dias de recuperação em meio livre de fibras a porcentagem de células micronucleadas diminuiu e se manteve similar à situação controle. Estes resultados indicam que o potencial da crisotila em causar danos ao DNA, como quebras da dupla fita e erros durante a mitose que levam à formação de micronúcleos, não persiste após longos períodos de recuperação.

Como a presença de células aneuploides ocorreu durante todo o período de recuperação e a de micronúcleos não, percebemos que a formação de micronúcleos pode participar do processo de formação de células aneuploides, porém parece não auxiliar da manutenção da população aneuploide na cultura.

Os experimentos realizados com linhagens celulares normais mostraram que estas também respondem ao tratamento com crisotila com a formação de micronúcleos, células

multinucleadas e mitoses multipolares, contudo estas alterações não foram encontradas na cultura de forma tão freqüente como observado na cultura de células tumorais HK2. Como também não foram observadas figuras de apoptose, podemos esperar que as células normais possuam outras vias que são ativadas após a exposição à crisotila e que fazem com que os danos causados sejam reparados ou que ocorra bloqueio em alguma fase do ciclo celular.

2.5 CONSIDERAÇÕES GERAIS E CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra que células HK2 expostas à crisotila por 48 h e recuperadas em meio livre de fibras por 48 h apresentam algumas alterações em comparação às células controle: formação de células aneuploides, diminuição da frequência de células em G1 a aumento da frequência de células em G2/M, formação de micronúcleos e aumento da frequência de células em fases iniciais da fase M da divisão celular. Estas alterações, com exceção da formação de micronúcleos, são mantidas na cultura até mesmo após 4 dias e 8 dias de recuperação, quando apenas pequenos fragmentos de fibras são vistos na cultura.

Durante a exposição à crisotila e primeiras 48 horas de recuperação as fibras de crisotila podem causar danos ao DNA e às células, levando à formação de MN e alterações na mitose que podem formar células com mais de um núcleo e aneuploides. Algumas destas células aneuploides podem conseguir entrar e terminar o ciclo celular, provavelmente levando mais tempo para alinhar seus cromossomos na placa metafásica, e, ao terminar a citocinese, formar células aneuploides, viáveis ou não. Células aneuploides

viáveis podem persistir na cultura, mantendo a população aneuploide mesmo na ausência de fibras de crisotila.

Dessa forma, concluímos que:

- a exposição de células HK2 a crisotila causa alterações no ciclo celular, sendo estas o aumento da frequência de células em G2/M e a formação de células aneuploides. Estas alterações permanecem na cultura após longos períodos de recuperação, enquanto o potencial genotóxico persiste apenas nos períodos curtos de recuperação.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEVRESSE, V.; RENIER A.; FLEURY-FEITH, J.; LEVY, F.; MORITZ, S.; VIVO, C., JAURAND, M. C. Analysis of Cell Cycle Disruptions in Cultures of Rat Pleural Mesothelial Cells Exposed to Asbestos Fibers. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 17:660–671, 1997.

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

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

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

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

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

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

Capítulo III

Tubulinas Fusionadas a Proteínas Fluorescentes e Microscopia em Tempo Real: Estudo dos Efeitos da Crisotila na Divisão Mitótica

ABSTRACT

Cells exposed to asbestos fibers for 4 to 72 h show several alterations, such as cytoplasmatic vacuoles, bi and multinucleated cells, micronucleus and multipolar mitosis. The cell-fiber interaction observed by high-resolution time-lapse microscopy evidenced many internalized fibers, and these fibers can interfere on cell division and lead to cytokines failure. The cytokinesis failure is a process that lead to tetraploid cells with duplicated centrosomes formation, and recent studies are demonstrating others mechanisms that cause centrosome duplication and amplification. DNA damage caused by irradiation or defects on the replication and repair machinery leads to centrosome amplification, and then to mitoses with multipolar spindles. Aberrant mitosis are related to aneuploid cell formation once multipolar spindles lead to chromosome segregation errors and cell divisions resulting in more than 2 cells. In the present study, DNA vectors for the expression of tubulins fused to fluorescent proteins were constructed, and the conditions for cells transfection and image acquisition for time-lapse microscopy were established. The transfection of HK2 cells with the plasmid EGFP- γ tubulin generated heterogeneous cells population when considered the presence and number of centrosomes. However, the transfection with GFP- α tubulin e RFP- α tubulin plasmids generated cells with the microtubules dynamic and distribution very similar to control cells, and permitted the visualization of microtubules during interphase and mitotic live cells. The fate of some multipolar metaphases was observed: cell retention on metaphase, cell cycle progression generating two or three daughter cells, cell fusion during cytokinesis or during telophase after a multipolar anaphase, and cell death. The centrosome amplification was not observed during the M phase of cell cycle, and may occur in interphase, and also despite cell fusion.

RESUMO

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

consequência de amplificação inicialmente em células interfásicas, ou devido à fusão de células.

3.1 INTRODUÇÃO

As fibras de amianto já foram associadas a diversas alterações celulares, atribuídas tanto à ação indireta da fibra via produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, quanto à ação direta da fibra pela interferência física com componentes celulares (WALKER *et al.*, 1992).

Células expostas ao asbesto de 4 horas a 72 horas apresentam alterações já investigadas desde a década de 1970. Macrófagos expostos à amosita e à crisotila por 72 horas apresentaram vacúolos citoplasmáticos e diversas fibras internalizadas (BEY & HARINGTON, 1971). Já a presença de células bi e multinucleadas são amplamente observadas em células em cultura tratadas com os diferentes tipos de amianto (HESTERBERG & BARRET, 1985; LEVRESSE *et al.*, 1997; JESEN *et al.*, 1996; PELIN *et al.*, 1995).

JESEN & WATSON (1999) analisaram a interação de fibras de amianto, como crocidolita e crisotila, e células em cultura por *time-lapse* de grande resolução, adquirindo imagens de contraste de fase por até 30 horas. Foi possível notar que as fibras dentro das células se localizam preferencialmente na região perinuclear durante a interfase, e durante a mitose, com a desintegração do envoltório nuclear, as fibras podem interagir com os cromossomos e fusos mitóticos. Foram observadas fibras entre os lotes de cromossomos durante a anáfase, que podem se localizar na ponte intercelular durante a citocinese. Em alguns casos, após até 25 horas do início do processo de citocinese, as células filhas se aproximaram e ocorreu a falha na citocinese, com a formação de apenas uma célula filha com mais de um núcleo. Neste estudo o tamanho

da fibra internalizada e a interferência física da fibra com a célula foram admitidos como fatores cruciais para a falha na citocinese.

Outras abordagens já foram exploradas para elucidar o mecanismo de interferência da fibra no processo de divisão celular. O trabalho de MACCORKLE e colaboradores (2006) mostrou que certas proteínas intracelulares se ligam às fibras de amianto quando internalizadas. Entre as proteínas identificadas estão as relacionadas ao citoesqueleto, como β -tubulina, vimentina, lamina A/C e actina. Outras proteínas identificadas vinculam-se aos cinetócoros, como INCENP e CENP-B, e a proteína nucleophosmina 23 que está relacionada ao ciclo centrossômico. Assim, estas proteínas ligadas às fibras de asbesto deixariam de exercer suas funções celulares, ocasionando alterações no citoesqueleto.

Fusos multipolares durante a metáfase, por causa da presença de múltiplos centrossomos, são observados em células tratadas com crisotila, além de citocineses resultando em mais de duas células filhas. Também ocorrem fibras localizadas na ponte intercelular, entre as duas células filhas, mas aparentemente com microtúbulos organizados formando o corpo intermediário (CORTEZ & MACHADO-SANTELLI, 2008).

A presença de amplificação centrossômica pode ser uma consequência da falha na citocinese, já que os centrossomos são duplicados na fase S do ciclo celular juntamente com a replicação do DNA, e ao ocorrer a falha na citocinese é formada uma célula com dois centrossomos e conteúdo de DNA duplicado (FUKASAWA, 2005). Porém em alguns casos após o tratamento com crisotila o número de centrossomos observado é muito elevado (MACCORKLE *et al.*, 2006; CORTEZ & MACHADO-SANTELLI, 2008), assim outros mecanismos além da falha na citocinese podem estar envolvidos na amplificação centrossômica.

A amplificação centrossômica já foi descrita por ocorrer devido a mutações em genes de reparo de DNA e de pontos de checagem (FUKASAWA *et al.*, 1996; DODSON *et al.*, 2004), expressão de telomerasas mutadas (GUIDUCCI *et al.*, 2001), e devido a danos ao DNA causados por radiação ou por erros na replicação (MERALDI *et al.*, 2002; DODSON *et al.*, 2007; AMÉ *et al.*, 2009). Estes dados apontam para uma possível atuação da amplificação centrossômica na morte celular, chamada de catástrofe mitótica. Segundo esta hipótese, após o material genético celular sofrer danos irreversíveis ocorreria a amplificação centrossômica durante a fase G2, ou até durante a própria fase M, e na presença de um número elevado de centrossomos a célula seria encaminhada à morte celular (DOSXEY *et al.*, 2005). A amplificação dos centrossomos neste caso parece ocorrer a partir da fragmentação ou separação dos centríolos dos centrossomos iniciais (HUT *et al.*, 2003; FORGUES *et al.*, 2003; SALADINO *et al.*, 2009).

A amplificação centrossômica é vista classicamente como fator indutor de aneuploidia, desde as observações de mitoses aberrantes em tumores feitas por Boveri no início do século passado, já que a presença de mais de dois centrossomos leva à formação de fusos multipolares e erros na segregação cromossômica.

