Beatriz de Araujo Cortez

Diferentes abordagens para o entendimento da aneuploidia: interferindo na mitose com o uso de crisotila e vincristina

Different approaches to understand aneuploidy: interfering with mitosis using chrysotile and vincristine

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

Orientadora: Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Cortez, Beatriz de Araujo

Diferentes abordagens para o entendimento da aneuploidia: interferindo na mitose com o uso de crisotila e vincristina

Número de páginas 220

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

1. Aneuploidia 2. Crisotila 3. Vincristina 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).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Aos meus pais, Tadeu e Leda

“Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara”

José

Saramago

Agradecimentos

Foram 10 anos no laboratório desde a iniciação científica, passando pelo mestrado e doutorado. Muitas pessoas me ajudaram neste caminho, e espero conseguir agradecer a todos aqui.

À Dra. Glaucia Santelli, por todos os ensinamentos, dedicação, discussões e amizade. Foram anos de um convívio muito prazeroso e produtivo, quando aprendi muito mais do que fazer experimentos e adquirir imagens bonitas. Muito obrigada.

A todos os meus professores da graduação e pós-graduação, pelas excelentes aulas que muito me ajudaram. Agradeço em especial aos Prof. Alberto Ribeiro e Keith Okamoto por todo o aprendizado durante as monitorias de Biologia Celular.

À Dra. Paula Rezende Teixeira pela ajuda que foi muito além dos experimentos. Obrigada por todas as conversas, risadas, e claro, por todos os PCRs.

Ao Dr Stephen Doxsey por me receber em seu laboratório com tanto entusiasmo e por ter tido um papel importante na no desenvolvimento deste projeto. Obrigada à Sambra Redick por toda a atenção e ajuda neste período, e por ter me mandado uma caixa cheia de anticorpos! Aos colegas de laboratório por terem feito os dias de trabalho mais descontraídos - Ana, Tse-Chun, John, Alison, Wendy, Heidi, Sanchaita e Hui-Fang. Às colegas brasileiras Fernanda e Edmarcia pelos momentos de companheirismo, e às minhas roommates Elizabeth e Carolina por toda a ajuda e amizade.

A todos que ajudaram com os mais diferentes microscópios que já utilizei (ou tentei utilizar!). Ao Roberto Cabado por já ter capturado muitas imagens para mim e por ter me ensinado como eu poderia fazer isso sozinha, e também pela capa desta tese. Ao Mario Cruz do Cefap por ter me ajudado tanto nesse último ano, e por todas as conversas sobre microscopia confocal. Ao João, Alex e Felipe da Nikon por terem me emprestado o Biostation para os experimentos de time-lapse e por me ajudarem a adquirir imagens nos momentos finais da tese. Ao pessoal da Leica pela longa e produtiva demonstração do confocal. Ao Prof. Hugo Armelin e Ivan Novaski por terem me deixado usar o DSU e o AutoQuantX. A Profa. Patrícia Gama por ter me deixado usar seu microscópio de fluorescência.

Aos meus amigos o laboratório BioCem por serem os melhores companheiros de laboratório. Foram tantos anos e somos tantos alunos que vou dividir em grupos. Aos mais antigos Paula, Marcel, Evandro e Camis, muito obrigada pela companhia e ajuda nos momentos de trabalho intenso, e por toda a amizade. Poderia ficar mais dez anos trabalhando com vocês. Aos mais novos Adam, Marcelo, Bianca, Jorge e Anali pelos momentos descontraídos no lab, conversas sobre novos projetos e por trazerem novos e bons ares ao lab. Aos novíssimos Stephanie, Bruna, Ju e Karina, pelas risadas e por me lembrarem como é bom (e difícil) começar a fazer ciência. Vocês todos me mostraram, principalmente nos últimos dias, que somos um grupo e tanto! E aos que já saíram, mas continuam no *core* BioCeM, Jonathan, Luana e Marina, pelos bons momentos que passamos juntos no lab.

À Marlene, que nunca deixou faltar nenhum material no lab mesmo nos períodos mais intensos de experimentos. E obrigada por organizar tão bem nossas festinhas e fazer parte delas.

À FAPESP pela bolsa concedida. Sem ela nada disso seria possível.

E gostaria de agradecer a minha família e amigos que estiveram presentes nestes anos, me apoiando e me incentivando.

Aos meus pais, Tadeu e Leda, por terem me criado com tanto amor. Vocês são meu exemplo para tudo e meu porto-seguro. Obrigada por apoiarem as minhas escolhas e por confiarem em mim. Esse trabalho aqui é fruto também da dedicação de vocês.

Aos meus irmãos queridos Fernando e Isabel, por estarem sempre por perto. Vocês são meus exemplos não só por serem meus irmãos mais velhos, mas também por serem ótimas pessoas e profissionais.

À minha tia e madrinha Aida por ser sempre tão atenciosa, carinhosa e presente. Ao meu tio Marcio por ter sempre uma boa conversa, e pela ajuda na revisão do texto. Às minhas primas Joana e Julia pelos encontros raros, mas sempre tão divertidos (e nostálgicos!). Às queridas Helenice e Pilar, por serem tão amigas e presentes.

À Mari, Beto, Carol e Letícia que me acolhem sempre com tanto carinho. Tive sorte de ter uma segunda família tão especial!

Aos amigos da biologia, por essa amizade que construímos. Ana, Luísa, Juliana, Carol e André, obrigada pelas tantas viagens, festas, encontros, caipirinhas. Por sempre comemorarem comigo as conquistas e me incentivarem nos momentos de desânimo! E às minhas amigas “desde sempre e pra sempre” Renata, Cassi e Dani, obrigada por nossos encontros tão sinceros.

Ao meu querido Raphael, meu companheiro de tudo, inclusive de finais de semana de trabalho. Obrigada por discutir os experimentos comigo e por me dar tantas sugestões, mesmo que malucas. Obrigada pelo nosso convívio tão bom, por fazer as minhas vontades, e me entender quando eu mais preciso. E obrigada por me mostrar que a vida pode ser sempre boa.

Índice

Capítulo 1. Conceitos Introdutórios	9
Objetivo	28
Materiais e Métodos	28
Capítulo 2. Alterações em células normais e tumorais expostas à crisotila	43
Introdução	45
Materiais e Métodos	56
Resultados	59
Discussão	117
Conclusão	126
Capítulo 3. Alterações me células normais e tumorais expostas à vincristina	136
Introdução	138
Materiais e Métodos	145
Resultados	148
Discussão	196
Conclusão	204
Capítulo 4. Considerações Finais	212
Resumo	218
Abstract	220

Capítulo 1: Conceitos Introdutórios

A Aneuploidia e a Divisão Mitótica

A maioria das células nos tecidos humanos encontra-se no estado diploide, ou seja, apresenta duas versões homólogas de cada cromossomo. Algumas exceções também ocorrem, como parte das células do fígado e do coração que são tetraploides (Storchova & Pellman, 2004), ou ainda algumas células nervosas aneuploides que exibem perda ou ganho de poucos cromossomos (Rehen *et al.*, 2001).

Células aneuploides são aquelas que apresentam conteúdo de DNA alterado devido a perda ou ganho de cromossomos, ou parte de cromossomos, revelando assim conteúdo de DNA diferente do diploide (Ganem *et al.*, 2007). A presença de aneuploidia está associada a diversas doenças genéticas, como a síndrome de Down, e à grande maioria dos tumores sólidos, sendo uma característica prognóstica e diagnóstica destes tumores (Machado-Santelli *et al.*, 1994; Duesberg *et al.*, 2006; Ricke & van Deursen, 2013, entre outros). Cerca de 90% dos tumores sólidos apresentam aneuploidias, dentre os quais 70% devido ao ganho de cromossomos (Mitelman Database; Weaver & Cleveland, 2008; Gordon *et al.*, 2012).

Em alguns casos esse conteúdo de DNA anormal é estável e o cariótipo alterado se mantém mesmo após sucessivas divisões mitóticas. Já em outros casos o conteúdo de DNA é instável e ocorrem alterações no cariótipo após divisões celulares, refletindo prováveis problemas na maquinaria de replicação ou de segregação dos cromossomos (Lengauer *et al.*, 1997; Rusan & Peifer, 2008). O cariótipo instável, com alterações após poucas divisões mitóticas que podem atingir todos os cromossomos, é fruto da chamada instabilidade cromossômica. A aneuploidia e a instabilidade são conceitos distintos – a aneuploidia representa um estado que pode ser alterado ou não e a instabilidade cromossômica é caracterizada pela uma taxa de alterações na composição cromossômica após sucessivas divisões.

A aneuploidia nos tumores geralmente está acompanhada de instabilidade cromossômica, conforme observado por Storchova & Kuffer (2008) após a extensa análise de amostras de tumores de diferentes origens. Em todos os casos a frequência de instabilidade cromossômica é maior em tumores aneuploides do que em tumores diploides (Storchova & Kuffer, 2008). Além disso, ambas as características estão relacionadas a um pior prognóstico e influenciam na resposta a terapias (Gao *et al.*, 2007; McClelland *et al.*, 2009; Swanton *et al.*, 2009).

Estes resultados indicam que a aneuploidia está fortemente associada aos tumores, sendo uma característica comum a tumores de origem e em estágios diferentes. Dessa forma, alguns modelos propostos para explicar a origem dos tumores sugerem que a aneuploidia

seria a principal causa da formação destes. Esta hipótese foi idealizada há mais de 100 anos a partir de estudos realizados por Boveri (revisado em Holland & Cleveland, 2009). Boveri observou divisões mitóticas aberrantes que resultavam em células com quantidade de DNA alterada durante o desenvolvimento de ouriços, e a ocorrência destas divisões aberrantes ocasionava anormalidades no desenvolvimento dos ouriços. Até a década de 1950 a aneuploidia foi tida como uma das principais causas dos tumores, quando então as mutações genéticas foram descobertas (Strong, 1949).

A partir desse momento foram estudados genes comumente mutados em tumores e descritos os oncogenes e genes supressores de tumores. Esses foram colocados como responsáveis pelo surgimento dos tumores (Hahn *et al.*, 1999; Hanahan *et al.*, 2000), e alguns autores chegaram a excluir a instabilidade genômica e a aneuploidia da possível causa do processo de tumorigênese (Zimonjic *et al.*, 2001), colocando-as apenas como uma consequência da progressão tumoral. Além da descoberta das mutações genéticas relacionadas com o câncer, alguns estudos mostraram que a relação entre aneuploidia e formação de tumores não é tão direta como se esperava. O ganho de um cromossomo, por exemplo, faz com que as células cresçam mais lentamente (Rao *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008; Sheltzer & Amon, 2011). Também, modelos animais modificados geneticamente para o aumento na frequência de células aneuploides não apresentam aumento significativo da formação de tumores (Dai *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2005; Kalitsis *et al.*, 2005; Weaver *et al.*, 2007; Weaver & Cleveland, 2009). Assim, o papel da aneuploidia, antes central no desenvolvimento dos tumores, tornou-se alvo de discussão e novos estudos.

Hoje se sabe que a perda ou o ganho de um único cromossomo, ou parte dele, podem acarretar a introdução de diversas mutações envolvidas em transformações malignas (Lengauer *et al.*, 1997), e já está claro que a aneuploidia pode contribuir para o surgimento ou desenvolvimento de tumores e também de outras doenças (Duesberg & Rasnick, 2000; Chandhok & Pellman, 2009; Kolodner *et al.*, 2011). Porém, novos modelos que tentam posicionar corretamente a aneuploidia dentro do contexto da formação dos tumores foram propostos. Baseados em estudos que demonstram que a aneuploidia pode tanto favorecer quanto suprimir a tumorigênese e a progressão tumoral, alguns autores sugerem que uma instabilidade genética leve ou moderada, que leva a mutações de ponto em genes de reparo ou a perda/ganho de um ou parte de cromossomo a cada divisão, pode dar origem a um tumor. Já altas taxas de instabilidade genética, causadoras de grandes danos ao DNA ou perda/ganho de muitos cromossomos a cada divisão, e então formadoras de células com altos graus de aneuploidia, provocam a supressão de tumores, já que as células resultantes

difficilmente sobrevivem a grandes perdas cromossômicas (Li *et al.*, 2000; Duesberg & Rasnick, 2000; Duesberg & Li, 2003; Weaver *et al.*, 2007). Também foi verificado que, dependendo do contexto genético, as respostas das células à aneuploidia são diferentes e podem resultar em morte celular e supressão tumoral, ou proliferação celular e crescimento do tumor (Weaver & Cleveland, 2009).

Tendo em mente que a aneuploidia pode favorecer ou suprimir o desenvolvimento dos tumores, hoje muitos estudos investigam os mecanismos que levam à formação de células aneuploides. Estudar como as células aneuploides são formadas pode contribuir para o entendimento da origem dos tumores e também como seu crescimento pode ser reprimido. Além do mais, a presença de aneuploidia é uma característica que atinge muitos tumores, podendo tornar-se alvo de terapias mais eficazes contra diferentes tumores.

Para que ao final de uma divisão mitótica sejam formadas duas células-filhas com conteúdo de DNA idêntico ao da célula inicial é necessário que uma série de eventos ocorra de forma coordenada. O ciclo celular pode ser dividido em duas fases principais: a interfase, subdividida em G0/G1, fase de síntese de DNA e fase G2, e a mitose. Durante a interfase a célula geralmente está metabolicamente ativa, embora sua morfologia não apresente grandes alterações entre as fases G0/G1, S e G2. Os principais eventos deste período são o crescimento celular e a replicação do DNA. A mitose corresponde a um período de baixa atividade transcricional e da maior parte das organelas, porém muitas alterações morfológicas podem ser observadas. Os principais eventos da mitose são a compactação da cromatina e a formação dos cromossomos mitóticos, a ligação dos fusos mitóticos aos cinetócoros, o alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, a separação e segregação das cromátides-irmãs para as duas células-filhas e a correta separação das células-filhas. Todos esses eventos são coordenados essencialmente pelos níveis proteicos dos diferentes tipos de ciclina que, como o nome já diz, flutuam de acordo com a fase do ciclo celular. Dependendo da fase do ciclo, ocorrem altos níveis de uma ciclina específica, que se liga a quinases dependentes de ciclinas (Cdk) formando complexos proteicos. Estes complexos são capazes de fosforilar diferentes substratos, provocando as alterações celulares necessárias para cada fase do ciclo celular.

Além daqueles que garantem a progressão no ciclo celular, a célula dispõe de mecanismos que verificam se as etapas anteriores do ciclo foram corretamente executadas e ainda se as condições intra e extracelulares estão adequadas aos níveis de atividade e etapa do ciclo celular. Esses mecanismos verificadores são conhecidos classicamente como três pontos de checagem: G1/S, G2/M e ponto de checagem do fuso mitótico. Os dois primeiros

pontos, G1/S e G2/M, envolvem as proteínas supressoras tumorais p53 e p21, que impedem que a célula passe para a próxima fase do ciclo caso o DNA contenha danos ou erros de replicação. Os danos devem ser reparados ou então a célula é encaminhada para morte a celular programada (Pietenpol & Stewart, 2002).

Os dois pontos de checagem interfásicos são importantes para prevenir a formação de células aneuploides. Erros na duplicação dos cromossomos, por exemplo, podem levar à formação de cromátides com perda de segmentos de DNA e, caso os erros sejam corrigidos, ao final da divisão celular podem ser formadas células aneuploides. Danos ao DNA durante a interfase também podem causar quebras e rearranjos cromossômicos, que, quando não reparados, podem ocasionar a formação de células com cariótipo alterado.

O terceiro ponto de checagem ocorre durante a fase M do ciclo celular, e está diretamente relacionado à formação de células aneuploides, uma vez que garante a correta segregação das cromátides-irmãs. O ponto de checagem do fuso mitótico, como é chamado, previne a entrada da célula em anáfase se os cromossomos não estiverem corretamente ligados aos fusos mitóticos. A célula deve permanecer em metáfase até que todos os cinetócoros tenham os seus sítios de ligação a microtúbulos completa e corretamente ocupados.

Hoje se sabe que a retenção na metáfase ocorre devido ao sequestro de Cdc20 nos cinetócoros livres, já que estes funcionam como um ancoradouro para proteínas do ponto de checagem que, por sua vez, se ligam a Cdc20. Quando os microtúbulos se ligam corretamente aos cinetócoros, os sítios de ligação destes às proteínas do ponto de checagem tornam-se fracos e elas se desligam dos cinetócoros, liberando Cdc20, que passa então a ativar o APC (complexo promotor da anáfase). Este, por sua vez, leva à ubiquitinação da Securina, que 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 desencadeadas para a entrada na fase M do ciclo celular, como a compactação do DNA, fragmentação do retículo, Golgi e envoltório nuclear e remodelamento dos microtúbulos, sejam revertidas e a célula possa concluir o ciclo celular. Desta forma, as células-filhas podem adquirir morfologia típica de células interfásicas (Brito & Rieder, 2006; Musacchio & Salmon, 2007).

O ponto de checagem mitótico também é regulado de acordo com a ligação dos cinetócoros das cromátides-irmãs aos microtúbulos. As cromátides devem estar ligadas a fusos provenientes de polos opostos, constituindo a chamada orientação anfitélica. Quando a ligação anfitélica ocorre, é gerada uma tensão entre as cromátides-irmãs que também

estabiliza a ligação microtúbulo-cinetócoro. A orientação anfitélica satisfaz o ponto de checagem do fuso mitótico, permitindo a passagem para a anáfase e garantindo que as cromátides-irmãs sejam levadas a polos opostos da célula (Cimini & Degraasi, 2005; May & Hardwick, 2006; Matos & Maiato, 2011; Jin & Wang, 2013).