Células com mais de dois centrossomos durante a mitose podem organizar os fusos de forma bipolar, agregando os centrossomos em dois pólos da célula e construindo os chamados fusos “pseudobipolares”, ou de forma multipolar, quando os centrossomos se localizam em distintos pontos a partir dos quais se formam os fusos. Fusos “pseudobipolares” podem se dividir normalmente, gerando duas células filhas com conteúdo de DNA normal ou aneuploide, dependendo de como os microtúbulos estavam organizados no momento da ligação dos microtúbulos aos cinetócoros (GANEM *et al.*, 2009). Já mitoses multipolares podem se dividir em até três células filhas, sendo ao menos duas certamente aneuploides, ou podem não se dividir devido à presença de

um número muito elevado de pólos dos fusos, provocando a regressão da mitose e formação de uma célula multinucleada ou com um núcleo grande tetraploide. Outra possibilidade para as células multipolares seria o encaminhamento para a morte celular programada (FUKASAWA *et al.*, 1996; FUKASAWA, 2005).

Existem evidências de que atrasos severos durante a mitose, normalmente resultantes de danos ao DNA e ativação do ponto de checagem, podem causar a quebra dos centrossomos (KERYER, 1984; GALLANT & NIGG 1992; HINCHCLIFFE *et al.*, 1998), mas fica difícil de saber se danos ao DNA levam a atrasos mitóticos e assim a quebra dos centrossomos, ou se simplesmente o dano ao DNA leva à quebra dos centrossomos. Neste caso a análise em tempo real das células pode ser um grande aliado, já que o uso de proteínas fusionadas a GFP (*green fluorescent protein*) possibilitou o estudo da dinâmica dos componentes do citoesqueleto (CHALFIE *et al.*, 1994).

Estudos mostram que células que expressam α -tubulinas fusionadas a GFP mantêm a dinâmica dos microtúbulos de forma muito semelhante a células controle, sendo então uma forma de análise do citoesqueleto simples e confiável que pode auxiliar o entendimento de processos que envolvem elementos do citoesqueleto (STRAIGHT *et al.*, 1997; RUSAN *et al.*, 2001). Também a utilização de γ -tubulina/GFP e a análise em tempo real forneceram informações importantes sobre o funcionamento dos centrossomos, como presença de dois focos muito próximos de γ -tubulina em cada um dos centrossomos e quantidade de γ -tubulina nos centrossomos durante a mitose (KHODJAKOV & RIEDER, 1999).

O presente estudo teve como objetivo a observação de células em cultura tratadas com crisotila por microscopia em tempo real, focando a formação e destinos de mitoses multipolares. Para tanto foram construídos vetores de DNA codificantes para

tubulinas fusionadas à proteínas fluorescentes e padronizadas as condições para a observação das células vivas.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Cultura Celular

Foi utilizada linhagem celular HK2, proveniente de carcinoma de células não pequenas de pulmão, estabelecida em nosso laboratório (BONALDO *et al.*, 1991). As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com nutriente F-12 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As culturas foram mantidas em estufa a 37⁰C, com alta umidade relativa (maior que 90%) e em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias e as células foram subcultivadas regularmente. As subculturas foram obtidas por dissociação com solução de tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02%.

Nesta parte do estudo também foram realizados experimentos com células Hela (provenientes de carcinoma de colo de útero), mantidas nas mesmas condições das células HK2.

Os estoques celulares de cada linhagem foram congelados em meio de cultura com 10% de soro fetal bovino e 10% de crioprotetor (Dimetilsulfóxido – DMSO), acondicionados em ampolas, mantidos em nitrogênio líquido.

3.2.2 Construção dos Vetores de DNA

Para a realização deste estudo dois vetores foram construídos: RFP α tub (que contém a sequência do gene da α -tubulina fusionada à sequência da proteína fluorescente vermelha) e γ tubEGFP (que contém a sequência do gene da γ -tubulina

fusionada à sequência codificante da proteína fluorescente verde). Estes vetores foram construídos a partir dos plasmídios comerciais DsRed-monomer C1 e pEGFP-N1 (ambos Clontech), bem como do vetor γ TGFP (vetor que contem a sequência do gene da γ -tubulina fusionada à GFP), construído por KHODJAKOV & RIEDER (1999) e gentilmente enviado ao nosso laboratório por Khodjakov em 2007.

Para a obtenção da sequência da α -tubulina humana, RNA total de cultura de células foi extraído com utilização do *kit Charge Switch RNA* (Invitrogen). O RNA obtido foi submetido à transcrição reversa seguida de reação de PCR para amplificar a sequência com *primers* específicos, com o uso do *kit Super Script III* (Invitrogen). Os *primers* foram desenhados a partir da sequência α -tubulina (TUB1A, número de acesso GeneBank NM_006009) com o auxílio do programa *Primer 3* disponível na rede.

As enzimas de restrição HindIII, NotI, BamHI (Invitrogen) foram utilizadas com tampão adequado, segundo o fabricante. A observação dos produtos de digestões e de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose (0,8%), sendo que o DNA presente nas bandas foi purificado com o auxílio do *kit Illustra DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) quando necessário. É válido lembrar que para a verificação das bandas no gel as mesmas são comparadas com as bandas do peso molecular *1kb Plus Ladder* (Invitrogen).

As transformações foram feitas por choque térmico em bactérias competentes *E. Coli* DH5 α ou DH10B, que depois foram plaqueadas e mantidas em estufa a 37°C. A extração do DNA plasmidial das colônias foi feita por MiniPrep ou MidiPrep (*Plasmid Mid Kit*, Qiagen), quando necessária grande quantidade de DNA. A quantificação do DNA resultante e seu grau de pureza foram obtidos com o uso do espectrofotômetro ND1000 (NanoDrop).

3.2.3 Transfecção Celular

Para a transfecção celular dois métodos foram utilizados: mediada por lipossomos (Lipofectamine 2000, Invitrogen e GeneJuice, Novagen) e eletroporação, com uso do aparelho Electro Cell Manipulation ECM 630 (BTX Harvard Apparatus).

Alguns protocolos foram testados:

- Para Lipofectamine 2000: em um tubo de Eppendorf foram acrescentados 250 µl de meio de cultura OptiMEM sem soro e 4-5 µl de Lipofectamine, em outro tubo foram colocados 250 µl de meio de cultura OptiMEM sem soro e 2-3 µg de DNA. Após 5 minutos os conteúdos dos dois foram misturados por 20-30 minutos. Ao final deste período a placa de Petri de 35 mm com as células foi lavada com meio OptiMEM sem soro e a mistura de DNA- Lipofectamine foi acrescentada à cultura juntamente com 1,5 mL de meio OptiMEM sem soro. Após 2-4 horas o meio de cultura da placa foi trocado por meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino.

- Para GeneJuice: em um tubo de Eppendorf foram colocados 100 µl de meio de cultura OptiMEM sem soro e 3-4 µl de GeneJuice, e após 5 minutos foram acrescentados 2-3 µg de DNA. Após 15-25 minutos, a placa de Petri de 35 mm com as células teve seu meio de cultura removido, e a mistura de GeneJuice e DNA foi transferida para a placa, juntamente com 900 µl de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 4-6 horas foi acrescentado mais 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB.

- Para eletroporação: as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 10 minutos a 800 rpm e ressuspensas em 1 mL de tampão apropriado para eletroporação (*Hypo-osmolar buffer*, Eppendorf) acrescido de 4 µg de plasmídeo. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação, que foi realizada com 240 V e 700 µF, em eletroporador Electro Cell Manipulation ECM 630 (BTX Harvard Apparatus). As

células foram então transferidas para frascos de cultura onde foram mantidas em estufa por 48 horas, quando foram ser tripsinizadas e transferidas para placas apropriadas para observação ao microscópio.

Em alguns experimentos as células após a transfecção foram selecionadas com o uso do antibiótico Geneticina 0,5 mg/ml (G418, Invitrogen) de 4 a 7 dias.

3.2.4 Tratamento com crisotila

Após 24 horas da transfecção ou do momento em que as células foram transferidas para as placas apropriadas para *time-lapse*, o meio de cultura das placas de Petri foi removido e uma mistura de meio de cultura e fibras de crisotila em concentração aproximada de 125 µg/mL foi acrescentada. As fibras permaneceram em contato com as células por 24 ou 48 horas, quando foram observadas ao microscópio ou fixadas para imunofluorescência.

3.2.5 Videomicroscopia (*time-lapse*)

As células vivas foram observadas ao microscópio de fluorescência X81 da Olympus, com sistema de iluminação MT20, objetiva de imersão em óleo 100X, platina motorizada para determinação dos planos em Z e software CellR para controle do equipamento. Este microscópio foi utilizado em dois momentos: em nosso laboratório durante um período de demonstração do equipamento, e no Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, em Córdoba, Argentina.

Nos experimentos realizados no Brasil as células foram mantidas a 37⁰C com o uso de uma incubadora (Olympus), que mantém a temperatura da platina onde a placa de Petri de 35 mm com as células fica apoiada, objetiva, o topo da incubadora e também um banho de água ao redor da placa. As placas de Petri utilizadas nos experimentos com

esta incubadora deveriam ter o fundo de vidro, e não de plástico, para que as células pudessem ser focadas com a objetiva de 100X. Foram utilizadas placas de Petri comerciais com fundo de vidro (WillCo Wells BV e MatTek Corporation) e também placas feitas em nosso laboratório. As placas foram feitas a partir de placas de Petri de 35 mm de plástico, que tiveram parte do seu fundo removido e foram limpas com álcool 70%. Lamínulas de vidro quadradas de 22 mm foram lavadas com HCl 5N, secas e coladas ao fundo da placa, pelo lado externo, com uso de uma mistura de parafina e vaselina líquida (3:1) aquecida a 60°C. Depois de frias as placas foram colocadas na luz UV por 20 minutos e puderam receber as células. O meio utilizado no momento dos experimentos foi DMEM suplementado com 10% SFB, porém feito sem adição de bicarbonato de sódio para que o pH do meio, na ausência de CO₂, fosse mantido ao redor de 7,5 por mais tempo.

Já nos experimentos realizados na Argentina foi utilizada uma platina mantida a 37°C (Harvard Controller Apparatus) para manter a temperatura das células durante o experimento. A platina possui um encaixe para uma cápsula com bordas de metal, de 35 mm de diâmetro, que foi montada com lamínulas de vidro redondas de 25 mm. As células que foram utilizadas nos experimentos estavam aderidas a uma lamínula de vidro, mantida dentro de uma placa de Petri de 35 mm quando em cultura. No momento do experimento, o vidro foi removido da placa e colocado como fundo da cápsula de metal juntamente com 2 mL de meio de cultura. Outra lamínula de vidro foi colocada no topo da cápsula, que foi fechada e mantida assim, apenas com as células e meio de cultura durante todo o período de aquisição de imagens. O meio de cultura utilizado nestes experimentos foi um meio chamado de meio de registro, feito com 5 mL de solução de Hank's 10X (Gibco), 0,2383 g de Hepes (Gibco) 20 mM, 0,225 g de Glucose, 0,5 mL de Glutamax 2 mM e 0,5 mL de soro fetal bovino, completado com

água MiliQ autoclavada até 50mL. O pH do meio deve estar em 7,3 no momento do experimento.

O *software* utilizado (CellR, Olympus) permitiu que ao iniciar um experimento fossem selecionados: 1) o campo da imagem que se deseja observar, 2) intensidade da luz, 3) os filtros que serão utilizados, 4) o tempo de exposição para cada imagem, 5) o intervalo no eixo Z que deve ser percorrido, 6) quantas imagens dentro do intervalo escolhido devem ser adquiridas, e 7) intervalo de tempo entre cada aquisição de imagens. Para cada experimento estes parâmetros foram adequados, já que deveriam ser ajustados de acordo com a intensidade de fluorescência da célula a ser observada e de acordo com o processo celular a ser analisado e sua duração.

Para cada experimento foi gerado então um conjunto de imagens dos distintos planos (*Z layers*) de cada tempo. Pelo próprio *software* foi feita a projeção de máxima intensidade para cada tempo, e assim para cada tempo havia apenas uma imagem correspondente. Com estas imagens foram feitos vídeos com o uso do programa *Windows Movie Maker*. Pranchas com as imagens também foram feitas com o auxílio do programa *Adobe Photoshop*.

3.2.6 Imunofluorescência

Para imunofluorescência as células foram subcultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm e fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos e após 3 lavagens com PBSA foram tratadas com Triton X-100 0,5% durante 15 minutos. As placas foram lavadas novamente e 5 µl do anticorpo anti- α e 5 µl de anti- β tubulina (1:250, Sigma) foram colocados sobre cada lamínula e deixados em contato com as células *over night* em câmara úmida. As placas foram lavadas 3 vezes com PBSA, e 7 µl do anticorpo anti-mouse FITC (1:200, Sigma) foram colocados sobre a lamínula por 2

horas, sendo o material foi mantido em câmara úmida e escura nesse período. Após as placas foram lavadas 3 vezes com PBSA e as lamínulas montadas em lâminas com 4 µl de iodeto de propídio para a coloração dos núcleos e 10 µl de *anti-fading*.

3. 3 RESULTADOS

3.3.1 Construção dos vetores

- **RFPatub (DsRed α -tubulina)**: A estratégia adotada para a construção deste vetor foi obter a sequência do gene da α -tubulina humana a partir de RNA total de células em cultura, utilizando reação de transcrição reversa para a obtenção do cDNA e amplificação da sequência por PCR. Tanto a sequência obtida quanto o vetor DsRed-monomer C1 foram digeridos com enzimas específicas que permitiram a introdução da sequência no plasmídeo sem que o quadro de leitura fosse alterado. A partir do mapa de restrição do vetor (Fig. 1), foi possível escolher um par de enzimas de restrição (HindIII e BamHI) que pudessem ter seus sítios de restrição inseridos nos *primers* desenhados para a obtenção da sequência da α -tubulina. Os *primers* desenhados foram: TTA **A GCT TCT** ATG AGT GAT TGC ATC TCC AT; e AAA **GGA TCC** TTA GTA TTC CTC TCC TTC CTC A (em negrito os sítios de restrição de HindIII e BamHI).

Figura 1: **Esquema do vetor DsRed Monomer C1 (Clontech)**. Em destaque seu promotor, posição da sequência da proteína monomérica fluorescente vermelha, origem de replicação e conferência a antibióticos. O mapa de restrição do sítio de clonagem é fornecido em detalhe, e os sítios escolhidos para inserção da α -tubulina estão em destaque (em vermelho local de corte da enzima HindIII e em verde local de corte da enzima BamHI).

Para a obtenção da sequência do gene da α -tubulina algumas tentativas de PCR foram feitas com temperatura de anelamento de 50°C, porém, além da banda esperada da α -tubulina, algumas outras bandas foram observadas. Com a finalidade de aumentar a especificidade de anelamento dos *primers*, a temperatura foi elevada para 53°C, e o PCR resultou em apenas uma banda em aproximadamente 1,3 kb correspondente ao cDNA da α -tubulina (Fig. 2). A transcrição reversa foi feita por 60 minutos a 50°C, e o PCR foi realizado com uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento por 30 segundos a 53°C, extensão por 2 minutos a 72°C.

Figura 2: **Produto do PCR para obtenção do cDNA do gene da α -tubulina humana.** PM - Peso Molecular, 1) A banda de aproximadamente 1,3kb corresponde a banda esperada.

O produto do PCR foi então submetido à digestão com as enzimas BamHI e HindIII, assim como o plasmídeo DsRed-monomer C1. Ambos foram purificados a partir de banda do gel e verificados novamente por eletroforese em gel de agarose, e então submetidos à reação de ligação. Após transformação de bactérias e plaqueamento, algumas colônias tiveram seu DNA plasmidial extraído, digerido e verificado. Os que apresentaram as bandas esperadas (Fig. 3) foram novamente utilizados para a transformação de bactérias e posterior produção de DNA em quantidades suficientes para realizar as transfecções.

Figura 3: **Verificação da construção do plasmídeo RFP α tub.** PM - Peso Molecular, 1) plasmídeo digerido com HindIII que apenas abre o plasmídeo, fornecendo uma banda de 6 kb, 2) digestão do plasmídeo com HindIII e BamHI, que libera a

- **γ tubEGFP (pEGFP γ -tubulina):** O vetor γ TGFP foi construído por Khodjakov e Rieder em 1999 com a introdução da sequência do gene da γ -tubulina e da sequência codificante da proteína fluorescente verde (GFP) no plasmídio pcDNA3 (Invitrogen). Esta construção foi gentilmente enviada por Khodjakov para nosso grupo de pesquisa, porém, para facilitar a visualização da γ -tubulina fusionada a GFP nas células em cultura, optamos por trocar a sequência da GFP da construção pela EGFP presente no plasmídio pEGFP-N1. Diversas estratégias para a construção deste novo vetor foram baseadas nos mapas de restrição dos plasmídios, porém apenas uma delas mantém o quadro de leitura correto para a expressão das sequências fusionadas.

Nesta estratégia o vetor pEGFP-N1 foi submetido à dupla digestão com as enzimas HindIII e NotI, e esta digestão leva a liberação da sequência codificante para o EGFP, e assim esta sequência foi purificada a partir de gel de agarose (Fig. 4).

O vetor γ TGFP também foi submetido à dupla digestão com HindIII e NotI, sendo que esta digestão leva a três produtos diferentes, já que este vetor possui dois sítios de HindIII (um no início da sequência da γ -tubulina e outro no final dela, separando as sequências da GFP e da γ -tubulina), e um sítio de NotI (logo após o término da sequência de GFP). As bandas correspondentes a vetor vazio (pcDNA3, de 5,4 kb) e a correspondente a γ -tubulina (1,5 kb) foram purificadas do gel de agarose (Fig. 4).

Figura 4: **Produtos da digestão do vetor γ TGFP e pEGFP N1 com as enzimas HindIII e NotI, após a purificação.** PM- Peso Molecular, 1) banda correspondente a sequência da γ -tubulina, liberada por dois sítios de HindIII, 2) banda correspondente ao vetor pcDNA3 vazio, 3) banda correspondente a sequência do EGFP, obtida pela digestão do pEGFP N1 POR NotI e HindIII.

Após, a sequência do EGFP e o pcDNA3 foram ligados, já que ambos possuem um sítio de HindIII e um de NotI em cada uma de suas extremidades. O produto da ligação foi digerida com HindIII, e a sequência da γ -tubulina inserida por ligação, formando o vetor γ tubEGFP.