Além da orientação anfitélica outros tipos de ligações formadas entre cinetócoros-microtúbulos podem ocorrer, sendo estas monotélica, sintélica e merotélica. A orientação monotélica se dá quando apenas uma das cromátides se liga a microtúbulos e o cinetócoro da outra cromátide permanece livre. A presença de apenas um cinetócoro livre é capaz de ativar o ponto de checagem e reter a célula na metáfase, até que o erro seja corrigido, evitando assim erros de segregação cromossômica em células com ponto de checagem normal (Musacchio & Hardwick, 2002; Thompson *et al.*, 2010). A orientação sintélica é caracterizada quando duas cromátides-irmãs se ligam a microtúbulos provenientes do mesmo polo do fuso mitótico. Este tipo de orientação também é capaz de ativar o ponto de checagem, já que em células onde a orientação sintélica é induzida pelo uso de pequenas moléculas sucede o acúmulo da proteína Mad2 nos cinetócoros, o que caracteriza ativação do ponto de checagem (Kapoor *et al.*, 2000). O quarto tipo de orientação é a ligação merotélica, que ocorre quando o cinetócoro de uma cromátide é ligado a fusos provenientes dos dois polos (Ganem *et al.*, 2009). A orientação merotélica parece não ativar o ponto de checagem, e células com este tipo de orientação podem passar para a anáfase levando a erros de segregação cromossômica mesmo em células com ponto de checagem do fuso mitótico normal (Salmon *et al.*, 2005; Cimini & Degraasi, 2005; Ganem *et al.*, 2009).

Quando alinha seus cromossomos na placa metafásica e satisfaz o ponto de checagem, a célula progride para a anáfase e a telófase. A partir desse momento corre a degradação da Ciclina B pelo APC e a retomada da morfologia característica de células interfásicas, enquanto se inicia também a citocinese, etapa final da divisão responsável por separar as células-filhas.

Diversos erros durante a divisão mitótica podem levar à formação de células aneuploides. Os principais mecanismos já descritos são: i) defeitos de coesão entre as cromátides-irmãs; ii) anormalidades no ponto de checagem mitótico; iii) interações hiperestabilizadas entre fusos e cinetócoros; iv) ligações merotélicas; v) amplificação centrossômica; vi) falhas na divisão celular. Alguns desses mecanismos se relacionam entre si podendo ocorrer simultaneamente na formação de células aneuploides.

De forma geral, defeitos de coesão entre as cromátides-irmãs, anormalidades no ponto de checagem mitótico, interações hiperestabilizadas entre fusos e cinetócoros e ligações merotélicas podem levar a erros de segregação das cromátides-irmãs durante a transição

metáfase/anáfase. A perda prematura da coesão entre as cromátides-irmãs pode provocar sua separação ainda durante a metáfase, e caso elas estejam ligadas a fusos provenientes do mesmo centrôssomo irão segregar para a mesma célula-filha. Interações hiperestabilizadas entre cinetócoros e fusos impedem a dinâmica de ligação entre eles, não permitindo correções nessas ligações e mantendo erros que podem resultar em alterações na segregação das cromátides. De forma semelhante, anormalidades no ponto de checagem mitótico podem permitir a progressão para a anáfase mesmo na presença de erros de ligação entre fusos e cinetócoros, ocasionando erros na segregação das cromátides.

As ligações merotéticas, como descrito acima, não são capazes de ativar o ponto de checagem mitótico e assim podem levar a erros de segregação. A maior parte das células que apresentam ligações merotéticas parece completar a segregação correta dos cromossomos. Porém, caso um cinetócoro esteja ligado a um número semelhante de microtúbulos provenientes de cada um dos dois polos, a cromátide não será direcionada para nenhum dos polos durante a anáfase, e assim uma fração de células com ligações merotéticas apresentará cromátides entre os lotes de cromossomos durante a anáfase e a telófase. Durante a citocinese a cromátide que não segregou corretamente irá integrar uma das células-filhas, dependendo da sua posição em relação ao plano de clivagem. Dessa maneira, são formadas células aneuploides em cerca de 50% dos casos de ocorrência de ligações merotéticas (Cimini & Degraffi, 2005; Holland & Cleveland, 2012).

A amplificação centrôssômica vem sendo muito estudada, pois, além de ser um mecanismo relacionado com a formação de células aneuploides, é característica de células tumorais. Em tumores a amplificação centrôssômica geralmente vem acompanhada de alterações estruturais dos centrôssomos, como formação de corpos acentriolares, alterações no estado de fosforilação de seus componentes e tamanho dos centrôssomos (Pihan *et al.*, 2001; Nigg, 2002; Delaval & Doxsey, 2010). Hoje estudos mostram que a presença de alterações centrôssômicas pode ocorrer em estágios iniciais do desenvolvimento de tumores, como no caso de tumores de colo de útero, mama e próstata (Nigg, 2002), evidenciando que alterações nos centrôssomos podem estar relacionadas ao processo de tumorigênese.

A falha na citocinese também é outro mecanismo associado à formação de células aneuploides que vem sendo muito estudado, uma vez que leva à formação de células tetraploides e multinucleadas – outras características frequentemente encontradas em tumores (Ganem *et al.*, 2007). Desse modo, a amplificação centrôssômica e a falha na citocinese serão abordados aqui de forma mais aprofundada, já que também foram alvo de investigação no presente estudo.

O Ciclo e a Amplificação Centrossômica

Os centrossomos são organelas celulares não envoltas por membrana, formados por um par de centríolos envoltos por uma matriz pericentriolar. Essa matriz contém anéis de γ -tubulina, onde se inicia a polimerização de todos os microtúbulos presentes numa célula – por essa razão os centrossomos são conhecidos também como centros organizadores de microtúbulos.

Recentemente os centrossomos foram postulados como centros de reações, organizando espaço-temporalmente os componentes dos pontos de checagem, e também como centros de controle do ciclo celular (Doxsey, 2001; Doxsey *et al.*, 2005). Essa hipótese surgiu após a observação de que a matriz pericentriolar é formada por proteínas que estão sempre presentes nela, como a γ -tubulina e a Pericentrina, mas também por proteínas que se associam aos centrossomos conforme a fase do ciclo celular. Quando nos centrossomos, essas proteínas podem interagir entre si, iniciando cascatas de sinalização necessárias à progressão do ciclo celular. Passam pelos centrossomos, por exemplo, proteínas de ponto de checagem G2/M e ponto de checagem do fuso mitótico, reguladoras de transição G1/S, reguladoras de citocinese e também proteínas relacionadas com a apoptose (Doxsey *et al.*, 2005).

Durante a mitose os centrossomos formam os polos dos fusos mitóticos, e assim devem ser duplicados antes do início da fase M do ciclo celular. O estudo do ciclo centrossômico revelou que ele está associado ao ciclo celular, e sua duplicação acompanha a duplicação do DNA. Ambos os processos são iniciados pela ativação do complexo Cdk2-CiclinaE ao final de G1, que está envolvido na replicação do DNA pela fosforilação da proteína Rb, e também ambos são processos semiconservativos (Nevins, 2001; Hinchcliffe & Sluder, 2001; Matsumoto & Maller, 2004). A duplicação do centrossomo tem então início na passagem G1/S, e durante S e G2 os novos centríolos se alongam e a matriz pericentriolar é recrutada, sendo que no final de G2 os dois centríolos já estão totalmente formados.

A duplicação dos centríolos se inicia com a formação de um novo centríolo junto à região proximal de cada centríolo já existente, chamado inicialmente de pró-centríolo, durante a fase S. Plk-4 (*polo-like kinase 4*, uma quinase que se localiza nos centríolos) e Cep152 (*centrosomal protein 152kDa*) parecem ser as iniciadoras do processo. A primeira alteração estrutural que indica a formação do pró-centríolo é a presença de uma estrutura proteica em forma de “roda de carroça” com nove divisões, localizada perpendicular à parede de cada centríolo existente. As proteínas Sas-6 e Sas-5/STIL (*spindle assembly 6 homolog* e *spindle assembly related protein 5*) participam da formação dessa estrutura, em cuja região central se

localiza Sas-6, proteína fundamental para a replicação dos centríolos (Dammermann *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2011). Externamente a essa estrutura em forma de roda são adicionadas as nove trincas de microtúbulos centriolares, estruturas muito estáveis chamadas de túbulos A, B e C. Na fase G2 do ciclo celular os pró-centríolos são alongados a partir da adição de dímeros de α e β -tubulina às trincas já posicionadas. Essa adição ocorre com o auxílio de Sas-4/CPAP (*centromere protein J*, proteína centromérica que atua na formação dos centríolos) e Centrobín, que são recrutadas aos pró-centríolos, estabilizando sua estrutura e interagindo com a tubulina, promovendo a adição de dímeros de tubulina aos pró-centríolos (Leidel & Gönczy, 2003; Carvalho-Santos *et al.*, 2010; Gudi *et al.*, 2011). O tamanho dos centríolos parece ser regulado de acordo com seu grau de maturação, e apenas pró-centríolos ou centríolos não totalmente maduros ainda podem sofrer a incorporação de dímeros de tubulina. Quando atingem comprimento adequado, a proteína CPAP presente nos centríolos é fosforilada e as moléculas de tubulina são alteradas, de modo a impedir a adição de novos dímeros (Azimzadeh and Marshall, 2010). Nesse mesmo momento, ao final de G2, Plk1 (*polo-like kinase 1*) e Aurora A (*Aurora kinase A*) induzem a maturação dos centríolos e acúmulo de matriz pericentriolar ao redor dos dois pares de centríolos, possibilitando sua migração para os polos opostos da célula (Blagden & Glover, 2003). Quando se inicia a mitose o pró-centríolo é chamado de centríolo-filho, e o centríolo preexistente de centríolo-mãe (Brito *et al.*, 2012).

Na transição metáfase-anáfase, o complexo promotor da anáfase degrada Securin e leva à ativação da Separase. Esta irá degradar Scc1 (homólogo de RAD21, *mitotic cohesin complex*), que é responsável por manter os centríolos-mãe e filho unidos. Com a degradação de Scc1 o centríolo-mãe e o centríolo-filho são desacoplados, embora permaneçam ligados por outras estruturas e compartilhem a mesma matriz pericentriolar. A perda dessa união é o evento que viabiliza a próxima replicação dos centríolos durante a próxima fase S. Dessa forma, durante a transição mitose/G1, ocorrem dois eventos que mais uma vez evidenciam a associação entre o ciclo centrossômico e o ciclo celular: nesta etapa ocorre o distanciamento dos centríolos que irá permitir a próxima replicação destes, e também ocorre o distanciamento das duas fitas de DNA, que é o evento que autoriza a replicação do DNA pois permite que os fatores necessários à replicação tenham acesso às origens de replicação (Tsou *et al.*, 2009; Schöckel *et al.*, 2011).

No decurso da mitose também ocorre o acúmulo de Plk4 no centríolo-mãe, indicando onde será o sítio de formação do novo pró-centríolo durante a próxima fase S do ciclo celular. Plk4 também é apontada como reguladora do ciclo centrossômico, uma vez que, quando

ausente, a duplicação dos centríolos não ocorre e quando superexpressa, acontece a formação de múltiplos centríolos (Holland *et al.*, 2012).

A distinção entre centríolos-mãe e centríolos-filhos pode ser feita por microscopia eletrônica de transmissão ou também com o uso de anticorpos específicos e microscopia confocal, sendo esta uma importante ferramenta no estudo dos centrossomos. Os centríolos-mãe possuem ancoradouros distais e subdistais ricos em determinadas proteínas, como a Cenexin, enquanto os centríolos-filhos são ricos em Centrobin, uma proteína que atua na duplicação dos centrossomos e se concentra apenas no centríolo-filho (Zou *et al.*, 2005). Os ancoradouros são formados durante a interfase logo após a divisão mitótica e podem ser visualizados por microscopia eletrônica de transmissão e igualmente detectados por imunorreações, uma vez que existem anticorpos específicos para a detecção das proteínas concentradas nos centríolos-mãe e centríolos-filhos.

A amplificação centrossômica durante a interfase ou durante a própria fase M pode levar à formação de fusos multipolares, que por sua vez induzem a erros de segregação dos cromossomos e à formação de células aneuploides – que, dependendo do seu cariótipo, podem ser viáveis ou não. Figuras de mitoses multipolares e divisões em até três células-filhas são comuns em células tumorais. Em alguns tipos celulares foi notado que mitoses multipolares geralmente são encaminhadas à morte celular e algumas células com fusos multipolares podem agregar seus centrossomos em dois pontos durante a mitose, formando os chamados fusos pseudobipolares, e progredir no ciclo como uma mitose bipolar (Fukasawa, 2005). Porém, recentemente foi evidenciado que a transição de fusos multipolares para fusos pseudobipolares leva ao aumento da frequência de ligações merotéticas entre cinetócoros e fusos (Ganem *et al.*, 2009; Silkworth *et al.*, 2009). Desse modo, a amplificação centrossômica favorece a formação de células aneuploides mesmo quando são formados fusos pseudobipolares.

A amplificação centrossômica pode ser decorrente de diferentes processos, como: i) fragmentação da matriz pericentriolar, com produção de pequenos fragmentos capazes de nuclear microtúbulos; ii) alterações no ciclo centrossômico, levando à duplicação dos centríolos mais que uma vez durante um ciclo celular; iii) formação *de novo* de centríolos; iv) perda de coesão entre os centríolos e formação de centrossomos com apenas um centríolo; e v) falha na divisão celular, levando à formação de células com o dobro do conteúdo de DNA e de centrossomos.

A fragmentação da matriz pericentriolar foi observada em células infectadas por vírus, abrindo portas para o estudo deste tipo de amplificação. Células infectadas pelo vírus HTLV-1,

causador de leucemia, apresentaram formação de centrossomos acentriolares durante a mitose. O mecanismo que leva a essa fragmentação envolve a proteína Tax codificada pelo vírus, que se liga à proteína Ran presente nos centrossomos, levando a alterações destes. Os autores sugerem que a instabilidade genética causada pela infecção viral pode estar intimamente relacionada à transformação maligna (Peloponese *et al.*, 2005). Atualmente alguns trabalhos não consideram a fragmentação da matriz pericentriolar seguida da formação de corpos acentriolares como um mecanismo de amplificação centrossômica, uma vez que este evento não leva à formação de centrossomos verdadeiros devido à ausência de centríolos. Porém esta diferença de nomenclatura ainda não foi discutida e definida, e muitos trabalhos colocam este processo como um mecanismo de amplificação centrossômica.

Erros durante a duplicação dos centrossomos geralmente levam à reduplicação dos centríolos em um ciclo celular. Algumas proteínas já foram descritas por atuarem na duplicação dos centrossomos, como Plk4, Sas-5, Sas-6, SIL/STIL e Cep63, e quando elas têm sua expressão alterada facilitam a formação de muitos pró-centríolos a partir de um centríolo-mãe e a consequente formação de centrossomos extranuméricos ou a formação de um centrossomo contendo múltiplos centríolos (Kuriyama *et al.*, 2007; Basto *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2012). A infecção pelo vírus HPV também leva à amplificação centrossômica, inclusive em estágios pré-malignos após a infecção, e recentemente foi descoberto que essa amplificação ocorre devido ao aumento de expressão de Plk4 e consequente reduplicação dos centríolos (Duensing *et al.*, 2001; Korzeniewski *et al.*, 2011). Outro processo relacionado com a reduplicação dos centríolos é o tratamento de células em cultura com o AZT, componente do coquetel utilizado para tratamento de infecção por HIV (Borojerdi *et al.*, 2009). A reduplicação dos centríolos pode ser visualizada por microscopia confocal através de células com marcação para centríolos-mãe e filhos, sendo que após a reduplicação pode ser visualizado um centríolo-mãe rodeado por diversos centríolos-filhos, ou mais do que dois pares de centríolos marcados apenas para proteínas presentes em centríolos-filhos.

A formação de centríolos *de novo* é um processo geralmente inibido pela presença de centríolos maduros nas células. Esse processo pode ocorrer em células onde não há centríolos ou em células que devem formar múltiplos cílios e assim necessitam de múltiplos corpos basais (Brito *et al.*, 2012). Sendo assim, a amplificação centrossômica devido à formação *de novo* dos centríolos parece ser um evento raro. Porém, esse processo foi observado em algumas situações específicas, principalmente durante a fase S do ciclo celular. A formação de centríolos *de novo*, embora não mais semiconservativo, envolve as mesmas proteínas requeridas para a duplicação dos centríolos. Alguns trabalhos sugerem que o aumento dos

níveis proteicos de proteínas da matriz pericentriolar, como Pericentrina, pode levar à formação de centríolos *de novo* quando os mecanismos que controlam o número de centríolos por célula apresentam alterações (Loncarek *et al.*, 2008). Dados obtidos após tratamento de células com indutores de estresse oxidativo também mostraram a formação de centríolos *de novo* após o espalhamento da matriz pericentriolar (Pannu *et al.*, 2012). Como as mesmas proteínas que participam da duplicação ou reduplicação dos centríolos participam da sua formação *de novo*, a distinção entre estes dois mecanismos é difícil, mas pode ser feita a partir da detecção dos centríolos-mãe, centríolos-filhos e a distância entre estes – quando observa-se um centrossomo formado por um centríolo-filho e um centríolo-mãe além de um ou mais centríolos-filhos a uma distância maior que 0,2 μm do centríolo-mãe, é considerada a formação *de novo* de centríolos (Pannu *et al.*, 2012).

Já a perda prematura de coesão entre os centríolos pode levar à formação de centrossomos funcionais com apenas um centríolo, que podem formar fusos multipolares durante a mitose. Esse processo foi observado após a depleção de Sugoshin, proteína importante para a coesão dos centríolos (Wang *et al.*, 2008), e após a depleção de Astrin, proteína que atua tanto nos cinetócoros quanto nos centríolos (Thein *et al.*, 2007).

A amplificação centrossômica ainda pode ser decorrente de falhas na divisão celular que levam à formação de apenas uma célula-filha com conteúdo de DNA e de centrossomos duplicada. Como este também é um processo relacionado com a formação de células aneuploides, será discutido em detalhe no próximo tópico.

A duplicação dos centrossomos e processos de amplificação conforme aqui apresentados estão esquematizados na Figura 1.