Todavia a sequência da γ -tubulina poderia ter sido inserida de maneira correta ou invertida dentro do plasmídeo, devido a suas duas extremidades estarem clivadas com a mesma enzima de restrição (HindIII). Logo foi necessário identificar se os plasmídios continham a sequência na posição correta. Para tanto foi feito o mapa de restrição da γ -tubulina e identificados os sítios próximos das extremidades da sequência. A sequência contém apenas um sítio de restrição para BamHI na porção final da sequência (Fig. 5), e o plasmídeo ainda contém mais um sítio reconhecido por esta enzima proveniente do vetor pcDNA3, bem próximo do início da sequência da γ -tubulina. Logo a digestão com BamHI deve gerar duas bandas, e se correta a inserção da γ -tubulina as bandas devem ter aproximadamente 1,1 kb e 6,5 kb; se a inserção foi invertida as bandas geradas deveriam ser de aproximadamente 0,3 kb e 7,6 kb.

Figura 5: **Mapa de restrição da sequência da γ -tubulina humana utilizada neste estudo.** O mapa foi fornecido pelo programa pDRAW32. Alguns dos sítios de restrição presentes na sequência estão evidenciados, sendo que o sítio escolhido para confirmar a inserção da γ -tubulina foi o de BamHI (sublinhada em verde), na posição 1016.

Após transformação em bactérias, algumas colônias tiveram seu DNA plasmidial extraído e digerido, e assim foram identificados plasmídios com as bandas esperadas quando a sequência da γ -tubulina foi inserida corretamente (Fig. 6). Nova transformação foi feita e o DNA plasmidial extraído em quantidade suficiente para as transfecções.

Figura 6: **Verificação da construção γ tubEGFP.** PM- Peso Molecular, 1) γ tubEGFP digerido com BamHI, evidenciando a inserção correta da sequência da γ -tubulina, PM- Peso Molecular, 1') digestão do γ tubEGFP com HindIII e NotI, evidenciando as três bandas esperadas: pcDNA3, γ -tubulina

3.3.2 Transfecção Celular

Foram testadas as transfecções mediadas por lipossomos e por eletroporação. Para padronizar as condições iniciais de transfecção foi utilizado o vetor RFP α tub, e depois as mesmas condições foram testadas para outros vetores.

- Transfecção mediada por Lipofectamine 2000 (Invitrogen): os melhores resultados para este reagente foram conseguidos com células em placas de 35 mm de diâmetro com culturas 70-80% confluentes, com o uso de uma combinação de 5 μ l do reagente e 2 μ g de DNA plasmidial mantidos juntos por 30 minutos em 500 μ l de meio Opti-MEM sem soro fetal bovino. Após, a mistura de lipossomos e DNA plasmidial foi colocada junto à 1,5 ml de meio Opti-MEM sem soro na cultura celular por 3 horas. Após este período o meio de cultura foi trocado por 2 mL de meio DMEM 10% SFB.

Muitas células morreram nas primeiras 12 horas após o término da transfecção, e após 24 horas do início da transfecção as células foram lavadas com PBSA e o meio de cultura trocado. As células foram observadas ao microscópio de fluorescência após 48 horas do início da transfecção, e neste período cerca de 40% da cultura estava expressando a proteína de interesse, enquanto diversas figuras de divisão mitótica foram observadas, incluindo citocineses.

O uso de Geneticina foi testado nas células transfectadas com Lipofectamine, e para isto as células após 48 horas da transfecção foram dissociadas com o uso de solução de tripsina e colocadas em placas de Petri de 35 mm com meio DMEM 10% SFB com Geneticina. A Geneticina foi mantida na cultura por 4 dias, quando cerca de 50% das células morreram, e as células foram então transferidas para placas especiais de videomicroscopia. Após 24 horas as células foram observadas ao microscópio de fluorescência, e cerca de 50%-60% delas estavam transfectadas. Porém, muitas apresentavam baixa fluorescência, dificultando a utilização para *time-lapse*.

Dessa forma, na maioria dos experimentos as células transfectadas com Lipofectamine foram observadas após até 4 dias da transfecção, e não foram selecionadas com antibiótico.

- Transfecção mediada por GeneJuice: o protocolo para este reagente é semelhante ao da Lipofectamine, porém não necessita da ausência de soro fetal bovino no meio de cultura, fazendo com que as células não sofram tanto durante a transfecção. Os melhores resultados foram adquiridos com transfecção de células em placas de 35 mm de diâmetro com culturas 80-90% confluentes, com o uso de uma mistura de 4 µl de GeneJuice e 3 µg de DNA plasmidial em 100 µl de meio Opti-MEM sem soro fetal bovino. Após 20 minutos esta mistura foi acrescentada à cultura de células juntamente com 900 µl de meio DMEM suplementado com 10% SFB. Esta mistura permaneceu na cultura por 6 horas, e após 24 horas do início da transfecção as células apresentaram morfologia normal e não apresentaram mais células mortas que uma cultura controle.

As células foram observadas neste momento e cerca de 40% delas expressavam a proteína de interesse e figuras de mitose também foram observadas. Já 48 horas após o início da transfecção foram observadas mais células transfectadas em mitose, o que facilitou os experimentos de *time-lapse*.

O uso do antibiótico Geneticina para a seleção das células transfectadas com GeneJuice foi principiado após 24 horas do início da transfecção, já que este reagente não ocasionou grande estresse e morte as células. A seleção foi feita geralmente por 4 dias - neste momento as culturas apresentaram cerca de 60% das células transfectadas com bom sinal de fluorescência e diversas células em mitose.

- Eletroporação: diversas condições foram testadas para a eletroporação das células HK2, variando a voltagem de 150 V a 270 V, e de 600 a 950 μ F. Os melhores resultados foram obtidos quando utilizadas células provenientes de frasco de cultura de 25 cm² 90% confluentes, que foram dissociadas com o uso de solução de tripsina, lavadas com PBSA e transferidas para cubeta de eletroporação na presença de 0,5 ml tampão hipo-osmolar e 6 μ g de DNA plasmidial. A eletroporação foi feita utilizando-se 170 V e 750 μ F, e as células foram transferidas para a placa de Petri de 35 mm de diâmetro, onde permaneceram até que a cultura estivesse confluenta novamente. Após 7 dias em cultura as células foram observadas ao microscópio de fluorescência e apresentaram cerca de 40% de células transfectadas. Neste protocolo aproximadamente 70% das células morreram após a eletroporação e o crescimento da cultura se tornou muito lento, dificultando o trabalho com estas células.

Todos os protocolos testados foram eficientes em transfectar as células HK2, porém a transfecção mediada por lipossomos necessitou de uma quantidade menor de plasmídios, gerou culturas com maior porcentagem de células transfectadas e permitiu observação das células após 48 horas da transfecção. Desse modo, para os experimentos de *time-lapse* a transfecção foi realizada preferencialmente por lipossomos.

3.3.3 Transfecção de Células HK2 com γ -tubEGFP: Localização da Proteína Fluorescente

As células transfectadas com o vetor γ -tubEGFP apresentaram uma população heterogênea em relação à expressão da proteína de interesse. Na maior parte das células transfectadas foram verificados vários focos da tubulina fluorescente (Fig. 7), situação não correspondente à observada em células controle submetidas à imunofluorescência

com anticorpo anti- γ tubulina, que mostraram apenas um foco de γ -tubulina em células interfásicas. A cultura de células transfectadas também apresentou crescimento mais lento do que as células controle, indicando que as células podem sofrer atraso no ciclo celular ou bloqueio em alguma fase deste.

Poucas células transfectadas foram observadas com apenas um foco de proteína fluorescente próximo ao núcleo, semelhante ao encontrado em células controle. Algumas destas células estavam em fases finais da divisão celular, indicando que elas seriam capazes de progredir e concluir o ciclo celular (Fig. 7). Contudo, estas células eram poucas dentro de toda a população e isto inviabilizou a utilização deste vetor nos experimentos posteriores.

Figura 7: **Células HK2 transfectadas com plasmídio γ -tubEGFP.** A população de células transfectadas com o DNA do plasmídio γ -tubEGFP mostrou-se muito heterogênea quanto a presença de pontos de concentração da proteína de interesse, que representariam os centrosomos da célula. Foram observadas células com mais de dez focos da proteína fluorescente. Porém, algumas células apresentaram apenas um centrosomo, e estas células também foram observadas em fases finais da divisão celular, como a telófase, indicando que estas células são capazes de progredir no ciclo celular e completar a divisão.

3.3.4 Transfecção de Células HK2 com RFP α -tub e GFP α -tub: Localização da Proteína Fluorescente e Observação da Divisão Mitótica

A rede de microtúbulos observada em células transfectadas com o DNA do plasmídeo RFP α -tub é muito semelhante à rede de microtúbulos visualizada em células submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti- α tubulina (Fig. 8), demonstrando que a célula estava transcrevendo o plasmídeo e a proteína produzida pela célula estava correta e sendo utilizada como uma tubulina endógena. Porém, em algumas células a rede de microtúbulos apresentou sinal um pouco mais fraco quando comparada com as células submetidas à imunofluorescência. Este fato é normal já que os microtúbulos de células transfectadas são compostos de α e β -tubulina endógena, e α -tubulinaRFP (exógena).

A transfecção com o DNA do plasmídeo GFP- α tubulina também resultou em células com redes de microtúbulos muito semelhantes à rede de microtúbulos das células controle observadas após imunofluorescência (Fig. 8), indicando que a tubulina fusionada a GFP também se localiza na célula como uma tubulina endógena.

Células transfectadas com os vetores GFP- α tubulina e RFP- α tubulina em divisão mitótica apresentaram comportamento muito similar às células não transfectadas (Fig. 9, célula HK2 não transfectada observada por luz transmitida nas mesmas condições em que as transfectadas seriam observadas), permanecendo períodos semelhantes em cada fase do ciclo celular.