Figura 1. Duplicação dos centrossomos e processos de amplificação centrossômica. Esquema mostrando o processo de duplicação do centrossomo durante o ciclo celular, com as principais proteínas envolvidas no processo. Os principais processos de amplificação também estão representados no final do esquema. Quando representadas células interfásicas, os microtúbulos estão representados em verde e a cromatina em azul escuro. Cabeças de seta indicam detalhe da estrutura.

Falhas na Divisão Celular

Falhas na divisão celular podem acarretar a formação de células tetraploides com o dobro do número de centrôssomos, tornando-se, portanto, processos muito estudados por estarem relacionados direta e indiretamente com a formação de células aneuploides.

A formação de células tetraploides em um organismo está associada ao envelhecimento, às situações de injúria aos tecidos, e também a algumas patologias, como é o caso do câncer. Muitos tumores sólidos apresentam número de cromossomos tetraploide, ou próximo ao tetraploide, e ainda células tetraploides são encontradas durante alguns estágios iniciais do desenvolvimento de tumores, evidenciando que a formação de células tetraploides, assim como a formação de células aneuploides, faz parte do processo de tumorigênese e progressão tumoral (Levine *et al.*, 1991; Kaneko & Knudson, 2000; Mitelman Database). A formação de células tetraploides após a falha na divisão também pode ser concomitante à aquisição de outras características de células tumorais, como amplificação centrossômica e a consequente formação de mitoses multipolares.

Experimentos utilizando células que sofreram falha na divisão celular revelaram a existência de um ponto de checagem tetraploide durante a fase G1 do ciclo. Este ponto parece impedir que células tetraploides proliferem via ativação de p53, p21 e proteína Rb, que também participam de pontos de checagem de danos ao DNA e progressão no ciclo celular (Andreassen *et al.*, 1996; Margolis *et al.*, 2003). Porém, alguns autores sugerem que este ponto não existe em células não transformadas e indicam que células com conteúdo tetraploide de cromossomos mantêm os níveis relativos de expressão entre os genes, conservando as células viáveis (Uetake & Sluder, 2004; Wong & Stearns, 2005; Ohshima & Seyama, 2013). Estas células seriam então capazes de proliferar e formar mitoses multipolares que causam erros na segregação dos cromossomos e podem formar células aneuploides. Por outro lado, mesmo que células normais sejam capazes de detectar a presença de tetraploidia e ativar um ponto de checagem via p53, p21 e Rb, estes genes estão comumente mutados em células tumorais malignas e pré-neoplásicas, permitindo a proliferação das células tetraploides (Margolis *et al.*, 2003). Estes dados favorecem a inserção do estado tetraploide como um estado intermediário entre o diploide e o aneuploide, sendo então um processo relevante na tumorigênese e progressão tumoral (Shackney *et al.*, 1989; Storchova & Pellman, 2004).

As falhas na divisão celular que levam à formação de apenas uma célula-filha tetraploide são a saída da mitose sem ocorrência de divisão celular, chamada *mitotic slippage*, e a regressão da citocinese, que ocorre após a formação da ponte intercelular. A saída da célula durante a metáfase está principalmente relacionada com a retenção das células nesta

fase pela ativação do ponto de checagem do fuso mitótico ou pelo uso de drogas que não permitem que as células progridam para a anáfase. Células retidas por longos períodos em metáfase podem morrer com características muito semelhantes às de células em apoptose, ou podem sair da fase M formando uma única célula tetraploide e multinucleada (Huang *et al.*, 2010; Orth *et al.*, 2011; Galán-Malo *et al.*, 2012).

Já a regressão da citocinese é um processo que geralmente envolve duas etapas: a falha da divisão e a fusão das duas células-filhas. Isso porque em alguns casos pode somente haver a falha especificamente no processo de abscisão das membranas – a última etapa da citocinese – e não haver a regressão do processo de citocinese. Nestes casos as células-filhas permanecem ligadas pela ponte intercelular, mas não se fundem e não formam apenas uma célula-filha (El Amine *et al.*, 2013). Já a regressão da citocinese resulta na formação de uma célula geralmente com mais de um núcleo, característica frequente em células tumorais (Normand & King, 2011).

A citocinese ocorre após a telófase e termina com a abscisão das membranas, o que de fato separa as células-filhas. Diversos elementos e mecanismos que coordenam essa etapa da divisão já foram elucidados, embora muitos outros ainda estejam em discussão. Durante todo o período da citocinese a ponte intercelular, que conecta as duas células-filhas, está presente. Entretanto, a ponte intercelular e seus componentes passam por modificações morfológicas durante a citocinese, e assim podem ser distinguidas algumas etapas deste processo a partir do estado de maturação da ponte intercelular.

Para entender a formação da ponte intercelular é necessário considerar algumas etapas anteriores da mitose. Durante a metáfase, os fusos mitóticos podem ser classificados em três grupos: fusos astrais, ligados aos cinetócoros e interpolaes. As extremidades livres dos fusos interpolaes originadas em centrossomos distintos se sobrepõem na região equatorial da célula. Estes fusos têm papel importante durante a anáfase B, quando, ao deslizarem uns sobre os outros, distanciam os polos dos fusos, auxiliando a separação dos lotes de cromossomos. Na anáfase e na telófase estes fusos se localizam na região central da célula, chamada neste momento de zona intermediária. Nesta zona, junto aos microtúbulos, também se concentram algumas proteínas chamadas de passageiras cromossômicas, que durante a metáfase conectam-se aos cinetócoros e na anáfase e na telófase migram para a zona intermediária, enquanto algumas ainda são direcionadas à ponte intercelular durante a citocinese (Ruchaud *et al.*, 2007; Carmena, 2008). Ainda na zona intermediária, mas na região do córtex celular, estão localizadas actina e miosina, responsáveis pela formação e constrição do anel contrátil, e a GTPase RhoA, que regula a formação e o fechamento do anel. Outras

proteínas também se localizam nesta região equatorial próxima à membrana, como a Anillin (também conhecida como *actin binding protein*) e a quinase Citron (Gai *et al.*, 2011).

Durante a contração do anel a região entre as membranas na zona equatorial da célula é reduzida, e os fusos e outras proteínas presentes na zona intermediária são concentrados nesta região que dará origem à ponte intercelular. A região central da ponte passa a ser caracterizada pelo grande acúmulo de microtúbulos, vesículas membranosas e proteínas, passando a ser chamada de corpo intermediário. No centro do corpo intermediário ocorre uma protuberância da membrana, chamada de corpo central. O corpo central abriga estruturas proteicas que formam anéis próximos à membrana, enquanto outras estruturas, como os microtúbulos, atravessam o interior destes anéis. Porém, a densidade proteica nessa região é tão alta que quando as células são submetidas à imunofluorescência os anticorpos para estruturas localizadas no interior dos anéis não são capazes de atingir seus alvos. Portanto, através dessa técnica, o interior dos anéis é considerada uma região escura, e as proteínas que abrigam esta região só são visualizadas nas extremidades da zona escura, como se formassem duas estruturas paralelas. Já estudos utilizando essas proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes, como a GFP, indicam que elas estão presentes de maneira contínua, permeando a região interna aos anéis. Os anéis são formados essencialmente por MKLP1 (ou Kif23, *kinesin family member 23*), Cep55 (*centrosomal protein 55kDa*) e RacGAP (*Rac GTPase activating protein 1*), e as proteínas da zona escura são PRC1 (*protein regulator of cytokinesis*) e Kif4 (*kinesin family member 4*). A ausência de marcação de tubulina na zona escura provoca uma descontinuidade na ponte intercelular, chamada de intervalo (ou *gap*) central. Algumas proteínas ainda se localizam adjacentes às proteínas da zona escura, formando duas faixas em direção ao corpo das células-filhas, chamadas de zonas flangeadoras. São elas Aurora quinase B, Borealin, MKLP2 (ou Kif20A, *kinesin family member 20A*) e Cenp E (*centromere protein E*) (Eggert *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2012).

Nesse primeiro momento, quando a ponte intercelular está sendo formada, ocorrem diversas alterações na membrana plasmática desta região, uma vez que a ponte deve ser alongada e se tornar muito mais fina. A membrana passa então a fazer uma série de protrusões em forma de túbulos que depois são direcionadas ao corpo das células-filhas onde serão incorporadas. Essas protrusões contêm filamentos de Anillin e representantes da família das Septinas, e podem ser detectadas por microscopia confocal e por microscopia eletrônica de transmissão. Seu papel ainda vem sendo discutido, porém elas parecem ser muito importantes para o amadurecimento da ponte intercelular, além de se supor que tenham

influência na determinação do futuro sítio de abscisão das membranas (El Amine *et al.*, 2013; Renshaw *et al.*, 2014).

O aumento da expressão de Anillin leva ao aumento dos túbulos e protrusões da membrana, mas após a estabilização do corpo intermediário tardio essas protrusões cessam e a citocinese progride de maneira semelhante ao observado em células controle. A alteração da expressão de Anillin também muda a localização de Aurora B apenas nas fases de formação da ponte intercelular, mas não em etapas mais tardias, como, por exemplo, na exclusão de Aurora B dos sítios de constrição e abscisão (El Amine *et al.*, 2013).

Quando as protrusões cessam, fica caracterizado um novo estágio da ponte intercelular, que abriga o chamado corpo intermediário tardio. Nesse momento o diâmetro da ponte intercelular está em torno de 2 e 4 μm , e Anillin, Septin, RhoA e Citron se concentram majoritariamente em anéis no corpo central. Agora também formam-se anéis de Alix e TSG101 (*tumor susceptibility 101*) no corpo central, além das já citadas MKLP1 e Cep55. Conforme a citocinese progride, serão formados os sítios de constrição secundários, visualizados pela ausência de microtúbulos em dois pontos, a cerca de poucos micrômetros do intervalo central, um de cada lado deste. Estes sítios apresentam diâmetro reduzido e caracterizam uma nova etapa de constrição da ponte intercelular. Para eles também são direcionadas Anillin, Rho A, e Septin 9 e 11 (Elia *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Agromayor & Martin-Serrano, 2013).

Os sítios de constrição secundários também são alvo de estudos e, apesar de não completamente elucidado, seu papel parece ser determinante na localização do sítio de abscisão, etapa final da citocinese. Esta etapa final tem participação de complexos proteicos que atuam na fissão e fusão de membranas em diferentes processos celulares, entre eles a abscisão das membranas durante a citocinese. São eles os complexos ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), sendo que os ESCRT I, II e III participam ativamente da abscisão durante a citocinese e são formados principalmente por proteínas CHMP (*charged multivesicular body protein*) e TSG101, que interagem também com Alix. Alix e TSG101 se localizam no corpo central do corpo intermediário tardio, e irão se localizar no sítio de abscisão quando este estiver determinado. Nesse momento essas proteínas são detectadas em dois focos no corpo intermediário, um no corpo central e outro no sítio de abscisão. Os complexos ESCRT I e III também são direcionados ao corpo intermediário tardio, formando anéis no corpo central. ESCRT III posteriormente migra para o sítio de abscisão, sendo este o primeiro evento que indica sua formação. A atuação desse complexo na abscisão é crucial, uma vez que tem a capacidade de formar filamentos em hélice próximos da membrana que diminuem de diâmetro e aproximam as membranas até uma distância de 50 nm, momento

quando pode ocorrer o rompimento e fusão das membranas da célula, separando as células-filhas (Elia *et al.*, 2012; Agromayor & Martin-Serrano, 2013).

A depleção de CHMP4B, um elemento crucial do complexo ESCRT III, retarda a abscisão por muitas horas. Com isso, as células-filhas podem até entrar novamente em mitose sem que a abscisão tenha ocorrido, mas a formação de células multinucleadas não ocorre, evidenciando que a alteração apenas da maquinaria de abscisão não leva à regressão da citocinese e à formação de apenas uma célula-filha (Elia *et al.*, 2011; Carlton *et al.*, 2012; El Amine *et al.*, 2013). Já a ausência de Anillin leva à falha na citocinese após a localização aberrante de RhoA e miosina (Zhao & Fang, 2005), e a falha no recrutamento de Septin da ponte intercelular implica a não determinação do sítio de abscisão e consequente falha no recrutamento de CHMP4 para este sítio (Renshaw *et al.*, 2014). Dessa forma, hoje se discute sobre a determinação dos sítios de abscisão. A ação dos complexos ESCRT parece ser fundamental para a abscisão, mas a determinação dos sítios de abscisão parece ser orquestrada por Anillin, Septin e outras proteínas que participam ativamente das etapas anteriores à abscisão (Elia *et al.*, 2012; El Amine *et al.*, 2013; Renshaw *et al.*, 2014).

O sítio de abscisão geralmente é localizado próximo a um dos sítios de constrição secundários ou corresponde a um deles. A abscisão ocorre então, na maioria das vezes, em apenas uma região. Isso faz com que o corpo central e parte do corpo intermediário ainda fiquem ligados a uma das células-filhas. Essa estrutura pode ser incorporada ao citoplasma, sendo então chamado de corpo intermediário pós-mitótico. A visualização desta estrutura pode ser feita através da detecção de MKLP1 e Cep55, que formam anéis desde o início da citocinese e permanecem mesmo após a abscisão. A degradação desses corpos é realizada por autofagia, quando vesículas autofágicas envolvem essas estruturas e levam a sua degradação. Outro destino do corpo intermediário após a abscisão das membranas na citocinese é a sua liberação para o meio extracelular. Esse evento pode ocorrer após um novo processo de abscisão, que irá romper a membrana em outro sítio, resultando na liberação da ponte intercelular, que ainda poderá ser detectada no meio extracelular com o uso dos anticorpos anti-MKLP1 e anti-Cep55 (Chen *et al.*, 2012, 2013).

Recentemente foi descoberto que esses dois destinos dos corpos intermediários pós-mitóticos – incorporação pelas células-filhas ou liberação no ambiente extracelular – estão relacionados com a diferenciação celular e podem constituir características de células tumorais e de células-tronco. Quando comparadas células-tronco e células tumorais, a frequência de liberação dos corpos intermediários nas células-tronco é maior. Quando células-tronco são estimuladas a se diferenciar, a frequência de soltura dos corpos intermediários pós-

mitóticos é ainda maior, enquanto que a retenção dos corpos está relacionada com a manutenção da pluripotência. O mecanismo de soltura dessas estruturas depende de Alix, TSG101 e Cep55, indicando que o processo de abscisão neste caso deve ser muito semelhante ao que ocorre na citocinese (Ettinger *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013).

O processo de citocinese conforme aqui apresentado está esquematizado na Figura 2.

Figura 2. Esquema dos principais eventos relacionados à citocinese. Esquema da formação do corpo intermediário durante a citocinese, com as etapas de amadurecimento deste e localização de proteínas importantes para o processo. O anel do corpo central representado em rosa escuro desde a formação do corpo intermediário inicial é composto pelas mesmas proteínas durante toda a citocinese. Ao final da abscisão das membranas foram colocadas as possibilidades de liberação ou incorporação do corpo intermediário pós-mitótico (em rosa). Os microtúbulos estão representados em verde escuro e a cromatina em azul escuro. Cabeças de setas indicam detalhe e ampliação da estrutura.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Conforme apresentado, a aneuploidia é uma característica presente na maioria dos tumores, embora sua contribuição para a formação deles ainda não tenha sido completamente elucidada. Estudos recentes indicam que a aneuploidia tem um efeito paradoxal, podendo contribuir para a tumorigênese ou supressão dos tumores, dependendo do contexto genético das células e do grau da aneuploidia. A formação de células aneuploides pode ser resultado de diferentes erros durante a divisão mitótica. Tais anormalidades vêm sendo extensivamente estudadas com o intuito de se identificar os erros que levam à formação de células aneuploides viáveis e aqueles que geram células aneuploides que são encaminhadas para a morte celular.

Dessa forma, no presente trabalho, nos propusemos a estudar a formação de células aneuploides através da interferência na mitose por com o uso de dois agentes: a crisotila, uma fibra de amianto, e o a vincristina, um quimioterápico. Embora seus mecanismos de ação ainda sejam objeto de investigação, dados do nosso e de outros grupos de pesquisa indicam que esses dois agentes levam à formação de mitoses multipolares e células aneuploides. O estudo de como as células aneuploides se formam nestes dois sistemas pode elucidar mecanismos que envolvem alterações de ploidia e estão relacionados à tumorigênese ou supressão tumoral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do estudo da indução de células aneuploides pelos dois sistemas – tratamento com crisotila e com vincristina – optou-se pelo uso de linhagens de células humanas de origem epitelial. As linhagens selecionadas foram: linhagem HK2, de origem de carcinoma de pulmão humano, e RPE, linhagem normal proveniente de retina. De forma geral, as células foram tratadas com crisotila e vincristina independentemente, e foram avaliadas i) formação de células aneuploides através de citometria de fluxo e contagem dos cromossomos em preparações metafásicas, ii) alterações no ciclo celular e proliferação celular utilizando citometria de fluxo, iii) alterações na morfologia celular por observação das células ao microscopia de luz e confocal de varredura a laser após realização de imunofluorescência, com a quantificação de formação de células bi e multinucleadas e de mitoses multipolares, iv) relação entre o conteúdo de cromossomos e número de centrôssomos em mitoses bipolares e multipolares; v) origens e destinos de células bi e multinucleadas e de mitoses multipolares por *time-lapse*, vi) alterações nos centrôssomos que remetam a origem da amplificação centrôssômica nos dois sistemas, através da observação de células submetidas à

imunofluorescência ao microscópio confocal de varredura a laser, vii) análise da expressão de genes relacionados as alterações observadas após os tratamentos.

As metodologias específicas para realização dos experimentos estão aqui descritas:

Cultura de Células

Foram utilizadas duas linhagens celulares humanas de origem epitelial: células tumorais da linhagem HK2 (carcinoma de células não pequenas de pulmão), estabelecida em nosso laboratório, e células RPE (ATCC CRL-4000), provenientes de células da retina e imortalizadas pela introdução de hTERT. As duas linhagens 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 37°C, com alta umidade relativa (maior que 90%) e em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. As subculturas foram obtidas por tripsinização com solução de tripsina a 0,2% e EDTA a 0,02%.