O posicionamento e organização dos microtúbulos formando o fuso mitótico também são muito semelhantes aos encontrados em células controle submetidas à imunofluorescência com anticorpos anti- α e β -tubulina. Quando observada uma célula com morfologia interfásica, porém com dois centrossomos, dentro de cerca de 60 minutos a rede de microtúbulos se desfez e os fusos mitóticos começaram a se

organizar. Após mais 50 minutos aproximadamente o fuso bipolar estava formado e a célula apresentava morfologia de uma célula metafásica (Fig. 10, filme 01).

Células encontradas em metáfase foram observadas nesta fase de 30 a 110 minutos, quando progrediram para a anáfase e após 15 minutos já se encontravam em telófase, gerando duas células filhas (Fig. 11 e 12, filmes 02 e 03). Poucos casos foram observados de células transfectadas com fusos multipolares, e nos casos observados os pólos dos fusos acabaram por se organizar em dois pólos principais, e a célula deu origem a duas células filhas (Fig. 13, filme 04).

O processo de citocinese é um processo longo, e as células filhas podem permanecer mais de 20 horas com a ponte intercelular formada até se separarem completamente. Citocineses observadas em células HK2 e Hela transfectadas apresentaram microtúbulos organizados na ponte intercelular, formando o corpo intermediário durante todo o período de observação, sendo que após 10 minutos do início da citocinese se formou uma região na ponte intercelular com menos fluorescência, indicando uma região menos densa em microtúbulos. Esta pode permanecer presente ou dar lugar a uma região central com forte sinal de fluorescência margeada por duas regiões de sinal mais fraco (Fig. 14).

Figura 8: **Rede de microtúbulos de células HK2 submetidas a imunofluorescência e transfectadas com os vetores RFPα-tubulina e GFPα-tubulina.** **A)** Rede de microtúbulos de células FHV submetidas a imunofluorescência com anticorpos anti- α e β tubulinas (vermelho) e núcleo corado por Iodeto de Propídio (verde); **B e C)** Células FHV transfectadas com plasmídio RFPα-tubulina (**B**) e GFPα-tubulina (**C**). A transfecção com os dois vetores resulta em células com rede de microtúbulos semelhante à rede das células em A.

Figura 9: **Divisão mitótica de célula HK2 controle.** A célula foi observada desde a metáfase, com os cromossomos alinhados na placa metafásica, e foram observados prolongamentos da célula presos ao substrato. Esses prolongamentos se retraíram e após 105 minutos a célula, totalmente esférica, entrou em anáfase. Em aproximadamente 10 minutos a célula estava em telófase, e após 168 minutos do início da observação as duas células filhas já apresentaram morfologia semelhante à de células interfásicas

Figura 10: **Formação de fuso bipolar em células HK2 controle.** A célula foi observada inicialmente em interfase, mas já apresentava dois pólos irradiadores de microtúbulos. Após cerca de 50 minutos de observação a rede de microtúbulos interfásica se desfez e o fuso mitótico começou a se formar. Após 110 minutos desde o início da observação o fuso bipolar estava formado e a célula estava em metáfase. Filme 01.

Figura 11: **Divisão mitótica de célula HK2 controle transfetada com plasmídio RFP α -tubulina.** A célula foi observada ao microscópio de fluorescência inicialmente em metáfase bipolar. Durante 24 minutos a célula permaneceu em metáfase, quando iniciou o processo de anáfase. Aos 40 minutos iniciou a telófase, e o processo de citocinese resultando em duas células filhas foi acompanhado até 144 minutos após o início da observação. Filme 02.

Figura 12: **Divisão mitótica de célula HK2 controle transfetada com plasmídio GFP α -tubulina.** A célula foi observada ao microscópio de fluorescência inicialmente em metáfase bipolar. Durante 12 minutos a célula permaneceu em metáfase, e iniciou o processo de anáfase aos 18 minutos. Aos 36 minutos iniciou a telófase e o processo de citocinese resultando em duas células filhas foi acompanhado até os 54 minutos, quando os microtúbulos começaram a se organizar de maneira interfásica. Filme 03.

Figura 13: **Divisão mitótica multipolar de célula HK2 transfetada com plasmídeo RFPα-tubulina.** A célula foi observada ao microscópio de fluorescência inicialmente em metáfase com três pólos no fuso. Durante 60 minutos a célula permaneceu em metáfase, mas com grande movimentação dos microtúbulos, aparentemente corrigiu o fuso para dois pólos, quando foi capaz de completar a mitose resultando em duas células filhas. Filme 04.

Figura 14: **Citocinese de célula HK2 transfetada com o plasmídio RFP α -tubulina.** A célula foi observada desde a metáfase, e após 40 minutos estava em telófase. A ponte intercelular foi formada com alta concentração de microtúbulos, caracterizando o corpo intermediário. Após cerca de 10 minutos do início da telófase a região central do corpo intermediário se tornou mais escura, com menor densidade de microtúbulos (seta). Após cerca de 100 minutos em citocinese, com a morfologia das células filhas já interfásica, a região central da ponte intercelular foi margeada por duas regiões de menor densidade de microtúbulos.

3.3.5 Células Tratadas com Crisotila: Observação e Destinos de Mitoses

Multipolares

Células HK2 tratadas com crisotila apresentaram formação de fusos anormais em cerca de 50% das células em mitose, como já descrito na literatura (CORTEZ & MACHADO-SANTELLI, 2008). No presente estudo foram observadas também células Hela, e as duas linhagens – HK2 e Hela –, quando tratadas com crisotila por 24 ou 48 horas apresentaram respostas muito semelhantes ao tratamento, com a ampla formação de mitoses multipolares. Cerca de 50 células tratadas com crisotila foram observadas, e preferencialmente foram observadas mitoses multipolares já que estas são descritas como relacionadas à formação de células aneuploides. Todos os casos analisados aqui apresentados se repetiram ao menos 2 vezes durante as observações.

As mitoses foram acompanhadas a partir da metáfase por até 150 minutos, sendo que em cerca da metade dos casos observados as células progrediram para a anáfase dentro deste período. Alguns destinos das mitoses multipolares foram agrupados da seguinte maneira:

1) Metáfases multipolares que permaneceram de maneira multipolar por mais que 100 minutos sem progredir para a anáfase, com os pólos dos fusos organizados de maneira tripolar ou quadripolar por todo o tempo observado (Fig. 15 e 16, filmes 05 e 06). Estas células apresentaram movimentação dos microtúbulos, porém os pólos dos fusos permaneceram geralmente na mesma posição na célula, mantendo a organização tri ou quadripolar.

2) Mitoses multipolares com mais de 4 pólos, mas organizados de maneira mais próxima a bipolar. Nestes casos ocorreu a concentração dos centrossomos em dois pólos principais da célula - os microtúbulos foram irradiados de maneira geral a partir destes dois pólos, enquanto os cromossomos estavam posicionados na região central da célula

(Fig. 17, filme 07). Os diversos pólos dos fusos nestes casos apresentaram movimentação dos microtúbulos, mas não foi observada progressão para a anáfase em até 120 minutos de observação.

3) Metáfases multipolares com fusos de até 4 pólos progrediram para a anáfase e telófase, dando origem a três células filhas. Nestes casos foram formados dois corpos intermediários de microtúbulos similares entre si (Fig. 18, filme 08) ou não em relação ao tamanho e organização dos microtúbulos. Nos casos de corpos intermediários diferentes ou assimétricos, um deles apresentou tamanho reduzido, com menor sinal de fluorescência e organização dos microtúbulos de maneira distinta à organização dos microtúbulos de células que se dividiram de maneira bipolar. Já o outro corpo intermediário apresentou tamanho e organização muito semelhantes ao observado em células controle (Fig. 19). Este corpo intermediário menor se desfaz antes que o outro, “liberando” uma das células filhas antes que as outras duas se desliguem (Fig. 19, filme 09). Em poucos casos em que foram observadas divisões tripolares resultando em 3 células filhas não houve organização alguma dos microtúbulos nem formação de corpo intermediário (Fig. 20, filme 10).

4) Metáfases multipolares que progrediram para anáfase e telófase gerando inicialmente 3 ou 4 células filhas, porém estas se fundiram gerando apenas duas células filhas com apenas um corpo intermediário organizado (Fig. 21 e 22, filme 11 e 12). Outra evidência de que as células podem se dividir em 3 ou 4 e depois se fundirem formando apenas duas células filhas foi a observação de uma citocinese com a presença de dois corpos intermediários, mas apenas duas células filhas (Fig. 23, seta, filme 13).

5) Divisões multipolares que resultaram em apenas duas células filhas, com formação normal dos microtúbulos na ponte intermediária. Nestes casos os pólos dos fusos se agruparam em dois pólos principais apenas poucos minutos antes da anáfase

(Fig. 24). Observaram-se também células inicialmente em metáfase com mais de dois pólos dos fusos, sendo que estes pólos se organizam de maneira bipolar; após cerca de 60 minutos de observação não foi mais possível identificar mais que dois pólos dos fusos (Fig. 25, filme 14).

6) Morte celular após metáfase multipolar. Células em metáfase com mais de dois pólos dos fusos foram observadas entrando em morte celular, identificada pelo extravasamento do citoplasma visto por luz transmitida (Fig. 26, filme 15).

Figura 15: **Célula HK2 transfectada com plasmídeo RFP α -tubulina e tratada com crisotila por 48 horas.** Célula em metáfase com três pólos do fuso mitótico estáveis, sem grande movimentação dos microtúbulos durante o período observado. Após 1 hora e 40 minutos a célula não progrediu para a anáfase, e os pólos não se organizaram de maneira bipolar. Filme 05.