Citometria de Fluxo

- *Análise ciclo celular:* O ciclo celular de células HK2 e RPE controle e tratadas foi analisado através da detecção do conteúdo de DNA das células após coloração da cromatina. Para tanto as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 800 rpm por 10 min, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. Após foram fixadas em metanol gelado diluído em PSB (3:1) por 1h a 4°C, lavadas com PBS e centrifugadas. Foram então ressuspensas em uma mistura de 200 µL de PBS + 20 µL de RNase (10mg/mL) + 20 µL de iodeto de propídio. Após 1 h a leitura foi feita utilizando o sistema Guava (GE), sendo que foram analisadas 5.000 células a cada leitura em três experimentos independentes.

- *Análise de proliferação por incorporação de BrdU:* A proliferação de células HK2 e RPE controle e tratadas foi analisado através da detecção da incorporação de BrdU. Foi feito uso do Kit BrdU FITC Flow (BD), segundo o protocolo do fabricante. De forma geral, as células foram expostas a um pulso de BrdU 0,5 uM diluído em meio de cultura por 30 min, e foram tripsinizadas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, lavadas, fixadas, e permeabilizadas, utilizando-se as soluções do kit. Após as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU acoplado ao anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo FITC, e o DNA foi corado por corante fluorescente. As células foram analisadas ao citômetro de fluxo, que fez a distinção das células positivas e negativas para incorporação de BrdU, além da análise do conteúdo de DNA.

Preparação Metafásica

O número de cromossomos em células em divisão mitótica foi analisado a partir de preparações metafásicas. Células HK2 e RPE controle e tratadas tiveram vincristina 0,01% adicionada ao meio de cultura por 1,5 hora, tempo suficiente para aumento da população de células em metáfase. Após as células foram lavadas com PBS, tratadas com 1 mL de tripsina e a suspensão de células foi centrifugada a 1.000 rpm por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 10 mL de solução hipotônica (4 mL KCl 0,072M pH 6,8, 6 mL de citrato de sódio 1%), e mantidas em estufa a 37°C por 20 minutos. Novamente o frasco foi submetido à centrifugação, o sobrenadante desprezado e as células fixadas com 10 mL de metanol e ácido acético (3:1). Após as células foram centrifugadas, ressuspensas em 1mL de fixador e pingadas em lâminas de vidro.

Bandeamento G

As lâminas com as células obtidas pela preparação metafásica foram guardadas por uma noite, e depois foram envelhecidas no microondas por 5 minutos. Após esfriarem foram colocadas em tampão fosfato por 3 minutos a 60°C. Depois foram lavadas com água e coradas com corante Wright (Merck) diluído em tampão fosfato (3:1). Depois de lavadas com água, as lâminas foram observadas ao microscópio de luz AxioVert (Carl Zeiss) com uso das objetivas de 40X e 100X, e as imagens foram adquiridas pelo software AxioCam (Carl Zeiss).

Contagem dos Cromossomos

As imagens de mitoses obtidas após observação das preparações metafásicas foram analisadas pelo software Image J, que possibilita a seleção manual de objetos na imagem e fornece o número total de objetos selecionados – no caso cromossomos. Foram realizados três experimentos independentes, e em cada um deles foram analisadas 100 metáfases de células HK2 e 50 de células RPE controle, e 100 metáfases de células HK2 e 50 de células RPE em cada tratamento.

Imunofluorescência

Para imunofluorescência as células foram subcultivadas sobre lamínulas redondas de vidro de 13 mm em placas de Petri de 35 ou 60 mm. As células foram fixadas em formoldeído 3,7% por 30 minutos, ou em metanol gelado por 10 minutos ou em acetona gelada por 5 minutos, dependendo do anticorpo a ser utilizado. Quando fixadas em metanol ou acetona as células foram reidratadas em PBS por 20 minutos logo após a fixação. Após 3 lavagens com PBS as células foram tratadas com PBSAT (solução de BSA 1% em PBS e Triton X-100 0,5%)

durante 30 minutos. As células foram lavadas novamente e 25 µl do anticorpo primário foram colocados sobre cada lamínula e deixados em contato com as células por 1 h em câmara úmida. As lamínulas foram lavadas 3X com PBSAT, e 25 µl do anticorpo secundário acoplado a fluorocromo foram colocados sobre a lamínula por 45 min, sendo o material mantido em câmara úmida e escura durante este período. Após as lamínulas foram lavadas novamente, coradas com DAPI (1000X diluído em água) por 1 minuto ou iodeto propídeo por 30 min, montadas em lâminas de vidro com 5 µl de *anti-fading* (Vecta Shield) e seladas com esmalte.

Os anticorpos utilizados foram:

ANTICORPO	ESTRUTURA DETECTADA	DILUIÇÃO
Anti-pericentrina (Abcam ab4448)	Matriz pericentriolar	1:500
Anti-centrin (Millipore 04-1624)	Centríolos	1:10.000
Anti-cenexin (Protein Tech 12058-1-AP)	Ancoradouros presentes no centríolo-mãe	1:200
Anti-centrobin (Abcam ab70448)	Centríolos recém formados	1:200
Anti-γ-tubulina (Sigma T5192)	Anéis de γ tubulina presentes nos centrossomos	1:100
Anti-α-tubulina (Sigma)	α tubulina presente nos microtúbulos	1:200
Anti-Hec1 (Abcam ab3613)	Cinetócoros	1:50
Soro Crest (Antibodies Inc. 15-234)	Cinetócoros	1:50
Anti-aurora A (Abcam ab13824)	Aurora A presente nos cinetócoros e centrossomos	1:200

Análise das células submetidas à imunofluorescência e aquisição das imagens

As células submetidas à imunofluorescência foram observadas ao microscópio de fluorescência com objetivas de 40X e 100X. As contagens de multinucleação, micronucleação, apoptose e presença de mitoses multipolares foram realizadas a partir de células com microtúbulos, centrossomos e DNA corados, com uso de objetivas de 40X. A presença de amplificação centrossômica foi analisada e quantificada a partir de células com centríolos e DNA evidenciados, com uso de objetiva de 100X. A análise da localização das proteínas presentes na citocinese foi realizada também com uso de objetivas de 100X. Todas as contagens foram feitas em triplicatas a partir de lâminas de experimentos independentes. Para contagem de micronúcleos, apoptose, multinucleação e índice mitótico foram analisadas

1.000 células de cada lâmina, e para contagem de mitoses bipolares e multipolares foram analisadas de 100 a 200 mitoses de cada lâmina.

Algumas imagens foram adquiridas ao microscópio de fluorescência da Carl Zeiss com platina e eixo Z motorizado com auxílio do software Metamorph, e analisadas pelo próprio software. As imagens que necessitavam de maior detalhe foram adquiridas ao microscópio confocal LSM510 e LSM780 (ambos Carl Zeiss), com uso de objetivas de imersão de 63X, 100X ou 150X, e intervalo entre as fatias óticas de 0,2 μm a 0,5 μm . A análise das imagens foi feita pelo software Zen Blue e LSM Image Browser (Carl Zeiss), ou pelo Image J.

Contagem dos Cinetócoros

A relação entre o número de cromossomos e centrosomos foi investigada a partir da contagem do número destes em mitoses de células controle e tratadas com vincristina ou crisotila. O número de cromossomos foi inferido a partir da contagem do número de cinetócoros ou centrômeros em células mitóticas. Para tanto células RPE e HK2 foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos polos dos fusos (pelo uso dos anticorpos anti- β , α , ou γ -tubulina), cinetócoros ou centrômeros (pelo uso dos anticorpos anti-Hec1 ou soro Crest) e cromatina. Foram adquiridas imagens ao microscópio confocal LSM510 e LSM780 (ambos Carl Zeiss), com uso de objetiva de 100X com imersão a óleo e intervalo entre as fatias óticas de 0,2 μm , de mitoses bipolares e multipolares. As imagens foram reconstruídas com uso do software Imaris (Bitplane), sendo que foi possível detectar cada cinetócoro ou centrômero presente na imagem e quantificá-los. As imagens de células HK2, que apresentam um número muito elevado de cromossomos, foram primeiramente submetidas ao processo de *deconvolution* pelo software AutoQuantX (Media Cybernetics), processo matemático que tem como objetivo eliminar distorções da imagem geradas pela aquisição, resultando em imagens mais precisas.

***Time-Lapse* – Microscopia em tempo real**

Os experimentos de time-lapse foram realizados em dois equipamentos diferentes:

- *Biostation (Nikon)*: este consiste em um microscópio dedicado a aquisição e imagens de células vivas, sendo um sistema fechado e totalmente motorizado. As células foram semeadas em placas de 35 mm com fundo de vidro (WillCo Wells BV e MatTek Corporation), e as placas foram alocadas na incubadora do microscópio, que mantém todo o sistema a 37°C e permite a injeção de CO₂, mantendo a atmosfera com 5% deste gás. O software de controle do equipamento permite que seja escolhido o aumento da objetiva, o tempo de exposição tanto

para a fluorescência quanto para luz branca, altura do Z e distância entre as fatias, campos que serão observados, intervalos entre a aquisição das imagens e tempo total do experimento. Os experimentos foram realizados com uso da objetiva de 40X, Z de aproximadamente 8 μm com intervalo entre as fatias de 1 μm , intervalo entre as imagens de 10 a 16 minutos, e tempo total de até 24 h. O meio de cultura utilizado durante o experimento foi DMEM F12 com 10% de SFB sem *Phenol Red*.

- *Spinning Disk (Carl Zeiss)*: este consiste em um microscópio invertido motorizado, com sistema de *spinning disk* acoplado, e software *Metamorph* para controle do microscópio. Foi acoplado a este microscópio um sistema de controle de temperatura, que aquece a objetiva, platina e a câmara onde as lamínulas com as células são montadas. Para os experimentos as células foram semeadas sobre lamínulas de 12 mm de diâmetro, onde cresceram aderidas. No momento no início da observação por time-lapse, as lamínulas foram montadas em câmaras metálicas com meio de cultura, próprias para serem utilizadas no sistema de aquecimento acoplado ao microscópio. Cada câmara possui até 4 compartimentos para lamínula, e assim ate 4 lamínulas foram observadas em cada experimento. O software permite que sejam ajustados os campos para aquisição das imagens, tempo de exposição, altura do eixo Z e intervalo entre as fatias óticas, intervalo entre a aquisição das imagens e tempo total do experimento. Os experimentos foram realizados com objetiva de 63X com imersão em óleo, Z de cerca de 8 μm , intervalo entre as fatias de 0,5 μm , intervalo entre as imagens de 10 a 16 minutos, e tempo total de experimento de 12 a 36 h. O meio de cultura utilizado para realização destes experimentos foi DMEM F-12 com 10% de SFB sem *Phenol Red*.

Extração de RNA, síntese do cDNA e PCR quantitativo (qPCR)

Para extração de RNA total das células foi utilizado o *Charge Switch® Total RNA Cell Kit* (Invitrogen), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, e a quantificação foi feita utilizando o aparelho NanoDrop ND1000 Spectrophotometer. Para a síntese do cDNA a partir do RNA total, foram realizadas reações de RT-PCR com o Kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), sob as seguintes condições: 70°C por 5 minutos, 25°C por 5 minutos e 42°C por 60 minutos. Para a análise do perfil de expressão foram realizadas reações de RT-PCR em tempo real com o kit AgPath-ID One-Step RT-PCR (Ambion) e Sybr-Green (Invitrogen) em um aparelho da Corbett Research modelo Rotor Gene 6000 Real-Time Cycler. As condições dos qRT-PCR foram 45°C por 10 min; 95°C por 15 min, 40 ciclos [95°C por 15 seg; temperatura de anelamento por 20 seg; 72°C por 30 seg], seguindo então as temperaturas de *melting* escolhidas. Os pares de *primers* utilizados estão descritos no materiais e métodos de cada

capítulo, assim como a temperatura de anelamento. Os produtos amplificados possuem no máximo 250 bases, como sugerido por Bustin (2002). A normalização foi feita por massa de RNA total, sendo que o controle sempre foi considerado como 1, e a expressão dos grupos tratados foi relativa ao controle (Bustin, 2000, 2002). Para cada par de *primers* foram realizados três experimentos independentes (com RNA de experimentos independentes), e cada experimento foi realizado em triplicata. Foi considerada alteração nos níveis de expressão quando a variação foi maior ou igual a 0,250 e considerada estatisticamente significativa por teste t-Student. Para apresentação dos gráficos foi escolhido o experimento que melhor representou os três experimentos independentes.

Análise estatística

A análise estatística dos dados foi feita por pelo teste χ^2 de tendência ou pelo teste t-Student, tomando-se como referência o grupo controle e em alguns casos, o tratamento no tempo anterior. Em todas as análises o nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2013). Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol.* 23, 433–441.

El Amine, N., Kechad, A., Jananji, S., and Hickson, G. R. X. (2013). Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *J. Cell Biol.* 203, 487–504.

Andreassen, P. R., Martineau, S. N., and Margolis, R. L. (1996). Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat. Res.* 372, 181–194.

Azimzadeh, J., and Marshall, W. F. (2010). Building the centriole. *Curr. Biol.* 20, R816–25.

Basto, R., Brunk, K., Vinadogrova, T., Peel, N., Franz, A., Khodjakov, A., and Raff, J. W. (2008). Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* 133, 1032–1042.

Blagden, S. P., and Glover, D. M. (2003). Polar expeditions--provisioning the centrosome for mitosis. *Nat. Cell Biol.* 5, 505–511.

Borojerdi, J. P., Ming, J., Cooch, C., Ward, Y., Semino-Mora, C., Yu, M., Braun, H. M., Taylor, B. J., Poirier, M. C., and Olivero, O. a (2009). Centrosomal amplification and aneuploidy induced by the antiretroviral drug AZT in hamster and human cells. *Mutat. Res.* 665, 67–74.

Brito, D. a, Gouveia, S. M., and Bettencourt-Dias, M. (2012). Deconstructing the centriole: structure and number control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 4–13.

- Brito, D. a, and Rieder, C. L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* *16*, 1194–1200.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* *25*, 169–193.
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* *29*, 23–39.
- Carlton, J. G., Caballe, A., Agromayor, M., and Kloc, M. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science* (80-.). *336*, 220–225.
- Carmena, M. (2008). Cytokinesis: the final stop for the chromosomal passengers. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 367–370.
- Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Branco, P., Tavares-Cadete, F., Rodrigues-Martins, A., Pereira-Leal, J. B., and Bettencourt-Dias, M. (2010). Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J. Cell Sci.* *123*, 1414–1426.
- Chandhok, N. S., and Pellman, D. (2009). A little CIN may cost a lot: revisiting aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 74–81.
- Chen, C.-T., Ettinger, A. W., Huttner, W. B., and Doxsey, S. J. (2013). Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies. *Trends Cell Biol.* *23*, 118–128.
- Chen, C.-T., Hehnly, H., and Doxsey, S. J. (2012). Orchestrating vesicle transport, ESCRTs and kinase surveillance during abscission. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 483–488.
- Cimini, D., and Degrossi, F. (2005). Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol.* *15*, 442–451.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Haploinsufficiency, B., Yang, Y., Xu, M., and Rao, C. V (2004). Slippage of Mitotic Arrest and Enhanced Tumor Development in Mice with BubR1 Haploinsufficiency. *Cancer Res* *64*, 440–445.
- Dammermann, A., Müller-Reichert, T., Pelletier, L., Habermann, B., Desai, A., and Oegema, K. (2004). Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. *Dev. Cell* *7*, 815–829.
- Delaval, B., and Doxsey, S. J. (2010). Pericentrin in cellular function and disease. *J. Cell Biol.* *188*, 181–190.
- Doxsey, S. J. (2001). Centrosomes as command centres for cellular control. *Nat. Cell Biol.* *3*, 105–108.
- Doxsey, S., Zimmerman, W., and Mikule, K. (2005). Centrosome control of the cell cycle. *Trends Cell Biol.* *15*, 303–311.

Duensing, S., Duensing, A., Crum, C. P., and Mu, K. (2001). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein-induced Abnormal Centrosome Synthesis Is an Early Event in the Evolving Malignant Phenotype. *Cancer Res.* 61, 2356–2360.

Duesberg, P., and Li, R. (2003). Multistep Carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2, 202–210.

Duesberg, P., Li, R., Fabarius, A., and Hehlmann, R. (2006). Aneuploidy and Cancer: From Correlation to Causation. *Contrib Microbiol* 13, 2006.

Duesberg, P., and Rasnick, D. (2000). Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil. Cytoskeleton* 47, 81–107.

Eggert, U. S., Mitchison, T. J., and Field, C. M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 543–566.

Elia, N., Fabrikant, G., Kozlov, M. M., and Lippincott-Schwartz, J. (2012). Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys. J.* 102, 2309–2320.

Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., and Lippincott-schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission.

Ettinger, A. W., Wilsch-Bräuninger, M., Marzesco, A.-M., Bickle, M., Lohmann, A., Maliga, Z., Karbanová, J., Corbeil, D., Hyman, A. a, and Huttner, W. B. (2011). Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat. Commun.* 2, 503.

Fukasawa, K. (2005). Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. *Cancer Lett.* 230, 6–19.

Gai, M., Camera, P., Dema, A., Bianchi, F., Berto, G., Scarpa, E., Germena, G., and Di Cunto, F. (2011). Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Mol. Biol. Cell* 22, 3768–3778.

Galán-Malo, P., Vela, L., Gonzalo, O., Calvo-Sanjuán, R., Gracia-Fleta, L., Naval, J., and Marzo, I. (2012). Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 384–393.

Ganem, N. J., Godinho, S. a, and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278–282.

Ganem, N. J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 157–162.

Gao, C., Furge, K., Koeman, J., Dykema, K., Su, Y., Cutler, M. Lou, Werts, A., Haak, P., and Vande Woude, G. F. (2007). Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8995–9000.

Gordon, D. J., Resio, B., and Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 189–203.

Gudi, R., Zou, C., Li, J., and Gao, Q. (2011). Centrobin-tubulin interaction is required for centriole elongation and stability. *J. Cell Biol.* *193*, 711–725.

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* *400*, 464–468.

Hanahan, D., Weinberg, R. A., and Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hinchcliffe, E. H., and Sluder, G. (2001). “ It Takes Two to Tango ”: understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.* *15*, 1167–1181.

Holland, A. J. *et al.* (2012). Polo-like kinase 4 controls centriole duplication but does not directly regulate cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1838–1845.

Holland, A. J., and Cleveland, D. W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 478–487.

Holland, A. J., and Cleveland, D. W. (2012). Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep.* *13*, 501–514.

Hu, C.-K., Coughlin, M., and Mitchison, T. J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1024–1034.

Huang, H.-C., Mitchison, T. J., and Shi, J. (2010). Stochastic competition between mechanistically independent slippage and death pathways determines cell fate during mitotic arrest. *PLoS One* *5*, e15724.

Jin, F., and Wang, Y. (2013). The signaling network that silences the spindle assembly checkpoint upon the establishment of chromosome bipolar attachment. *PNAS* *110*, 21036–21041.

Kalitsis, P., Fowler, K. J., Griffiths, B., Earle, E., Chow, C. W., Jamsen, K., and Choo, K. H. A. (2005). Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice. *Genes. Chromosomes Cancer* *44*, 29–36.

Kaneko, Y., and Knudson, G. (2000). Mechanism and relevance of ploidy in neuroblastoma. *Genes. Chromosomes Cancer* *29*, 89–95.

Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* *150*, 975–988.

Kolodner, R. D., Cleveland, D. W., and Putnam, C. D. (2011). Aneuploidy drives a mutator phenotype in cancer. *Science* *333*, 942–943.

Korzeniewski, N., Treat, B., and Duensing, S. (2011). The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol. Cancer* 10, 61.

Kuriyama, R., Terada, Y., Lee, K. S., and Wang, C. L. C. (2007). Centrosome replication in hydroxyurea-arrested CHO cells expressing GFP-tagged centrin2. *J. Cell Sci.* 120, 2444–2453.

Leidel, S., and Gönczy, P. (2003). SAS-4 is essential for centrosome duplication in *C. elegans* and is recruited to daughter centrioles once per cell cycle. *Dev. Cell* 4, 431–439.

Lengauer, C., Kinzler, K., and Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 386, 623–627.

Levine, D. S., Sanchez, C. a, Rabinovitch, P. S., and Reid, B. J. (1991). Formation of the tetraploid intermediate is associated with the development of cells with more than four centrioles in the elastase-simian virus 40 tumor antigen transgenic mouse model of pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6427–6431.

Li, R., Sonik, a, Stindl, R., Rasnick, D., and Duesberg, P. (2000). Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 3236–3241.

Loncarek, J., Hergert, P., Magidson, V., and Khodjakov, A. (2008). Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.* 10, 322–328.

Machado-Santelli, G.M., Mori, L., Pereira, C.A. (1994). Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. *Anal. Cell Pathol.* 1994 7:321-34.

Margolis, R. L., Lohez, O. D., and Andreassen, P. R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J. Cell. Biochem.* 88, 673–683.

Matos, I., and Maiato, H. (2011). Prevention and correction mechanisms behind anaphase synchrony: implications for the genesis of aneuploidy. *Cytogenet. Genome Res.* 133, 243–253.

Matsumoto, Y., and Maller, J. L. (2004). A centrosomal localization signal in cyclin E required for Cdk2-independent S phase entry. *Science* 306, 885–888.

May, K. M., and Hardwick, K. G. (2006). The spindle checkpoint. *J. Cell Sci.* 119, 4139–4142.

McClelland, S. E., Burrell, R. a, and Swanton, C. (2009). Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy. *Cell Cycle* 8, 3262–3266.

Mitelman, F., Johansson, B., Mertens, F.E.(2012). Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

Musacchio, A., and Hardwick, K. G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 731–741.

Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393.

- Nevins, J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 699–703.
- Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer pregression? *Nat. Rev. Genet.* *3*, 815–815.
- Normand, G., and King, R. W. (2011). Understanding Cytokinesis Failure. *Adv Exp Med Biol* *2010*, 27–55.
- Ohshima, S., and Seyama, A. (2013). Establishment of proliferative tetraploid cells from normal human fibroblasts. *Front. Oncol.* *3*, 198.
- Orth, J. D., Kohler, R. H., Foijer, F., Sorger, P. K., Weissleder, R., and Mitchison, T. J. (2011). Analysis of mitosis and antimitotic drug responses in tumors by in vivo microscopy and single-cell pharmacodynamics. *Cancer Res.* *71*, 4608–4616.
- Pannu, V., Rida, P. C. G., Ogden, a, Clewley, R., Cheng, a, Karna, P., Lopus, M., Mishra, R. C., Zhou, J., and Aneja, R. (2012). Induction of robust de novo centrosome amplification, high-grade spindle multipolarity and metaphase catastrophe: a novel chemotherapeutic approach. *Cell Death Dis.* *3*, e346.
- Peloponese, J.-M., Haller, K., Miyazato, A., and Jeang, K.-T. (2005). Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18974–18979.
- Pietenpol, J. a, and Stewart, Z. a (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* *181-182*, 475–481.
- Pihan, G. A., Purohit, A., and Wallace, J. (2001). Centrosome Defects Can Account for Cellular and Genetic Changes That Characterize Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* *61*, 2212–2219.
- Rao, C. V, Yang, Y., Swamy, M. V, Liu, T., Fang, Y., Mahmood, R., Jhanwar-uniyal, M., and Dai, W. (2005). Colonic tumorigenesis in BubR1/ApcMin/ compound mutant mice is linked to premature separation of sister chromatids and enhanced genomic instability. *PNAS* *102*, 4365–4370.
- Rehen, S. K., McConnell, M. J., Kaushal, D., Kingsbury, M. a, Yang, a H., and Chun, J. (2001). Chromosomal variation in neurons of the developing and adult mammalian nervous system. *PNAS* *98*, 13361–13366.
- Renshaw, M. J., Liu, J., Lavoie, B. D., and Wilde, A. (2014). Anillin-dependent organization of septin filaments promotes intercellular bridge elongation and Chmp4B targeting to the abscission site. *Open Biol.* *4*, 1–15.
- Ricke, R. M., and van Deursen, J. M. (2013). Aneuploidy in health, disease, and aging. *J. Cell Biol.* *201*, 11–21.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W. C. (2007). The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* *131*, 230–231.

- Rusan, N. M., and Peifer, M. (2008). Original CIN: reviewing roles for APC in chromosome instability. *J. Cell Biol.* *181*, 719–726.
- Salmon, E. D., Cimini, D., Cameron, L. a, and DeLuca, J. G. (2005). Merotelic kinetochores in mammalian tissue cells. *Philos. Trans. R. Soc.* *360*, 553–568.
- Schöckel, L., Möckel, M., Mayer, B., Boos, D., and Stemmann, O. (2011). Cleavage of cohesin rings coordinates the separation of centrioles and chromatids. *Nat. Cell Biol.* *13*, 966–972.
- Shackney, S. E., Smith, C. A., Miller, B. W., Burholt, D. R., Murtha, K., Giles, H., Ketterer, D. M., and Pollice, A. A. (1989). Model for the Genetic Evolution of Human Solid Tumors. *Cancer Res.* *49*, 3344–3354.
- Sheltzer, J. M., and Amon, A. (2011). The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. *Trends Genet.* *27*, 446–453.
- Silkworth, W. T., Nardi, I. K., Scholl, L. M., and Cimini, D. (2009). Multipolar spindle pole coalescence is a major source of kinetochore mis-attachment and chromosome mis-segregation in cancer cells. *PLoS One* *4*, e6564.
- Storchova, Z., and Kuffer, C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J. Cell Sci.* *121*, 3859–3866.
- Storchova, Z., and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 45–54.
- Strong, L. C. (1949). A new theory of mutation and the origin of cancer. *Yale J Biol Med* *21*, 293–299.
- Swanton, C. *et al.* (2009). Chromosomal instability determines taxane response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8671–8676.
- Tang, C.-J. C., Lin, S.-Y., Hsu, W.-B., Lin, Y.-N., Wu, C.-T., Lin, Y.-C., Chang, C.-W., Wu, K.-S., and Tang, T. K. (2011). The human microcephaly protein STIL interacts with CPAP and is required for procentriole formation. *EMBO J.* *30*, 4790–4804.
- Thein, K. H., Kleylein-Sohn, J., Nigg, E. a, and Gruneberg, U. (2007). Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity. *J. Cell Biol.* *178*, 345–354.
- Thompson, S. L., Bakhoum, S. F., and Compton, D. a (2010). Mechanisms of chromosomal instability. *Curr. Biol.* *20*, R285–95.
- Torres, E. M., Sokolsky, T., Tucker, C. M., Chan, L. Y., Boselli, M., Dunham, M. J., and Amon, A. (2007). Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* *317*, 916–924.
- Tsou, M.-F. B., Wang, W.-J., George, K. a, Uryu, K., Stearns, T., and Jallepalli, P. V (2009). Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Dev. Cell* *17*, 344–354.

Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a “tetraploidy checkpoint”. *J. Cell Biol.* *165*, 609–615.

Wang, X., Yang, Y., Duan, Q., Jiang, N., Huang, Y., Darzynkiewicz, Z., and Dai, W. (2008). sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev. Cell* *14*, 331–341.

Weaver, B. a a, Silk, A. D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P., and Cleveland, D. W. (2007). Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor. *Cancer Cell* *11*, 25–36.

Weaver, B. a, and Cleveland, D. W. (2008). The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* *14*, 431–433.

Weaver, B., and Cleveland, D. W. (2009). The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. *J. Cell Biol.* *9*, 591–604.

Williams, B. R., Prabhu, V. R., Hunter, K. E., Glazier, C. M., Whittaker, C. A., Housman, D. E., and Amon, A. (2008). Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells. *Science* (80-.). *322*, 703–709.

Wong, C., and Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol.* *6*, 6.

Zhao, W.-M., and Fang, G. (2005). Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 33516–33524.

Zimonjic, D., Brooks, M. W., Popescu, N., Weinberg, R. A., and Hahn, W. C. (2001). Derivation of Human Tumor Cells in Vitro without Widespread Genomic Instability. *Cancer Res.* *61*, 8838–8844.

Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V., and Gao, Q. (2005). Centrobin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *J. Cell Biol.* *171*, 437–445.

Capítulo 2: Alterações em células normais e tumorais expostas à crisotila

RESUMO

Crisotila é um tipo de fibra de amianto encontrada naturalmente na crosta terrestre. O uso dessas fibras está sendo banido devido a sua relação com o desenvolvimento de doenças no trato respiratório como fibroses e carcinomas de pulmão. Contudo, a crisotila ainda pode ser utilizada em diversos países, incluindo o Brasil, já que ainda não foi estabelecida uma forte correlação entre a exposição a esse tipo de fibra e o aparecimento das doenças. Atualmente estudos tentam elucidar as alterações causadas em células pelas fibras que podem estar relacionadas ao desenvolvimento das doenças. Sabe-se que quando internalizadas as fibras de crisotila levam à produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo, danos ao DNA, micronúcleos, amplificação centrossômica, mitoses multipolares e formação de células aneuploides. O objetivo do presente estudo foi elucidar os eventos que levam à formação de células aneuploides em células humanas normais e tumorais em cultura, investigando os processos relacionados à amplificação centrossômica, formação de células bi e multinucleadas e mitoses multipolares. Após a análise de diversos componentes dos centrossomos e do número de cromossomos foi possível estabelecer que o principal mecanismo causador da amplificação centrossômica em células normais e tumorais foi a falha e regressão da citocinese, com consequente formação de uma célula tetraploide, geralmente com mais de um núcleo e com o dobro de centrossomos. O estudo da citocinese em células vivas e fixadas revelou que as fibras tendem a se localizar na ponte intercelular durante a citocinese, e que o tratamento levou à alteração na localização de proteínas fundamentais ao estabelecimento da ponte intercelular e dos sítios de abscisão das membranas, como Aurora B, Septin 9, Anillin e Alix. Com essas alterações, os sítios de constrição secundários e os sítios de abscisão não se formaram, comprometendo a separação das células filhas. Além disso, a expressão de genes relacionados à citocinese foi alterada após o tratamento com crisotila. As células tetraploides formadas foram capazes de entrar em fase S e proliferar, originando mitoses multipolares que por sua vez culminaram na formação de duas ou três células filhas possivelmente aneuploides. Neste momento foi verificada uma diferença entre células normais e tumorais: células tumorais aneuploides foram capazes de se proliferar, já células normais aneuploides não. Outras alterações em células expostas às fibras que podem estar relacionadas à sua sobrevivência e proliferação foram encontradas. As fibras quando internalizadas tendem a se associar a vesículas autofágicas, e alguns genes da maquinaria autofágica tiveram sua expressão aumentada.

ABSTRACT

Asbestos fibers are minerals naturally found on earth's crust. They can be divided into two sub-groups: serpentines, represented by chrysotile fibers, and amphiboles, represented by six different types of fibers. The use of asbestos has been banished from the market due to its relation to lung diseases development, such as fibrosis and lung carcinomas. However, chrysotile fibers have been considered safe due to the lack of strong association between chrysotile exposure and diseases, and they can still be marketed in many countries, such as Brazil. Many efforts have been done to elucidate the cellular alterations caused by chrysotile fibers that can related to lung diseases, and we already know that chrysotile fibers lead to oxidative stress, DNA damage, centrosome amplification, multipolar mitosis and aneuploid cell formation. The present study aimed to investigate aneuploid cell formation in human normal and cancer cultured cells, focusing on processes related to centrosome amplification, multinucleated cell formation and multipolar mitosis. The analysis of centrosome and chromosome numbers in chrysotile-treated cells suggested that the main process responsible for centrosome amplification is the cytokinesis failure, which results in one tetraploid daughter cell with two centrosomes and more than one nucleus. Cytokinesis was investigated in live and fixed cells, and it was observed that chrysotile fibers were usually located in the intercellular bridge during this process. Proteins associated to cytokinesis, required mainly for intercellular bridge establishment and abscission sites determination, such as Aurora B, Septin 9, Anillin and Alix, showed altered location after fiber exposure, and some genes involved with cytokinesis showed altered expression. Cytokinesis failure generated one tetraploid daughter cell with more than one nucleus. In both cell lineages, these daughter cells were able to entry cell cycle and generated multipolar mitosis, resulting in one, two or three daughter cells probably carrying an aneuploid karyotype. At this moment it was observed a difference between normal and tumor cells: aneuploid tumor cells were able to proliferate, while aneuploid normal cells did not. Others cellular alterations observed after fiber exposure could also be involved with its proliferation and survival. For example, fibers when internalized are associated to autophagy vesicles, and genes related to autophagy machinery had altered expression after the cells treatment.

INTRODUÇÃO

O amianto – um breve histórico

Amianto ou asbesto é o nome dado a seis tipos de fibras minerais encontradas naturalmente na crosta terrestre, os quais são divididos em dois grandes grupos: o grupo dos anfibólios, caracterizado por fibras duras e pontiagudas, como a crocidolita e amosita, e o grupo das serpentinas, que são fibras maleáveis, sedosas e com mais fina secção transversal, representadas pela crisotila (Fig. 1 A-E). A crisotila é composta por átomos de magnésio, silício, hidrogênio e oxigênio, que se organizam inicialmente em folhas que se curvam e formam estruturas fibrosas, conforme pode ser observado em cortes transversais das fibras (Fig. 1 F).

Os asbestos de modo geral apresentam propriedades físicas interessantes para sua utilização pelo homem, como a grande resistência a tração, altas temperaturas e exposição a ácidos e, quando combinados com outros materiais, agregam estas propriedades, tornando-os mais resistentes. Assim, os diferentes tipos de amianto vêm sendo utilizados pelo homem desde a pré-história, mas foi a partir do século XVII que se iniciou seu uso em larga escala pelas indústrias, incorporando os asbestos a mais de 3.000 produtos, entre eles caixas d'água, telhas, cimento, freios de automóveis e isolantes térmicos. O uso dos asbestos pelas indústrias provocou a exposição de um grande número de trabalhadores às fibras, desde o momento da sua retirada do solo até a obtenção dos produtos finais.

Figura 1. Os tipos de amianto e a estrutura da crisotila. A e B) Os diferentes tipos de amianto, como a crisotila (A) e crocidolita (B), são encontrados em rochas na crosta terrestre. **C, D e E)** Após a extração das fibras, elas são processadas até que atinjam grau de pureza e forma adequada para serem combinadas a outros materiais, como representadas aqui a crisotila (C), amosita (D) e crocidolita (E); **F)** A crisotila apresenta em sua composição magnésio e silício, que se arranjam em folhas que por sua vez se curvam formando as fibras. Fonte: A: <https://www.flickr.com/photos/44596047@N00/41989510> B: <http://asbestosattorney.yolasite.com/types.php>; C, D e E: www.athena-env.co.uk; F: Bernstein *et al.*, 2005.

Com o maior número de trabalhadores expostos às fibras ficaram mais evidentes os danos que elas podem causar à saúde humana: diversos trabalhadores apresentaram doenças principalmente no trato respiratório, como fibroses, silicoses, carcinomas pulmonares, e também mesoteliomas de pleura (Mossman & Churg, 1998; Berman & Crump, 2008; Kamp, 2009). Os tipos de amianto mais utilizados no início da sua exploração em larga escala eram do grupo dos anfíbolios, os quais foram gradualmente banidos do mercado a partir da década de 1960, quando a relação entre a exposição às fibras e o aparecimento de doenças foi estabelecida. Eles deram lugar ao uso exclusivo da crisotila, pois a relação entre a exposição às fibras de crisotila e a formação de tumores não foi considerada forte, e com a regulamentação do uso das fibras e implementação das leis que garantem a segurança dos trabalhadores imaginou-se que o uso das fibras de crisotila poderia ser considerado seguro (Cullen, 1998; Bernstein & Hoskins, 2006; Pierce *et al.*, 2008).