Figura 16: **Célula em metáfase multipolar após tratamento com crisotila.** Célula HK2 transfectada com plasmídio GFPα-tubulina e tratada com crisotila por 48 horas foi observada em metáfase com três pólos do fuso mitótico estáveis, porém com movimento constante dos microtúbulos. Após 1 hora e 30 minutos a célula não progrediu para a anáfase, e durante o período observado pontos de alta concentração de tubulina-GFP surgiram e se deslocaram pela célula. Filme 06.

Figura 17: **Célula em mitose multipolar após tratamento com crisotila.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina e tratada com crisotila por 48 horas foi observada em metáfase com diversos pólos do fuso mitótico agregados de maneira semelhante a bipolar, com movimento constante dos microtúbulos e pólos do fuso. Após 2 horas de observação a célula não progrediu para a anáfase. Filme 07.

Figura 18: **Mitose multipolar resultando em três células filhas após tratamento com crisotila.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina tratada com crisotila por 48 horas, observada inicialmente em metáfase com diversos pólos mitóticos organizados de maneira tripolar. A célula progrediu para a anáfase e deu origem a três células filhas, com a formação de duas pontes intercelulares e dois corpos intermediários de microtúbulos. As células filhas foram observadas por cerca de 2 horas, e já neste período começaram a organizar os microtúbulos de maneira interfásica. Os dois corpos intermediários se formaram normalmente e apresentaram tamanho e organização semelhantes, com a formação da região central com menor sinal de fluorescência após cerca de 50 minutos do início da citocinese. Filme 08.

Figura 19: **Citocinese resultando em três células filhas após tratamento com crisotila.** Células HK2 transfetadas com plasmídio GFP α -tubulina tratadas com crisotila por 24 horas foram observadas em telófase resultando em três células filhas. Duas das células apresentaram tamanho similar e estavam ligadas por ponte intercelular com microtúbulos organizados formando um corpo intermediário como observado em divisões controle, e a outra célula apresentou tamanho menor e permaneceu ligada as outras células por uma ponte intercelular delgada. Após 150 minutos as 3 células apresentaram morfologia interfásica, e a célula menor não apresentou mais ligação com as outras duas. Filme 09.

Figura 20: **Mitose multipolar resultando em três células filhas após tratamento com crisotila.** Duas células HK2 transfectadas com plasmídeo GFP α -tubulina tratadas com crisotila por 48 horas foram observadas inicialmente em metáfase, uma multipolar e outra bipolar. A multipolar após 35 minutos de observação progrediu para a anáfase, e se dividiu em três células filhas. Porém, não foi observada nenhuma organização dos microtúbulos formando o corpo intermediário. A célula inicialmente bipolar desorganizou seus fusos mitóticos, não apresentando mais organização característica de mitose. Filme 10.

Figura 21: **Células em divisão mitótica bipolar e multipolar após tratamento com crisotila.** Células Hela transfectadas com plasmídeo GFP α -tubulina e tratadas com crisotila por 24 horas foram observadas ao microscópio de fluorescência. Na indicação da seta, célula em anáfase/telófase resultando em quatro células filhas inicialmente. Após 40 minutos as células se fundiram formando duas células filhas, e assim apenas uma ponte intercelular e um corpo intermediário de microtúbulos se formaram. Após 120 minutos de observação o corpo intermediário estava formado e uma das células filhas já estava aderida ao substrato com microtúbulos organizados de maneira interfásica (última imagem). Na mesma galeria também foi observada uma célula em metáfase com microtúbulos organizados de forma bipolar, que se dividiu formando duas células filhas. Filme 11.

Figura 22: **Célula em metáfase multipolar formando duas células filhas após anáfase tripolar.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina foi tratada com crisotila por 48 horas. A célula foi observada inicialmente em metáfase, com quatro pólos no fuso mitótico. A célula progrediu para anáfase, e se dividiu em três células, porém duas se fundiram durante a telófase e após 5 minutos a células perdeu o sinal de fluorescência, mas a presença de duas células filhas foi confirmada pela observação em luz transmitida. Filme 12.

Figura 23: **Citocinese evidenciando fusão de células filhas e célula interfásica com dois centrôssomos.** Foram observadas células HK2 transfectadas com plasmídeo GFP α -tubulina e tratadas com crisotila por 48 horas. As células indicadas pela seta apresentaram morfologia de células interfásicas, porém ainda unidas pela ponte intercelular. Os quadros pequenos apresentam o detalhe da ponte intercelular, ressaltando a presença de uma ramificação, indicando que esta divisão deve ser resultado de uma divisão em três células filhas, e duas das células se fundiram. A outra célula observada apresentou dois pontos de onde os microtúbulos eram irradiados, que durante o período de observação se aproximaram. A célula não entrou em mitose como ocorreu em células controle interfásicas com dois centrôssomos. Filme 13.

Figura 24. **Mitose multipolar resultando em duas células filhas.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina tratada com crisotila por 24 horas foi observada inicialmente em metáfase com 4 pólos do fuso, porém progrediu para a anáfase gerando apenas duas células filhas. Os pólos do fuso no momento da entrada em anáfase se agregaram formando apenas dois pólos principais.

Figura 25: **Formação de fuso bipolar a partir de fuso multipolar.** A célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina e tratada com crisotila por 24 horas foi observada inicialmente em metáfase multipolar. Os pólos do fuso mitótico se movimentaram e após 35 minutos de observação foram organizados de maneira bipolar. Após 95 minutos de observação a célula não havia progredido para anáfase, porém apresentava morfologia de uma célula metafásica bipolar, sendo que os diversos centrossomos inicialmente observados não foram distinguidos. Filme 14.

Figura 26: **Morte de célula em metáfase multipolar após tratamento com crisotila.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina tratada com crisotila por 48 horas, foi observada inicialmente em metáfase multipolar, com mais de 3 pólos do fuso (indicação seta). A célula permaneceu em metáfase com pouca movimentação do fuso e dos pólos, e após cerca de 90 minutos a célula apresentou morfologia de morte, confirmada pela observação por luz transmitida. No mesmo período foram observadas células em citocinese, com a ponte intercelular formada com os microtúbulos organizados durante todo o período. Filme 15.

3.3.6 Alterações relacionadas aos microtúbulos após tratamento com crisotila

Outras alterações relacionadas aos microtúbulos e formação dos fusos mitóticos foram encontradas em células HK2 e Hela tratadas com crisotila por 24 e 48 horas.

Durante mitoses bipolares e também multipolares foram observados pontos de alta concentração de tubulina, semelhantes à centrossomos, que se movimentavam pela célula (Fig. 16) ou permaneciam na mesma posição durante o período de observação (Fig. 27, filme 16). Raramente foram vistos microtúbulos organizados como fibras mitóticas sendo irradiados destes pontos, e normalmente mitoses com estes pontos permaneceram em metáfase por todo o período observado, não concluindo o ciclo celular.

Em células interfásicas controle transfectadas com os vetores GFP- α tubulina e RFP- α tubulina foi possível identificar a região do centrossomo da célula, pela alta concentração de microtúbulos sendo irradiados ou pela visualização de um ponto de alta concentração de tubulina. Quando observados centrossomos duplicados em célula interfásica, a célula desfez sua rede de microtúbulos para organizar o fuso mitótico (Fig. 10). Nas células tratadas com crisotila também foram vistos os centrossomos em células interfásicas, e após o tratamento foram observadas células com dois centrossomos que não entraram na fase M do ciclo celular, permanecendo em interfase. Em alguns casos os centrossomos se aproximaram e permaneceram na mesma região da célula (Fig. 23) em outros os centrossomos permaneceram em regiões afastadas, mas apresentaram certa fragmentação de sua estrutura, de forma dinâmica (Fig. 28, filme 17).

Em células metafásicas foram observadas outras alterações relacionadas aos microtúbulos, como formação de fibras do fuso em direção à membrana celular e não

em direção aos cromossomos (Fig. 29, filme 18). Também houve células em metáfase com os microtúbulos organizados formando os fusos mitóticos, e durante o período de observação os pólos dos fusos se aproximaram e os fusos se desorganizaram (Fig. 20 e 30). Já em células em citocinese foram observadas células ligadas pela aparentemente ponte intercelular, com alta concentração de microtúbulos, no entanto sem a presença do corpo intermediário organizado, e com microtúbulos contínuos entre as duas células. Estas células apresentaram movimentação lenta, porém durante os períodos observados elas se aproximaram (Fig. 31, filme 19), indicando que poderia estar ocorrendo uma regressão da citocinese.

Figura 27: **Formação de pontos de alta concentração de tubulina não irradiadoras microtúbulos.** Células HK2 e Hela transfectadas com plasmídeo GFP α -tubulina e tratadas com crisotila por 24 h foram observadas em mitoses bipolar (A, célula HK2) e multipolar (B, célula Hela) com pontos de alta concentração de tubulina, porém não irradiadores de microtúbulos e fibras do fuso. Esses pontos permaneceram próximos aos pólos do fuso da célula durante todo o período de observação, e apresentaram pequena movimentação. As células não progrediram no ciclo celular. Filme 16.

Figura 28: **Célula interfásica tratada com crisotila com duas estruturas semelhantes a centrossomos.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina e tratada com crisotila por 24 h foi observada com morfologia interfásica, com a rede de microtúbulos formada por todo o citoplasma e região nuclear evidente. A célula continha dois pontos semelhantes a centrossomos, porém estes apresentaram fragmentação em pequenos pontos que se mantiveram próximos durante todo o período de observação. A célula não progrediu para a fase M do ciclo celular, e a rede de microtúbulos permaneceu totalmente formada até 105 minutos após o início da observação. Filme 17.

Figura 29: **Formação de fibras mitóticas em direção a membrana em célula metafásica após tratamento com crisotila.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina tratada com crisotila por 24 horas foi observada inicialmente em metáfase bipolar. Após cerca de 15 minutos de observação fibras mitóticas começaram a ser irradiadas de um dos pólos do fuso, porém com crescimento em direção a membrana celular, e não em direção dos cromossomos. A fibra permaneceu crescendo até 45 minutos após o início da observação. Filme 18.

Figura 30: **Desorganização do fuso mitótico em célula tratada com crisotila.** Célula HK2 transfectada com plasmídeo GFP α -tubulina e tratada com crisotila por 24 horas foi observada em metáfase, com o fuso mitótico organizado de maneira bipolar. Após 20 minutos de observação os pólos começaram a se aproximar, e após cerca de 50 minutos de observação os pólos estavam muito próximos e os microtúbulos já não organizados formando o fuso mitótico. A célula foi observada por 2 horas e a estrutura antes formada foi totalmente desorganizada.

Figura 31: **Células interfásicas com região comum de microtúbulos.** Células HK2 transfectadas com plasmídio GFP α -tubulina tratadas com crisotila por 24 horas foram observadas com morfologia interfásica e região comum densa em microtúbulos, semelhante ao final de citocinese, mas não ocorreu a organização encontrada quando o corpo intermediário está organizado. As células foram observadas por cerca de 3 horas, e neste período as células se aproximam, e a ponte intercelular se tornou menos evidente. Filme 19.

3. 4 DISCUSSÃO

Processos relacionados à divisão celular hoje podem ser investigados por microscopia em tempo real (*time-lapse*), e o uso de vetores de DNA que levam à formação de proteínas de interesse fusionadas às proteínas fluorescentes permite a visualização da dinâmica e interação de componentes celulares.

A transfecção de células HK2 com o plasmídeo γ -tubulinaEGFP gerou populações muito heterogêneas em relação a presença da proteína fluorescente, indicando que as células poderiam superexpressar a proteína e formar diversos centrossomos. Estudos que empregam γ -tubulinas fusionadas a proteínas fluorescentes mostram que, dependendo do tipo celular utilizado, faz-se necessária a seleção de clones que mantenham apenas um centrossomo durante a interfase quanto o crescimento celular similar ao de células não transfectadas (HUT *et al.*, 2003; KHODJAKOV *et al.*, 2003).

Já a observação de células HK2 transfectadas com o plasmídeo RFP α -tubulina demonstrou que este plasmídeo pode ser utilizado para visualização da rede de microtúbulos, e as células transfectadas progridem no ciclo celular com a formação normal dos fusos mitóticos, assim como verificado em outros sistemas transfectados com GFP α -tubulina (STRAIGHT *et al.*, 1997; RUSAN *et al.*, 2001; HORNICK *et al.*, 2008). A transfecção com os dois plasmídios (RFP α -tubulina e GFP α -tubulina) permitiu a observação de divisões mitóticas e a identificação da presença de múltiplos pólos do fuso.

O tratamento com crisotila é descrito por levar a amplificação centrossômica e à formação de fusos multipolares, observados em células em cultura fixadas e submetidas à imunofluorescência. Após 48 horas de tratamento com crisotila cerca de 50% das divisões mitóticas observadas em células fixadas são multipolares (CORTEZ & MACHADO-SANTELLI, 2008, MACCLORKLE *et al.*, 2006), e resultados muito semelhantes ocorreram em

células transfectadas com os plasmídios RFP α -tubulina e GFP α -tubulina e tratadas com crisotila por 24 e 48 horas. O sistema utilizado neste estudo, com a observação das células vivas por *time-lapse*, permitiu também a análise da dinâmica dos microtúbulos, anormalidades da dinâmica destes e os possíveis destinos de divisões multipolares.

HUT e col. (2003) mostraram por *time-lapse* a formação de múltiplos pólos dos fusos após o tratamento com hidroxí-uridina, que age na replicação do DNA, e cafeína, que faz com que as células progridam no ciclo celular mesmo na presença de erros de replicação. Nas imagens apresentadas pelos autores os múltiplos pólos do fuso são formados durante a fase M do ciclo celular, após a constituição de fuso bipolar, com os microtúbulos já organizados compondo as fibras mitóticas.

Durante todas as metáfases de células tratadas com crisotila observadas em nenhum momento foram observados pólos dos fusos sendo formados. Levando em consideração o número de divisões multipolares que são formadas após o tratamento com crisotila e o número de divisões observadas por *time-lapse*, podemos admitir que a amplificação centrossômica após o tratamento com crisotila, responsável por gerar fusos multipolares durante a fase M do ciclo, não deve ocorrer durante a metáfase e fases subsequentes da fase M. Dessa forma, os múltiplos centrossomos, que vão determinar o número de pólos do fuso, poderiam ser formados durante a prófase, ou durante a interfase anterior.

Estudos que utilizam células em cultura irradiadas ou tratadas com drogas que provocam danos e quebras no DNA descrevem a fragmentação do material centrossômico em células interfásicas, além da possível reduplicação dos centrossomos em células retidas em G1/S, e estas células podem formar fusos multipolares durante a fase M seguinte (BOURKE *et al.*, 2007; AMÉ *et al.*, 2009; BOROJERD *et al.*, 2009). No presente estudo foram observadas células tanto interfásicas com estruturas muito semelhantes a centrossomos

fragmentados apresentados na literatura, quanto células com mais de dois centrôssomos presentes em células interfásicas, e em nenhum destes casos as células apresentaram início de reorganização dos microtúbulos para formar os fusos mitóticos durante todos os períodos observados. Assim, a amplificação centrôssômica em células tratadas com crisotila por 24 ou 48 horas deve ser decorrente de amplificação durante a interfase ou em fases muito iniciais da prófase.

Observando as células em metáfases multipolares, cerca de 50% delas completaram a divisão, e cerca de 50% se mantiveram em metáfase ou foram encaminhadas para a morte celular. As células que progrediram no ciclo celular geraram em alguns casos 3 células filhas, e este tipo de divisão estaria relacionado à formação de células aneuploides viáveis e também inviáveis devido a cariótipo muito reduzido e a perda de cromossomos essenciais à sobrevivência da célula (FUKASAWA, 2005). Porém, como a cultura utilizada neste estudo é de células tumorais, estas podem apresentar um cariótipo hipertetraploide como ocorre na maioria dos tumores (WEAVER & CLEVELAND, 2008), e assim as células formadas após citocineses anormais podem conter um cariótipo que permita a sobrevivência das células.

Já a divisão resultando em mais de três células filhas não foi observada, e após anáfases com fuso de 4 pólos principais ocorreu a fusão das células filhas. Processos semelhantes sucederam em células que progrediram para anáfase com 3 pólos principais e ao final geraram apenas duas células filhas. Estas células que sofreram fusão vão apresentar mais de um centrôssomo na interfase seguinte, sendo possíveis responsáveis pela formação de novas mitoses multipolares e células aneuploides no próximo ciclo celular.

Outro evento relacionado à formação de células com número aumentado de centrôssomos é a falha no processo de citocinese, e assim a formação de uma célula com

conteúdo de DNA e de centrôssomos duplicado (FUKASAWA, 2005). O processo de citocinese pode chegar a mais de 12 horas, dependendo do tipo celular. Durante este período as células filhas já com morfologia interfásica se mantêm unidas por uma fina ponte intercelular, que concentra os microtúbulos formando o corpo intermediário e proteínas requeridas para a completa separação das células filhas (EGGERT *et al.*, 2006; BARR & GRUNEBERG, 2007). A falha na citocinese devido à presença de fibras de amianto na ponte intercelular foi observada por JESSEN & WATSON (1999), e a regressão da citocinese ocorreu no final do processo, após cerca de 8 horas.

No presente estudo os períodos de aquisição de imagens eram restritos a 4 horas, e por isso não foram acompanhados processos de citocinese completos. Mas foram observadas células interfásicas posicionadas como células filhas, com ligação citoplasmática entre as células semelhante à ponte intercelular como ocorre na citocinese, com microtúbulos ligando as duas células. Estes microtúbulos não estavam formando o corpo intermediário, e não havia pontos de menor densidade de microtúbulos como é observado em citocinese normal. Também durante o período observado as células se aproximaram, unindo seus citoplasmas. Este tipo de observação sugere que o tratamento com crisotila por 24 e 48 horas pode levar à falha na citocinese, sem a organização dos microtúbulos em um corpo intermediário na ponte intercelular, e assim será formada apenas uma célula filha tetraploide e com dois centrôssomos. Esta célula, no seu próximo ciclo celular, pode dar origem a metáfases multipolares e assim ter um dos possíveis destinos observados neste trabalho.

A presença de mitoses multipolares também é relacionada à morte celular, na chamada catástrofe mitótica (DOSXEY *et al.*, 2005). Seguindo esta hipótese, uma célula que sofreu muitos danos, por exemplo, ao seu DNA, pode ativar uma via que conduz à amplificação centrôssômica, e entrar na fase M do ciclo com múltiplos pólos dos fusos.

Uma célula com número muito aumentado de centrôssomos pode ser encaminhada à morte celular, como observado em células submetidas à irradiação gama que apresentam múltiplos centrôssomos em 60% dos casos de morte celular durante a fase M (DODSON *et al.*, 2007).