Hoje os estudos se mostram conflitantes em relação ao uso da crisotila, que já foi banido em muitos países. A exploração dessa fibra continua permitida no Brasil, a ponto de sermos o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas de China e Rússia. As minas brasileiras são consideradas muito puras, sem contaminação com amianto do tipo anfíbio, o que favorece sua exploração.

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* realizados desde a década de 1970 tentam elucidar os mecanismos de ação das fibras de amianto relacionados com o desenvolvimento das doenças, auxiliando a regulamentação do uso das fibras para que ele se torne seguro aos trabalhadores. Estudos em camundongos mostram que as fibras, ao serem inaladas, se alojam no pulmão e vias aéreas, levando à indução de expressão de fatores de crescimento de células epiteliais e mesenquimais, e à proliferação e morte celular detectadas até 30 dias após a exposição (Brody *et al.*, 1997; Robledo *et al.*, 2000; Kido *et al.*, 2008). Leucócitos, células epiteliais alveolares e principalmente macrófagos alveolares fagocitam as fibras, mas não são capazes de digerí-las totalmente, e assim morrem liberando-as novamente no tecido pulmonar juntamente com o conteúdo lisossômico, desencadeando uma resposta inflamatória e posteriormente silicose e asbestose. Os macrófagos ainda podem migrar para tecidos conjuntivos submesoteliais, aí liberando as fibras após sua morte (Suzuki, 1974). Contudo, as alterações causadas pelas fibras de asbestos relacionadas à tumorigênese ainda não foram totalmente elucidadas.

Um fator ligado ao desenvolvimento das doenças relacionadas ao asbesto é a biopersistência das fibras no pulmão. A biopersistência das fibras de crisotila é ainda alvo de discussão já que, quando no pulmão, elas tendem a se fragmentar, formando pequenos pedaços que podem ser eliminados com maior facilidade pelo organismo. Bernstein e colaboradores em estudos recentes indicam que devido a esse processo as fibras de crisotila não persistem no pulmão por mais de seis meses após a exposição, concluindo – por causa dessa baixa biopersistência quando comparada às

fibras do tipo anfíbolos – que sua exposição não está associada ao desenvolvimento de doenças pulmonares (Bernstein *et al.*, 2005, 2013). Porém, outros estudos observaram fibras de crisotila no pulmão de camundongos de seis meses até dois anos após a exposição, tempo suficiente para o desenvolvimento de doenças como asbestose nestes organismos (Suzuki, 1974; Brody *et al.*, 1997).

Pesquisas *in vitro* tentam elucidar a interação das fibras com as células em cultura, investigando as alterações causadas pelas fibras que podem estar associadas à inflamação, à fibrose e também à formação de tumores. Diversos estudos dentro dessa linha vêm sendo feitos desde a década de 1970, nos quais diversas respostas celulares foram observadas após o contato das células com as fibras de crisotila. Estas respostas, de forma geral, podem ser agrupadas em i) internalização das fibras, ii) indução de estresse oxidativo, iii) alterações no ciclo, proliferação e morte celular, e iv) interação com compartimentos celulares. Essas respostas serão aqui exploradas, das quais a interação com compartimentos celulares será mais aprofundada por se relacionar diretamente com o presente estudo.

Interação entre fibras de crisotila e células – elucidando os mecanismos de ação

1) Internalização das fibras

Os mecanismos de internalização das fibras de crisotila ainda é objeto de investigação. Diversos tipos e linhagens celulares já foram expostos às fibras, como macrófagos, células epiteliais de pulmão e células mesoteliais humanas e de ratos, e em todos os casos foram observadas fibras internalizadas em até 90% das células após de 4 a 48 horas do início da exposição (MacCorkle *et al.*, 2006; Cortez & Machado-Santelli, 2008; Ricardi, 2013; Andolfi *et al.*, 2013). Os mecanismos de internalização sugeridos até o momento são: fagocitose mediada por receptores e desestabilização/perfuração da membrana com consequente entrada da fibra.

Compostos que contêm sílica, como é o caso da crisotila, podem ser fagocitados com mediação de receptores de membrana. Os receptores que parecem participar deste processo são do tipo Scavenger, uma família de receptores com funções bastante variadas e também com alguns casos de redundância funcional, já que muitos possuem afinidades pelos mesmos compostos, entre eles bactérias, polissacarídeos e células apoptóticas. Alguns receptores Scavenger da classe A e B, como os receptores MARCO, SCARA-5, SR-A e CD36, são apontados por apresentar afinidade por sílica. As células que possuem esses receptores podem fagocitar fibras de crisotila, que permanecem dentro das células envoltas por membrana (Fig. 2). Estudos mostram ainda que a maioria das fibras, quando internalizadas, são logo associadas a vesículas lisossômicas, que devem envolver as fibras e também isolá-las do restante do citoplasma (Mikalsen & Modalsli, 1994; Jensen

& Watson, 1999). Porém, a digestão total destas fibras pelo sistema endossômico-lisossômico é inviável e, após falha neste sistema, as fibras podem ser liberadas no citoplasma. A participação dos receptores na toxicidade mediada por compostos que contêm sílica foi evidenciada por estudos com inibidores para receptores Scavenger ou com células de camundongos *knockout* para estes receptores, quando foi reduzida a toxicidade consequente da exposição aos compostos com sílica (Iyer *et al.*, 1996; Beamer & Holian, 2005).

Outro mecanismo que pode levar à internalização das fibras é a desestabilização e perfuração da membrana plasmática, com consequente internalização das fibras. A perfuração da membrana foi colocada como um possível mecanismo para a internalização das fibras após estudos que utilizaram microscopia eletrônica para visualizá-las. Estes estudos mostram imagens bastante curiosas das fibras interagindo com a membrana plasmática e em alguns momentos perfurando-as (Suzuki, 1974; MacCorkle *et al.*, 2006; Ricardi, 2013). Quando uma fibra é internalizada dessa maneira, ela não permanece envolta por membrana plasmática e se encontra livre no citossol, podendo interagir com seus diferentes componentes (Fig. 2). Imagens mostrando fibras internalizadas não envoltas por membrana já foram publicadas, e dentro de uma mesma célula também podem ser encontradas fibras livres no citoplasma e envoltas por membrana, mostrando que diferentes processos de internalização podem ocorrer simultaneamente (MacCorkle *et al.*, 2006). A complexidade do cenário ainda se torna maior devido a eventos de ganho ou perda do isolamento conferido pela membrana em fibras que já foram internalizadas.

Figura 2. Internalização de fibras de asbestos. As fibras de crisotila podem ser internalizadas por dois mecanismos, sendo estes a desestabilização/perfuração da membrana plasmática e fagocitose mediada por receptores. Estes processos podem resultar em fibras livres no citoplasma ou envoltas por membrana. **A)** Fibras de crisotila interagindo e perfurando a membrana plasmática de célula epitelial de pulmão em cultura; **B)** Fibras de crisotila fagocitadas por neutrófilo no pulmão de camundongo exposto à fibras; **C)** Fibras de crisotila não envoltas por membrana no citoplasma de célula epitelial de pulmão em cultura; **D e E)** Fibroblastos de pulmão humano em cultura expostos à asbestos apresentaram fibras no citoplasma envoltas ou não por membrana plasmática (D), e por microscopia eletrônica de varredura foram observadas longas fibras internalizadas (E); **F)** Fibra de crisotila dentro de lisossomo em célula de pulmão de camundongo. Fonte: A e C: dissertação de mestrado da Luana Ribeiro Ricardi, 2013; B e F: Suzuki, 1974. D e E: MacCorkle *et al.*, 2006.

As fibras de amianto de forma geral são capazes de levar à produção de espécies reativas de oxigênio devido à presença de metais na sua composição e superfície, conforme demonstrado primeiramente por Zalma e colaboradores em 1987. O ferro presente nas fibras de crisotila é considerado um contaminante e não faz parte da sua estrutura; já nas fibras do tipo anfibólio o ferro faz parte da sua composição, e assim a quantidade de metal nessas fibras é muito maior do que nas fibras de crisotila. Porém, mesmo em quantidade reduzida, o ferro presente nas fibras de crisotila é suficiente para desencadear a formação de espécies reativas de oxigênio (Zalma *et al.*, 1987; Shukla *et al.*, 2003).

Quando as fibras são internalizadas pelas células ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres dentro das células, como H_2O_2 , e O_2^- , detectados por diferentes métodos de biologia celular e bioquímicos. Estas espécies reativas causam danos ao DNA, sendo mais comuns alterações em nucleotídeos e quebras na dupla-fita de DNA (Okayasu *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Shukla *et al.*, 2003; Dopp *et al.*, 2005). O uso de quelantes de ferro, antioxidantes ou fibras sinteticamente produzidas sem ferro reduzem esse estresse oxidativo e a citotoxicidade mediada pelas fibras (Gazzano *et al.*, 2005, 2007; Kamp, 2009).

3) Alterações no ciclo celular, proliferação e morte celular

O tratamento com asbestos pode induzir alterações no ciclo celular e também morte celular por apoptose. Em relação ao ciclo celular, o tratamento com crisotila leva ao aumento de células em G2/M e redução da população em G0/G1, observado em células mesoteliais de pleura de rato e em células tumorais epiteliais humanas. Nas células mesoteliais de rato ainda ocorre o aumento da expressão de p21 e p53, indicando a parada em ponto de checagem (Levresse *et al.*, 1997), e nas células tumorais ocorre o aumento do tempo em metáfase (Cortez *et al.*, 2011). Nestes dois trabalhos as fases do ciclo foram determinadas em histogramas gerados após detecção do conteúdo nuclear, e não foram verificadas alterações no número de células em fase S do ciclo. Porém, não foram realizados experimentos específicos para detecção de células em síntese de DNA. Já estudo de Kodama e colaboradores (1993) mostra que o tratamento com crisotila afeta a proliferação das células, uma vez que há redução do número de células e redução na formação de colônias após o tratamento, sem alteração da viabilidade celular (Kodama *et al.*, 1993).

O aumento de células em fase S foi detectado em estudos *in vivo*, e o aumento da proliferação parece estar restrito aos locais onde as fibras se acumulam no pulmão (Quinlan *et al.*, 1995). Essa proliferação pode ser uma resposta ao processo inflamatório causado pelas fibras e desencadeado apenas *in vivo*.

A maior parte dos trabalhos que analisam a morte celular após o tratamento com fibras relaciona este processo ao estresse oxidativo causado pelas fibras e o consequente dano ao DNA (Liu *et al.*, 2000; Burmeister *et al.*, 2004). A morte celular observada após o tratamento ocorre através da indução de apoptose, com fragmentação do material genético e ativação de caspases. Kido e colaboradores (2008) verificaram que o tratamento de células tumorais epiteliais de pulmão humano com crisotila leva à ativação de caspase 3 e 9 e consequente indução de apoptose, e que o tratamento prévio das células com inibidores de caspases reduz os níveis de apoptose causados pela exposição às fibras (Kido *et al.*, 2008).

4) Interação com compartimentos celulares

Como discutido no tópico sobre internalização, as fibras podem ser visualizadas dentro das células envoltas ou não por membrana. Quando as fibras não estão envoltas por membrana elas podem interagir com os diferentes compartimentos celulares, além de todos os componentes do citoplasma, como vesículas, proteínas e RNA.

Quando internalizadas por endocitose as fibras se apresentam no citoplasma dentro de vesículas, isoladas no restante do citoplasma. Nestes casos vesículas podem ser transportadas através dos microtúbulos, e após certo período da internalização encontram-se na região perinuclear (Cole *et al.*, 1991). Por outro lado, fibras não envoltas por membrana não devem ser transportadas associadas aos microtúbulos, e as possibilidades de interação com outros componentes intracelulares é maior.

- interação de fibras com RNA e proteínas

Em relação à interação com proteínas e RNAs, desde 1972 estudos vêm mostrando a capacidade das fibras de asbestos, incluindo a crisotila, de se ligar a diferentes proteínas presentes no soro, dependendo de suas características físicas e químicas (Jones *et al.*, 1972; Desai & Richards, 1978; MacCorkle *et al.*, 2006; Nagai *et al.*, 2011; Kubo *et al.*, 2012). Quando as fibras são adicionadas a diferentes soluções contendo macromoléculas como as encontradas no soro, as fibras de asbestos retêm proteínas em sua superfície. As proteínas que permanecem aderidas às fibras de crisotila são diferentes das que apresentam afinidade por fibras do grupo dos anfibólios, e estudos mostram que a crisotila geralmente se liga a uma quantidade maior de proteínas (Desai & Richards, 1978; Kubo *et al.*, 2012). Uma razão para esta diferença de afinidade entre os tipos de fibras pode ser a sua carga na superfície, já que crocidolita e amosita (ambas anfibólios) são carregadas negativamente, enquanto a crisotila é carregada positivamente.

A crisotila tem afinidade por proteínas que se ligam à cromatina e a RNAs, sugerindo que ela pode causar alterações na cromatina e nos processos de transcrição e tradução (Kubo *et al.*, 2012). A crisotila também mostrou afinidade por enzimas hidrolíticas, mas não alteram a sua atividade (Desai & Richards, 1983), e apresentam afinidade pela molécula de hemoglobina, que pode atuar como catalizador nos processos oxidativos mediados pelas fibras. A interação entre as fibras e as proteínas pode também levar a quebras e alterações oxidativas em diversas proteínas (Nagai *et al.*, 2011).

Outro estudo identificou que fibras de asbestos podem se ligar a proteínas que regulam ou participam do citoesqueleto, como Lamina, β -tubulina e Rack1, além de proteínas que participam da mitose, como Incenp, CenpB e Survivin. Os autores ainda observaram mitoses multipolares nessas células e sugerem que a internalização das fibras leva ao sequestro de proteínas reguladoras do citoesqueleto e da mitose, desencadeando alterações que culminam na formação de mitoses aberrantes (MacCorkle *et al.*, 2006).

- interação de fibras com o núcleo interfásico e cromossomos

A quebra dos cromossomos, observada em diversos estudos por técnicas citogenéticas, pode ser o principal responsável pela formação de micronúcleos, que ocorrem em diversos tipos celulares expostos a fibras (Dopp *et al.*, 1997; Dönmez-Altuntas *et al.*, 2007; Cortez *et al.*, 2011). A presença de células com mais de um núcleo também é característica marcante de células expostas especificamente a fibras de crisotila, evidenciando que alterações nucleares são frequentes após o tratamento com esse tipo de fibra (Cortez & Machado-Santelli, 2008; Cortez *et al.*, 2011).

A quebra dos cromossomos pode ser resultado do estresse oxidativo causado pelas fibras, mas também da interação física entre as fibras e a cromatina/núcleo. Em estudos que visualizaram a movimentação das fibras em células mitóticas foi observada a quebra de cromossomos ocasionada pelo seu contato com fibras do tipo crocidolita (Ault *et al.*, 1995). Estes resultados mostram que a interação entre as fibras e os cromossomos é favorecida quando o envoltório nuclear se desfaz durante a mitose (Ault *et al.*, 1995; Cortez & Machado-Santelli, 2008), e desta interação podem surgir quebras cromossômicas (Ault *et al.*, 1995).

A interação das fibras com o núcleo interfásico também pode ocorrer – foram observadas fibras interagindo com núcleos interfásicos por microscopia eletrônica, confocal e de luz. Por microscopia confocal e de luz foram observadas fibras longas muito próximas ao núcleo interfásico e também logo após a formação do envoltório nuclear após a mitose, alterando a morfologia deles e levando à formação de núcleos lobulares ou até mesmo de células multinucleadas (Jensen & Watson, 1999; Cortez & Machado-Santelli, 2008). Já por microscopia eletrônica foram observadas

fibras interagindo com os núcleos, alterando o contorno do seu envoltório (Andolfi *et al.*, 2013), e também fibras no seu interior. Ainda não foi elucidado se as fibras são capazes de desestabilizar o envoltório nuclear e assim entrar no núcleo, ou se interagem com os cromossomos durante a mitose e acabam sendo envoltas pelo envoltório nuclear quando este se recompõe (Ricardi, 2013).

- interação de fibras com componentes celulares durante a divisão mitótica:

Alguns estudos investigaram a progressão da mitose em células expostas a fibras de amianto. Algumas alterações foram observadas, indicando que as fibras podem interferir na divisão celular (Ault *et al.*, 1995; Jensen & Watson, 1999; Cortez *et al.*, 2011).

Jesen & Watson (1999) observaram a mitose em células humanas mesoteliais e epiteliais de macaco em cultura expostas a fibras de asbestos. As fibras internalizadas durante a anáfase e a telófase tendem a se localizar entre os lotes de cromossomos e na ponte intercelular durante a citocinese. Na maioria das células com fibras visíveis na ponte intercelular ocorreu falha nesse processo e a consequente formação de uma célula-filha com mais de um núcleo. Já estudo com cultura primária de células epiteliais de pulmão de vertebrado mostra que os filamentos de queratina se organizam ao redor dos fusos durante a mitose, entre os fusos e a membrana plasmática. Apenas fibras que conseguem ultrapassar essa barreira interagem com os fusos e cromossomos, e as imagens mostram que as fibras podem ocasionar quebras nos cromossomos durante a mitose (Ault *et al.*, 1995).

Em células tumorais de epitélio de pulmão em cultura, após 48 horas de exposição à crisotila, cerca de 50% das mitoses apresentam fusos multipolares. A observação destas células durante a mitose revelou que elas passam um intervalo de tempo maior em metáfase do que as células controle e podem morrer durante esta etapa da mitose. Porém, algumas células são capazes de progredir no ciclo celular, gerando mais que duas células-filhas (Cortez and Machado-Santelli, 2008). Esse processo está associado à presença de células aneuploides, e células aneuploides podem estar associadas à tumorigênese e progressão tumoral, conforme discutido no Capítulo 1. Dessa forma, alguns estudos investigaram a formação de células aneuploides após o tratamento com crisotila, e verificaram que o tratamento induz a formação de células com conteúdo nuclear anormal.