O uso de *time-lapse* no presente estudo também permitiu a observação de anormalidades relacionadas aos microtúbulos, como focos de α -tubulinaGFP durante a mitose não sendo irradiadores de microtúbulos (fibras mitóticas), e também fibras mitóticas direcionadas para a membrana em vez de para a placa metafásica durante a mitose. A formação dos fusos mitóticos depende de um balanço entre proteínas que estabilizam os microtúbulos, as MAPs, que são fosforiladas durante o início da fase M pelo Complexo Promotor da Mitose, e as proteínas chamadas de fatores de catástrofes, que induzem à despolimerização dos microtúbulos. O balanço entre estas proteínas que atuam intensamente durante a prófase e a metáfase confere a dinâmica necessária aos microtúbulos para que os fusos mitóticos sejam formados e ligados às cromátides (HOWARD & HYMAN, 2007). No caso do tratamento com crisotila, o balanço entre estas proteínas seria perturbado, assim levando a despolimerização dos microtúbulos, em alguns casos, e também à polimerização “incorreta” de fusos mitóticos em outros.

As imagens de fusos bipolares formados que perdem sua organização no decorrer da metáfase e de estruturas com alta concentração de tubulina, mas não irradiadoras de microtúbulos, são muito semelhantes a imagens obtidas em sistemas que interferem no balanço entre MAPs e fatores catastróficos, como MCAK (TOURNEBIZE *et al.*, 2000; BARR & GERGELY, 2008). Dessa modo, os resultados aqui presentes apontam para uma possível interferência da crisotila na nucleação dos fusos mitóticos e balanço entre as proteínas envolvidas neste processo.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A transfecção de células HK2 e Hela com vetores que codificam α -tubulinas fusionadas às proteínas fluorescentes GFP e RFP propicia o estudo da dinâmica dos microtúbulos, formação dos fusos mitóticos e divisão mitótica.

Utilizando-se estas células transfectadas e microscopia em tempo real, foi possível identificar que o tratamento com crisotila por 24 ou 48 horas leva à formação de mitoses multipolares. A análise das imagens aponta para a formação de centrosomos extra numéricos durante a interfase e também, devido à fusão de células em citocinese ou em telófase, logo após a anáfase multipolar.

Metáfases multipolares podem ser retidas nesta fase por períodos longos, podem progredir para a anáfase, formando duas ou três células filhas, ou podem ser encaminhadas para a morte celular.

Os resultados também apontam para outro efeito da crisotila, interferindo no balanço entre proteínas que estabilizam e desestabilizam os microtúbulos durante a fase M do ciclo celular.

3. 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GUIDUCCI, C.; CERONE, M. A., BACCHETTI, S. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear

and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. **Oncogene**, 20: 714–725, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TOURNEBIZE, R.; POPOV, A.; KINOSHITA, K.; ASHFORD, A. J.; RYBINA, S.; POZNIAKOVSKY, A.; MAYER, T. U.; WALCZAK, C. E.; KARSENTI, E.;

WALKER, C.; EVERITT, J.; BARRETT, J. C. Possible cellular and molecular mechanisms of asbestos carcinogenicity. **Am. J. Ind. Med.**, 21: 253-273, 1992.

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

Capítulo IV

Considerações Finais

A crisotila, como o único tipo de amianto que ainda pode ser comercializado na maioria dos países, vem sendo investigada a fim de se obter informações sobre as alterações celulares que ela pode causar, e quais destas alterações podem estar envolvidas no desenvolvimento de patologias. A crisotila se diferencia dos outros tipos de amianto, que hoje são considerados carcinógenos, principalmente em sua estrutura, que é maleável, e em relação ao seu *clearance*, já que as fibras, quando mantidas a temperaturas iguais ou superiores a 37°C, se fragmentam em pedaços pequenos, muitas vezes não vistos ao microscópio de luz convencional.

Estudos vêm mostrando que alterações celulares são causadas pela crisotila, e quais alterações podem ser identificadas mesmo durante o período em que as fibras já estão fragmentadas. Dessa forma, ainda é necessário entender se as alterações observadas estão relacionadas ao comprimento das fibras ou se os fragmentos são também responsáveis pelas alterações, e ainda se as alterações causadas sobretudo nas primeiras horas de exposição, quando as fibras longas estão presentes, permanecem na cultura celular.

No presente estudo foram analisadas alterações relacionadas ao ciclo celular e ao potencial mutagênico das fibras de crisotila, após tratamento de 48 horas, seguidos de recuperação por 48 horas, 4 dias e 8 dias. Células de carcinoma de pulmão, quando expostas às fibras, apresentam aumento da frequência de micronúcleos nas primeiras horas de tratamento e recuperação, enquanto a frequência de micronúcleos vai diminuindo conforme as fibras se fragmentam e não são mais encontradas na cultura. Já a formação de população aneuploide de forma dose-dependente não acompanha a presença das fibras, e esta população se mantém na cultura mesmo quando praticamente não são mais encontradas fibras. Então, podemos concluir que a crisotila apresenta um

potencial genotóxico que depende da presença da fibra, porém outras alterações decorrentes da exposição podem permanecer na cultura independentemente das fibras e podem, por sua vez, estar relacionadas ao desenvolvimento de patologias.

A observação das células em mitose por *time-lapse* foi concentrada nas primeiras 24 horas e 48 horas da exposição às fibras, e diversas mitoses multipolares foram observadas. Os resultados das observações apontam para a amplificação centrossômica ocorrendo durante a interfase via reduplicação dos centrossomos e fragmentação do material centrossomal, que, segundo a literatura atual, seriam eventos que participam da resposta das células a danos ao DNA. O aumento da frequência de micronúcleos durante o tratamento e após as primeiras horas de recuperação é indicativo de dano ao DNA causado pela ação da fibra. Também ocorreu formação de células com número elevado de centrossomos devido à fusão de células durante a citocinese e logo no início da telófase após anáfase multipolar, igualmente devido à regressão da citocinese (Fig. 1)

As células com amplificação centrossômica observadas durante o tratamento estão relacionadas à formação de células aneuploides, que permanecem na cultura até após 8 dias de recuperação em meio livre de fibras. A diferença mais marcante entre as células aneuploides encontradas nos momentos iniciais da recuperação e as encontradas após longos períodos de recuperação é que inicialmente as células aneuploides são, em sua maioria, multinucleadas e depois se tornam mononucleadas. É possível que as células com extras centrossomos observadas durante o tratamento e nas primeiras horas de recuperação possam iniciar e terminar o ciclo celular formando células com apenas um centrossomo, como visto por *time-lapse* em alguns dos casos, e estas células continuariam sendo aneuploides, mas poderiam agora formar divisões bipolares e células mononucleadas aneuploides (Fig. 1).

Algumas células em metáfase multipolar não progrediram para a anáfase e permaneceram em metáfase em todo o período observado ou apresentaram morfologia de morte celular. Portanto, células tratadas com crisotila podem permanecer em metáfase por mais tempo que células controle, bem como podem não progredir para as fases seguintes do ciclo. Quando analisado o índice mitótico, após tratamento com crisotila a maior parte das células em fase M se encontra na metáfase. Logo, esta alteração no índice mitótico reflete tanto uma parada no ciclo celular, e retenção em metáfase devido à presença de fusos multipolares, como morte celular em metáfase, fazendo com que uma parcela das células não progrida no ciclo celular (Fig. 1).

Experimentos com citometria de fluxo mostraram que após o tratamento com crisotila ocorreu aumento de células em G2/M. Parte deste aumento pode ser decorrente de retenção em metáfase, entretanto, como o índice mitótico revelou que a porcentagem de células em fase M é similar nas culturas controle e tratada, a retenção observada por citometria de fluxo pode ser devido à retenção em G2. Assim, o ponto de checagem de G2/M pode ser ativado após o tratamento com crisotila, prolongando esta fase, e também o processo de amplificação centrossômica pode ocorrer durante a fase G2 (Fig. 1).

Ao todo, no presente estudo 4 linhagens celulares foram expostas à crisotila: duas tumorais (HK2 e Hela) e duas normais (VERO e BRL3A). Os experimentos realizados com células normais indicaram que a exposição à crisotila leva à formação de mitoses multipolares e divisões resultando em três células filhas, além de células bi e multinucleadas e micronúcleos. Porém essas alterações foram menos observadas quando comparadas as células tumorais. As duas linhagens tumorais revelaram comportamento semelhante nos experimentos de *time-lapse*, apresentando cerca de 50% das mitoses multipolares. Estes resultados mostram que as fibras provocam alterações muito

semelhantes em diferentes linhagens e que as alterações aqui consideradas e descritas fazem parte de uma resposta geral das células à exposição à crisotila.

Figura 1: **Esquema geral das alterações causadas pela crisotila em células HK2.**
Esquema reunindo os dados sobre alteração no ciclo celular e na mitose e formação de células aneuploides causadas pelo tratamento com crisotila por 24 horas ou 48 horas

Tratamento com Crisotila por 24 /48 horas

Fragmentação centrossomal

Formação de células com centrossomos extras devido à regressão da citocinese

(formação de células multinucleadas aneuploides)

Metáfases multipolares

Divisão em mais de 1 célula filha

Fusão durante citocinese, células aneuploides com 1 ou mais centrossomos (aumento de células aneuploides multinucleadas)

Retenção em metáfase

Morte Celular (aumento de células em metáfase em relação a anáfase e telófase)

Fusão em telófase

2 ou 3 células mono/binucleadas aneuploides ou diploides, com mais de 1 centrossomo (aumento de células aneuploides multinucleadas)

Alinhamento dos múltiplos centrossomos em 2 pólos principais

Formação de células com múltiplos centrossomos, aneuploides ou diploides (aumento de células aneuploides mononucleadas)

Células filhas mononucleadas aneuploides, com 1 centrossomo (aumento de células aneuploides mononucleadas)