O mecanismo responsável pela formação destas células parece ser a ocorrência de mitoses multipolares, que por sua vez são geradas pela presença de amplificação centrossômica, embora as causas desta amplificação ainda não tenham sido elucidadas (MacCorkle *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2011). Uma das possíveis causas é a própria regressão da citocinese, que gera uma célula-filha com conteúdo cromossômico e de centrossomos aumentada. Porém, muitos outros processos estão

relacionados com a amplificação centrossômica, como discutido no Capítulo 1. A investigação das causas da amplificação centrossômica após o tratamento com crisotila pode ser um ponto central no estudo das alterações celulares causadas por crisotila que podem estar envolvidas na formação dos tumores, sendo, portanto, de grande relevância.

Conforme abordado acima, as fibras de crisotila, quando internalizadas, levam à formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, quebras da dupla fita de DNA, apoptose, alterações no ciclo celular, e podem interagir com diferentes componentes celulares, como proteínas, RNAs e cromatina. Alterações na mitose são observadas, e as fibras podem se localizar na ponte intercelular e levar à regressão da citocinese, e estudos realizados pelo nosso grupo identificam ainda que as fibras, além de levarem à multinucleação, levam à formação de células com amplificação centrossômica que formam mitoses multipolares e células aneuploides. Porém, a causa da amplificação centrossômica ainda não foi determinada, e esta pode estar intimamente relacionada com a formação de células aneuploides e desenvolvimento de tumores. Dessa forma nos propomos, no presente estudo, a investigar as alterações celulares causadas pela crisotila em células em cultura que se relacionem com a amplificação centrossômica, formação de células aneuploides e desenvolvimento de tumores.

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar as alterações causadas em células expostas a crisotila que levam a formação de células aneuploides, e verificar as causas destas alterações. De maneira específica, os objetivos foram:

- 1) Investigar a causa da amplificação centrossômica após tratamento com crisotila;
- 2) Analisar as alterações de ploidia e ciclo celular que estão associadas à formação de células aneuploides;
- 3) Avaliar os mecanismos que levam à formação de células bi e multinucleadas após o tratamento, e se as células com mais de um núcleo são capazes de proliferar;
- 4) Comparar as alterações causadas pelas fibras em células normais e tumorais de origem epitelial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos relacionados à Cultura de Células, Imunofluorescência e Aquisição de Imagens, Citometria de Fluxo, Preparação Metafásica e Contagem de Cromossomos, Extração de RNA, PCR Quantitativo estão descritos no Capítulo 1 (pág. 28), já que são metodologias comuns aos Capítulos 2 e 3. Aqui estão descritas as metodologias exclusivas ao presente capítulo:

Tratamento com Crisotila

As fibras de crisotila 5R (Quebec Standard) obtidas da SAMA Mineração de Amianto Ltda (Minaçu, GO, Brasil) foram gentilmente cedidas pela Dra. Flavia M. Cassiola. Para o tratamento as células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm, 60 mm ou em garrafas de cultura e após 24 h o meio de cultura foi trocado por uma mistura de meio com fibras em concentração de 125 µg/mL. O tratamento aconteceu por até 48 h, tempo suficiente para que as fibras sejam internalizadas pelas células. Após este período o meio de cultura foi trocado por meio livre de fibra, e foi iniciado o tempo de recuperação de 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h.

Imunofluorescência

Além dos anticorpos citados na página 28, foram utilizados especificamente neste capítulo:

ANTICORPO	PROTEÍNA ou ESTRUTURA DETECTADA	DILUIÇÃO
Anti-Hec1 (Abcam, ab3613)	Cinetócoros	1:50
Soro Crest (Antibodies Inc., 15-234)	Cinetócoros	1:50
Anti-anillin (Santa Cruz, sc-67327)	Anillin presente na zona intermediária e ponte intercelular	1:200
Anti-Septin 9 (cortesia Dr Stephen Doxey)	Septin 9 presente na zona intermediária e ponte intercelular	1:500
Anti-Cep 55 (Novus Biologicals, H055165-B01P)	Cep55 presente nos centrossomos e ponte intercelular	1:100
Anti-Cenp E (Abcam, ab5093)	Cenp E presente nos cinetócoros e ponte intercelular	1:200
Anti-Alix (Santa Cruz, sc-53539)	Alix presente na ponte intercelular	1:150
Anti-Aurora B (Abcam, ab)	Aurora B presente nos cinetócoro e ponte intercelular	1:20
Anti-LC3 B (Nanotools, 0231-100)	Vesículas autofágicas	1:10
Anti-tubulina acetilada (Sigma, T7451)	Tubulina acetilada presente principalmente nos fusos mitóticos, ponte intercelular e cílios	1:100

PCR quantitativo

Os primers utilizados para realização dos PCRs quantitativos foram:

Gene	Primers (left/right)	Temp. anelamento (°C)	Ref. Gene bank
Ciclina B	CGGGAAGTCACTGGAAACAT AAACATGGCAGTGACACCAA	55	NM_031966.3
CiclinaE	CGTGCGTTTGCTTTTACAGA AGCACCTTCCATAGCAGCAT	55	NM_001238.2
β-tubulina	CTCTGAAGCTGACCACACCA/ GCCAGGCATAAAGAAATGGA	52	NM_178012.4
β-actina	CATGAGGTAGTCAGTCAGGT/ ATGACCCAGATCATGTTTGAG	52	NM_178012.4
Y- tubulina	TCTCCCAGATCAACCAGCTG TCCGTAGTGAGAGGGGTGTA	55	NM_001070.4
Aurora A	TTGGGTGGTCAGTACATGCT CCTGGCTCCCTCTGTTACAA	55	NM_198437.1
Aurora B	GACACCCGACATCTTAACGC CGCCCTCCTTCTCTATCTGG	55	NM_001256834.1
Anillin	CAGAAACCAGATGCAGCAAA ATCAAGGCCTGAGGGATCTT	56	NM_001284301.1
Septin 2	AGGAAAGAAGGTCAGAGGCC CATTCTCCACTTTCCTGCCG	55	NM_001008491.1
Septin 7	TGGAGATGGAGCAGGTGTTT TGTTGAGCTTCCCAGTTTGC	55	NM_001788.5
MKLP1	CGCTCTAACTCTTGCAGCAG CTGCCGCAATGATCCTCTTC	57	NM_138555.2
Alix	TGGCTGCAAAGCACTGTATC AGGGCACGATTGATTTTGTC	55	NM_001162429.2
TSG 101	GATACCCTCCCAATCCCAGT GTCACTGACCGCAGAGATGA	55	NM_006292.3
Borealin	CCTGACACCCAGGTTTGACT GCAATACTGTGCCTCTGCAA	55	NM_001256875.1
Incenp	TACCTGGAGAGGCTCCTGAA CAATCTCCGTGTCATTGTGG	55	NM_001040694.1
CenpB	AAGGGCTCCAGAAGAAGGTC AAACCAAGGGCCAAAGTCAC	55	NM_001810
Cenp E	CAATGCAAGGAACGGAATTT ACCTGGCTGAGAATCCACAC	55	NM_001813.2
Cep 55	CAGTATCCAGCCACTGAGCA GGGAGGTATCACTGCCAAGA	55	NM_018131.4
NB23	GATCTCTGGCAGTGGAGGAA CAAGCAAAGGGTGGAGTTCC	55	NM_002520.6

Annexin	GCCCCACCTCCAGAAAGTAT TCAGGACCTTATCTCGCGTC	55	NM_001002857.1
CHMP3	AAGTCAGGAGCTGACCAGGA CCAGAGGATCTGGGTTTGAA	55	NM_001005753.2
CHMP4	TGCCACTACCAATGCAGAAG TGCTCCAGCTCCTCTAGCTC	55	NM_014169.3
CHMP3vrt1	AAGTCAGGAGCTGACCAGGA CCAGAGGATCTGGGTTTGAA	55	NM_016079.3

Aquisição das imagens de fibras de crisotila

As fibras de crisotila possuem autofluorescência e podem ser adquiridas imagens das fibras ao microscópio confocal de varredura a laser utilizando-se uma configuração específica de laser e filtros, conforme descrito em Cortez & Machado-Santelli (2008). As fibras também podem ser visualizadas por DIC (*differential interference contrast*). Esses dois métodos apresentam limitações, sendo que fibras muito pequenas não são observadas pelo sistema no confocal, e dependendo da localização da fibra dentro da célula sua visualização pelo DIC pode ser comprometida. Dessa forma, para visualização das fibras de crisotila geralmente aliamos os dois sistemas.

Quantificação de células com amplificação centrossômica

A quantificação da amplificação centrossômica se deu em células submetidas à imunofluorescência com anticorpos anti-pericentrina e anti- α -tubulina. Foi considerada amplificação centrossômica a presença de mais que dois focos de Pericentrina em uma célula mononucleada e mais que quatro focos de Pericentrina em uma célula com mais de um núcleo. Foram analisadas de 400 a 500 células em 3 lâminas de experimentos independentes. As alterações observadas foram validadas pelo teste de significância *Student's t* utilizando $P < 0,05$.

Quantificação de alterações durante a citocinese

Células submetidas à imunofluorescência para detecção de proteínas presentes na ponte intercelular foram observadas ao microscópio de fluorescência. As alterações foram quantificadas a partir da observação de 100 citocineses em 3 lâminas de experimentos independentes para cada uma das proteínas analisadas. As alterações observadas foram validadas pelo teste de significância *Student's t* utilizando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Alterações da morfologia e ciclo celular em RPE tratadas com crisotila

Os efeitos do tratamento com fibras de crisotila na morfologia e ciclo de células tumorais HK2 já foi descrito (Cortez & Machado-Santelli, 2008; Cortez *et al.*, 2011). De forma geral, células HK2 apresentam aumento na frequência de células bi e multinucleadas e aumento de mitoses multipolares quando tratadas com crisotila. Esse tratamento também causa a diminuição de células em G1, aumento de células em G2/M e aumento de células hipertetraploides. Porém, ainda não se sabia se essas alterações eram respostas específicas de células tumorais ao tratamento e se em células normais poderiam ser observados resultados semelhantes. Portanto, decidimos avaliar as respostas ao tratamento com as fibras em células normais RPE de origem epitelial humana.

Primeiramente as células foram tratadas com crisotila e observadas ao microscópio de luz. Células RPE controle são fusiformes, com extremidades geralmente alongadas, e são mononucleadas. Após o tratamento com crisotila por 48 h foram observadas diversas células bi e multinucleadas, indicando que o tratamento leva a alterações morfológicas semelhantes em células tumorais e normais (Fig. 3 A). As células RPE controle e tratadas foram então submetidas à imunofluorescência para avaliação da frequência de células bi e multinucleadas e mitoses multipolares. A cultura de células RPE controle apresentou 97,8% de células mononucleadas, 1,3% de binucleadas, 0,9% de multinucleadas e 3,2% das células em mitose (todas bipolares). Após 24 h de tratamento a cultura sofreu grandes alterações: a frequência de células binucleadas aumentou para 13,6%, a de multinucleadas para 3,7%, e 16,5% (+/-2,6) das mitoses foram multipolares. Após 48 h de tratamento as alterações na cultura foram ainda mais drásticas: a população de células bi e multinucleadas aumentou para 23,4% e 7,8%, respectivamente (Fig. 3 B). O índice mitótico após o tratamento foi reduzido, chegando a 0,01 após 48 h de tratamento (Fig. 3 C).

O número de células RPE na cultura controle e tratada com crisotila foi inicialmente determinado a partir da curva de crescimento de células. A curva de crescimento, feita por 5 dias após o plaqueamento, revelou que as células RPE controle duplicam sua população em pouco menos de 48 h. O tratamento com crisotila levou à diminuição do número de células, que começou a ser notado após 48 h de tratamento. Nos períodos de recuperação de 24 h e 48 h o número de células diminuiu progressivamente em relação ao controle (Fig. 4 A).

Foi então analisado o ciclo celular de células RPE controle e tratadas com crisotila por citometria de fluxo após coloração dos núcleos por iodeto de propídeo. De acordo com o

conteúdo de DNA, as células foram classificadas como hipodiploides, G0/G1, S, G2/M, e hipertetraploides. Células controle apresentaram cerca de 2% das células classificadas como hipodiploides, 60% em G0/G1, aproximadamente 17% tanto em S quanto em G2/M, e 2,7% das células classificadas como hipertetraploides. Após o tratamento com crisotila por 48 h foi observada uma tendência na redução da porcentagem de células em G0/G1 para 56% e um aumento de células hipertetraploides para 5,6%. A porcentagem de células hipodiploides apresentou aumento para 3,8%, e a população em G2/M manteve-se ao redor de 17% nas três condições de tratamento. Após o tratamento com crisotila por 48 h seguidas de 48 h de recuperação em meio livre de fibras, não ocorreram alterações significativas quando os dados foram comparados ao tratamento por 48 h sem recuperação (Fig. 4 C e D). A partir desses experimentos sobre ciclo celular foi possível verificar que o tratamento não levou a alterações drásticas no ciclo celular, mas houve tendência de redução de células em G1/G0 e o aumento significativo de células hipertetraploides (Fig. 4 B e 4 D).

De forma geral estes resultados indicam que o tratamento com crisotila em células normais levou a alterações semelhantes às encontradas em células tumorais, dentre elas a formação de células bi e multinucleadas e mitoses multipolares, e aumento da frequência de células hipertetraploides. Por outro lado, ocorreu a redução do índice mitótico e crescimento celular, alterações não observadas em células tumorais HK2.

Figura 3. Morfologia de células RPE controle e tratadas com crisotila. A) Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h, 48 h, e 48 h seguidas de 24 h de recuperação foram observadas ao microscópio de luz. Células controle apresentaram morfologia fusiforme, com extremidades alongadas, e foram na sua maioria mononucleadas. Após tratamento com crisotila foram observadas diversas células bi e multinucleadas (as mais evidentes estão apontadas pelas setas); **B)** Foi quantificado o número de células mono, bi e multinucleadas em células RPE controle e tratadas com crisotila. O tratamento por 24 h e 48 h levou ao aumento de células bi e multinucleadas; **C)** O tratamento com crisotila também levou a redução da frequência de células em metáfase, reduzindo assim o índice mitótico.

Figura 4. Alterações no crescimento e ciclo celular em células RPE tratadas com crisotila. **A)** Foi realizada a curva de crescimento de células RPE controle e tratadas com crisotila. Após 48 h de exposição às fibras foi observada redução do número de células na cultura que se manteve após 48 h de tratamento seguidas de 24 h de recuperação, e se tornou significativa após 48 h de tratamento e 48 h de recuperação. **B, C e D)** Células RPE controle e tratadas com crisotila foram analisadas ao citômetro de fluxo quanto ao seu conteúdo de DNA. A partir dos gráficos apresentados as células foram divididas nas fases do ciclo celular (C e D). O tratamento levou ao aumento de células hipodiploides, redução de células em G0/G1 e aumento de células hipertetraploides (B).

Alterações na proliferação de células RPE e HK2

Conforme descrito acima, células RPE e HK2 expostas às fibras de crisotila apresentaram aumento da frequência de células hipertetraploides e células bi e multinucleadas, e redução tanto do índice mitótico quanto do número total de células na cultura. Entretanto, a análise do ciclo celular não revelou alterações na fase S do ciclo, que indicam mudanças na taxa de proliferação. Além disso, a detecção de células hipertetraploides por citometria de fluxo somente pela coloração da cromatina não revela se estas células são capazes de se proliferar. Dessa forma, decidiu-se investigar a proliferação de células tratadas com crisotila. Para tanto foi utilizado o kit para detecção de BrdU por citometria de fluxo, que permite a contagem de células em fase S além da quantificação de DNA. Logo, é possível separar as células de acordo com seu conteúdo de DNA e positividade para BrdU (Fig. 5 A).

Na linhagem RPE, 21,4% (+/- 1,6) das células em cultura apresentaram incorporação de BrdU, estando, portanto, em fase S do ciclo. Considerando este conjunto de células como 100%, 91,9% das células positivas para BrdU apresentaram conteúdo de DNA entre diploide e tetraploide, e 8,1% das células em proliferação apresentaram conteúdo de DNA hipertetraploide. Após tratamento com crisotila por 48 h ocorreu pequeno aumento do número total de células positivas para BrdU, passando para 24,5% (+/- 4,7), porém este não foi estatisticamente significativo. Quando analisadas células em proliferação segundo seu conteúdo de DNA, ocorreu aumento de células hipertetraploides positivas para BrdU, chegando a 15,1% das células em fase S (Fig. 5 B).

Em células HK2 os resultados foram bastante semelhantes. Não foi observada alteração significativa no número total de células em fase S quando comparadas células controle e tratadas com crisotila, porém ocorreu aumento significativo do número de células hipertetraploides que incorporaram BrdU: na situação controle 2,9% das células positivas para BrdU eram hipertetraploides, após 48 h de tratamento este número passou para 13,4% e após o tratamento seguido de 48 h de recuperação, 14% das células em fase S mostraram-se hipertetraploides (Fig. 5 C). Estes resultados evidenciam que as células hipertetraploides formadas após o tratamento com crisotila, tanto da linhagem RPE quanto da linhagem HK2, podem entrar na fase S novamente.

Figura 5. Análise da proliferação em células RPE e HK2 tratadas com crisotila. A proliferação de células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila foram avaliadas por citometria de fluxo com o kit BrdU FITC Flow (BD), que permite a identificação de células em fase S do ciclo celular. **A)** Gráficos representativos gerados pelo citômetro (eixo X: conteúdo de DNA, eixo Y: incorporação de BrdU), com as células divididas em 5 classes: diploides negativos para BrdU (1), tetraploides negativos para BrdU (2), células positivas para BrdU com conteúdo nuclear entre diploide e tetraploide (3), células positivas para BrdU com conteúdo de DNA hipertetraploide (4) e células hipodiploides (5); **B e C)** Porcentagem de células que incorporaram BrdU divididas em relação ao seu conteúdo de DNA. O tratamento não levou a alteração no número total de células em fase S (consideradas aqui como 100%), porém a análise revelou que células hipertetraploides são capazes de entrar em fase S nas duas linhagens analisadas.

Amplificação centrossômica em células tratadas com crisotila

Estudos mostram que o tratamento de células HK2 com crisotila leva à formação de células bi e multinucleadas, de centrossomos extranuméricos e presença de mitoses multipolares em decorrência desta amplificação centrossômica. A presença da amplificação centrossômica foi observada apenas pela marcação com γ -tubulina em células mitóticas e interfásicas, e também durante a mitose pela presença de múltiplos polos dos fusos. Porém, a causa desta amplificação ainda não foi elucidada (Cortez & Machado-Santelli, 2008). Além disso, o efeito do tratamento com crisotila sobre o número de centrossomos de células normais RPE ainda não havia sido estudado. Logo, foram investigadas no presente estudo as alterações associadas ao número e estrutura dos centrossomos após tratamento com crisotila. Isso foi feito por meio de reações de imunofluorescência com uso de anticorpos para detecção dos centríolos, Pericentrina e γ -tubulina. As contagens foram feitas conforme descrito nos materiais e métodos deste capítulo.

Células RPE controle apresentaram um ou dois centrossomos por células em 98,01% dos casos (Fig. 6 A), os quais contêm dois centríolos visualizados pela presença de Centrina, Cenexin ou Centrobin, e matriz pericentriolar positiva para γ -tubulina e Pericentrina (Fig. 7 A e 8 A).

A partir da contagem de células RPE com centrossomos marcados, verificou-se que na situação controle 1,99% das células interfásicas apresentavam amplificação centrossômica, e esta ocorreu em células mononucleadas em 73,5% dos casos. Em células tratadas com crisotila essa população com amplificação centrossômica aumentou, passando para 10,91% e 14,7% após 24 h e 48 h de tratamento, respectivamente (Fig. 6 A). Após o tratamento a amplificação centrossômica ocorreu de forma mais evidente em células bi ou multinucleadas, sendo que das células com amplificação cerca de 80% eram bi ou multinucleadas (Fig. 6 C). Células multinucleadas apresentaram até 8 pontos de Centrina distribuídos em um ou dois centrossomos. Não foram observados focos de matriz pericentriolar sem a presença de centríolos, indicando que o tratamento não levou a fragmentação da matriz e formação de corpos acentriolares (Fig. 7 B, C e D). A observação de centríolos-filhos e centríolos-mãe evidenciou que células tratadas mononucleadas apresentaram em sua maioria um centríolo-mãe e um centríolo-filho, sendo assim semelhantes ao controle. Células tratadas multinucleadas mantiveram o balanço entre o número de centríolos-mãe e filhos, sendo frequentemente observados dois centríolos-filhos e dois centríolos-mãe (Fig. 8 B e C).

Em células tumorais HK2, que apresentam cerca de 15% de células bi e multinucleadas na cultura controle e 25% após o tratamento, a amplificação centrossômica ocorreu

majoritariamente em células bi e multinucleadas tanto na situação controle quanto após o tratamento com crisotila. Porém, o tratamento levou ao aumento significativo do número de células com amplificação: na situação controle 2,7% das células interfásicas apresentaram amplificação, e após o tratamento, 12,8% (Fig. 6B).

Esses dados, principalmente os gerados a partir de células RPE que são caracterizadas por células mononucleadas na situação controle, mostram que a amplificação centrossômica é uma alteração que acompanha a formação de células multinucleadas após o tratamento com crisotila.

Figura 6. Amplificação centrossômica em células HK2 e RPE. Células RPE e HK2 foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos centrossomos, e a partir da observação dessas preparações foi possível quantificar o número de células com amplificação centrossômica. **A e B)** O tratamento com crisotila levou ao aumento de células com amplificação centrossômica nas linhagens RPE (A) e HK2 (B); **C)** A distribuição da amplificação centrossômica entre células mononucleadas ou bi/multinucleadas foi investigada na linhagem RPE, e revelou que a amplificação centrossômica ocorreu principalmente em células bi e multinucleadas.

Figura 7. Amplificação centrossômica em células RPE tratadas com crisotila. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos centrossomos e núcleos. **A)** Células controle apresentaram dois ou quatro focos de Centrina, distribuídos em um ou dois focos de γ -tubulina; **B)** Após 24 h de tratamento com crisotila a maior parte das células mononucleadas apresentou um centrossomo semelhante ao observado nas células controle; **C e D)** Células binucleadas após o tratamento com crisotila por 24 h apresentaram amplificação centrossômica, com a presença de até 8 centríolos por célula geralmente distribuídos em 4 focos de γ -tubulina. Barra=10 μ m.

Figura 8. Amplificação centrossômica em células RPE tratadas com crisotila. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos centríolos-filhos (Centrobin), centríolos-mãe (Cenexin) e núcleos. **A)** Células controle apresentaram um foco de Centrobin e um foco de Cenexin muito próximos; **B e C)** Após 24 h de tratamento com crisotila a maior parte das células mononucleadas apresentou marcação semelhante às células controle, com um foco de Centrobin e um foco de Cenexin. Células multinucleadas após o tratamento apresentaram dois centríolos-filhos e dois centríolos-mãe, indicando que o balanço entre centríolo-mãe e filhos foi mantido mesmo na presença de amplificação centrossômica (setas em B, e C). Barra=10 μ m.

Número de cromossomos em células tratadas com crisotila

O número de cromossomos em células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila foi verificado a partir de preparações metafásicas. Assim foi possível observar o número de cromossomos em células em proliferação. Foram avaliadas 100 ou 50 metáfases de cada situação controle e de tratamento em três experimentos independentes. Os resultados dos três experimentos mostram-se semelhantes, e aqui estão representados um experimento de cada uma das linhagens.

As metáfases das células HK2 apresentaram grande variação do número de cromossomos, como esperado para uma linhagem tumoral, e optou-se por analisar 100 metáfases em cada controle/tratamento para que a distribuição do número de cromossomos e alterações após os tratamentos fossem evidentes. Na cultura controle foi verificado que o número de cromossomos variou entre 47 e 116, mas ainda assim foi possível estabelecer 5 classes distintas: hipodiploide (menor que 61 cromossomos), diploide (entre 61 e 80), hiperdiploide (entre 81 e 120), tetraploide (entre 121 e 155) e hipertetraploide (maior que 155 cromossomos). No controle 86% das metáfases apresentaram conteúdo considerado diploide, 8% hipodiploide, 3% hiperdiploide, 3% tetraploide, e nenhuma metáfase hipertetraploide foi observada. Quando tratadas com crisotila por 48 h o pico de metáfases diploides se manteve, porém a porcentagem de metáfases dentro desse intervalo foi menor – 75% das metáfases. Ocorreu aumento do número de células com conteúdo hipertetraploide para 1%, hiperdiploide para 6% e tetraploide para 8%. O aumento da população de células em conteúdo cromossômico tetraploide foi mais evidente quando as células foram tratadas por 48 h e recuperadas por 48 h, quando 19% das metáfases analisadas apresentaram de 121 a 155 cromossomos. Já após 96 h de recuperação o número de cromossomos observado nas metáfases foi bastante diferente: ocorreu grande aumento de células hipodiploides (37%), diminuição das células diploides para 42% das metáfases, aumento da população hiperdiploide (12%) e aumento da população hipertetraploide (5%) (Fig. 9).

Já as células da linhagem RPE não apresentaram grande variação do número de cromossomos na situação controle, e a análise de 50 metáfases foi suficiente para evidenciar as diferenças entre o controle e o tratamento com crisotila. Por ser uma linhagem humana normal, a cultura de células RPE apresentou 92% das metáfases no intervalo de 44 a 48 cromossomos. Outros 4% apresentaram menos que 44 cromossomos (hipodiploides), 2% entre 84 e 101 cromossomos (conteúdo tetraploide) e 2% com mais que 101 cromossomos, chamadas células hipertetraploides. Após o tratamento com crisotila por 48 h ocorreu aumento da população com conteúdo tetraploide, chegando a 10%. Já após o tratamento

seguido de 48 h de recuperação ocorreu diminuição da população tetraploide, mas aumento da hipodiploide (10%) e hipertetraploide (4%) (Fig. 10).

Nas metáfases de células controle e tratadas das duas linhagens não se observou endoreduplicação, quando os cromossomos duplicados se mantêm unidos. Também nas células tratadas não foi observado aumento significativo de cromossomos fragmentados ou muito menores do que os observados na situação controle (Fig. 9 B e 10 B). Estes fatos indicam que as células tratadas que apresentaram o dobro do número de cromossomos se formaram muito provavelmente a partir de falhas no processo de divisão celular, e que estas células são capazes de iniciar um novo ciclo celular e entrar novamente em mitose.

Figura 9. Número de cromossomos em células HK2 controle e tratadas com crisotila. Foram analisadas 100 metáfases obtidas em preparações metafásicas de células HK2 controle, tratadas com crisotila por 48 h, e tratadas e recuperadas por 48 h e 96 h. **A)** Células HK2 controle apresentaram grande variação do número de cromossomos, mas 86 das 100 metáfases apresentaram entre 61 a 80 cromossomos, considerado o conteúdo “diploide” para esta linhagem. Após 48 h de tratamento com crisotila ocorreu aumento de células com conteúdo considerado tetraploide (de 121 a 155 cromossomos) e hiperdiploide (entre 81 e 120 cromossomos). Após 48 h de tratamento seguido de 48 h de recuperação o aumento de células tetraploides foi mais evidente (19 das 100 metáfases). Já após 96 h de recuperação ocorreu aumento das populações hipodiploide, hiperdiploide e hipertetraploide, enquanto a frequência de tetraploides se assemelhou ao controle; **B)** Imagens dos cromossomos de células HK2 controle com 76 e 78 cromossomos, e tratadas com crisotila com 142, 84 e 79 cromossomos. Os cromossomos de células tratadas apresentaram morfologia normal, semelhante ao controle.

Figura 10. Número de cromossomos em células RPE controle e tratadas com crisotila. Foram analisadas 50 metáfases obtidas por preparação metafásica de células RPE controle, tratadas com crisotila por 48 h, e tratadas com crisotila por 48 h e recuperadas por mais 48 h. **A)** As células controle apresentaram de 42 a 50 cromossomos em 46 das 50 metáfases analisadas, como esperado para uma linhagem de células humanas normais. Após 48 h de tratamento com crisotila 5 das 50 metáfases apresentaram entre 84 e 101 cromossomos, considerado o conteúdo de uma célula tetraploide em mitose. Após o tratamento e 48 h de recuperação ocorreu aumento de mitoses com conteúdo hipodiploide de cromossomos; **B)** Imagens dos cromossomos de células HK2 nas preparações metafásicas analisadas. Células controle com 46 cromossomos, e células tratadas com 94 e 48 cromossomos.

Número de cinetócoros em mitoses multipolares e bipolares

O tratamento com crisotila levou à formação de células interfásicas com amplificação centrossômica e mitoses multipolares. A amplificação centrossômica pode ser decorrente de erros na duplicação dos centrossomos – fazendo com que estes se dupliquem mais de uma vez por ciclo celular–, fragmentação do material centrossomal ou devido à regressão da citocinese. Neste último caso a amplificação centrossômica deve acompanhar a duplicação do material genético. No caso do tratamento com crisotila, uma maneira de verificar se a amplificação centrossômica é decorrente de falha na citocinese é estabelecer a relação entre o número de cromossomos e o número de centrossomos. Para tanto, células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila por 24 h foram fixadas e seus cinetócoros ou centrômeros marcados com anticorpo anti-HEC1 ou com o soro CREST. Os centrossomos foram marcados com o anticorpo anti- γ tubulina e a cromatina foi corada por DAPI.

Foram adquiridas imagens de mitoses bipolares e multipolares ao microscópio confocal de varredura a laser, e estas foram reconstruídas pelo software Imaris (Bitplane). O software, além de detectar cada cinetócoro marcado, apresenta o número de estruturas detectadas.

Mitoses bipolares de células RPE controle apresentaram de 45 a 47 centrômeros ($n=7$), e mitoses multipolares em culturas controle não foram observadas. Após o tratamento com crisotila por 24 h foram analisadas 12 mitoses multipolares, que apresentaram de 73 a 122 centrômeros marcados, sendo que a média foi de 96 cromossomos – valor muito similar ao esperado para uma célula tetraploide em mitose. Ainda nessa condição de tratamento, as mitoses bipolares apresentaram de 42 a 69 cromossomos ($n=5$), mas a maioria delas com cerca de 46 (Fig. 11).

Células HK2 mitóticas apresentam entre 60 e 80 centrômeros, número em concordância com o número de cromossomos observado nas preparações metafásicas. Quando estas células foram submetidas à imunofluorescência para visualização dos centrômeros, os sinais provenientes destes ficaram muito fortes e sobrepostos, comprometendo sua contagem após a reconstrução das imagens. Diante disso optou-se pela realização de imunofluorescência com o anticorpo anti-Hec1, em vez do soro CREST, já que este anticorpo detecta o cinetócoro presente em cada uma das cromátides independentemente com uma marcação delicada, e pela realização da *deconvolution* das imagens adquiridas antes que estas fossem analisadas no Imaris. Dessa forma, alguns erros inerentes à técnica foram minimizados e a quantificação dos cinetócoros ficou mais precisa.

Foi possível detectar o número de cinetócoros em 11 metáfases bipolares controle, e em 7 metáfases multipolares e 11 metáfases bipolares após o tratamento com crisotila.

Metáfases bipolares de células HK2 controle apresentaram entre 100 e 180 cinetócoros, com média de 141 – número coerente com o número de cromossomos observado em preparações metafásicas. Após o tratamento com crisotila por 24 h, metáfases multipolares apresentaram aumento do número de cinetócoros em 6 das 7 analisadas, que variou entre 155 e 372, com média de 274 cinetócoros. Essa variedade no número de cinetócoros já era esperada por se tratar de uma linhagem de células tumorais. Considerando-se o número médio de cinetócoros nas diferentes metáfases multipolares, este foi o dobro do observado nas células controle. Mitoses bipolares de célula tratadas com crisotila apresentaram número de cinetócoros similar ao observado em mitoses controle, sendo a média de 150 cinetócoros por mitose (Fig. 12).

Esses dados demonstram que as mitoses multipolares nas duas linhagens após o tratamento com crisotila apresentaram aproximadamente o dobro de cromossomos do que o observado em mitoses bipolares. Assim, esse resultado indica que as mitoses multipolares devem ser oriundas de células que sofreram falha na mitose e assim apresentam o dobro do conteúdo de cromossomos e de centrosomos.

C número de centrômeros em mitoses de células RPE

Figura 11. Número de centrômeros em células RPE. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos centrômeros em mitoses bipolares e multipolares. As imagens foram adquiridas ao microscópio confocal e reconstruídas tridimensionalmente pelo software Imaris (Bitplane). **A)** Imagem de células tratadas com crisotila por 24 h submetidas à imunofluorescência obtida ao microscópio confocal; **A')** Imagem da mitose multipolar apresentada em A reconstruída tridimensionalmente, com os centrômeros identificados também em branco; **B)** Mitose bipolar após o tratamento com crisotila, também reconstruída pelo Imaris; **C)** Foram quantificados os centrômeros de 10 mitoses bipolares de células controle, e de 10 mitoses multipolares e 5 bipolares após o tratamento com crisotila. As mitoses multipolares apresentaram em média o dobro do número de centrômeros comparado à mitoses de células controle. Mitoses bipolares após o tratamento apresentaram número de centrômeros semelhante ao observado em células controle.

Figura 12. Número de cinetócoros em células HK2. Células HK2 controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos cinetócoros em mitoses bipolares e multipolares. As imagens foram adquiridas ao microscópio confocal, submetidas ao processo de *deconvolution* pelo software AutoQuantX, e reconstruídas tridimensionalmente pelo software Imaris (Bitplane). **A)** Imagem de mitose bipolar de célula controle submetida ao processo de *deconvolution*; **A')** Reconstrução tridimensional da imagem apresentada em A, com os cinetócoros identificados também em branco; **B)** Imagem de mitose multipolar após tratamento com crisotila; **B')** Reconstrução tridimensional da mitose multipolar apresentada B, com os cinetócoros identificados em branco; **C)** Foram quantificados os cinetócoros de 11 mitoses de células controle, e de 7 mitoses multipolares e 9 bipolares após o tratamento com crisotila. As mitoses multipolares apresentaram em média o dobro do número de cinetócoros comparado às células controle. Mitoses bipolares após o tratamento apresentaram número de cinetócoros semelhante ao observado em células controle.

Observação das células tratadas com crisotila por *time-lapse*: formação de células multinucleadas e regressão da citocinese

- Células HK2

O tratamento de células HK2 com crisotila leva ao aumento do número de células bi e multinucleadas, e ao aumento da ocorrência de mitoses multipolares (Cortez *et al.*, 2011). Para observar como estas células bi e multinucleadas são formadas e qual a sua relação com a ocorrência de mitoses multipolares, células HK2 foram transfectadas com o plasmídio H2B-GFP, tratadas com crisotila por 24 h ou 48 h e observadas por microscopia em tempo real (*time-lapse*) por períodos de até 24 h.

A observação de células controle evidenciou que cerca de 50% delas expressaram a proteína fluorescente após 24 h do final da transfecção, e tanto células que expressaram a proteína H2B-GFP quanto células sem sinal da proteína fluorescente se dividiram de maneira bipolar, formando duas células-filhas mononucleadas em mais de 90% das divisões (foram observadas cerca de 60 mitoses). Células controle (com e sem sinal da proteína fluorescente) levaram de 45 min a 1h 30min entre o início da metáfase e a separação das células-filhas (Fig. 13). Poucas células em processo de morte celular foram observadas, assim como poucas mitoses multipolares. Apenas uma regressão de citocinese ocorreu em mais de 40 divisões observadas.

Nas células tratadas com crisotila por 48 h, primeiramente foram acompanhados os destinos de células bi e multinucleadas, que se mostraram capazes de entrar em mitose e progredir no ciclo celular. O primeiro destino observado foi a formação de mitose multipolar, seguida de divisão em três células-filhas, com formação de ponte intercelular entre as três células. Porém, logo após esse evento ocorreu a fusão de duas das células-filhas, e assim foram formadas apenas duas células-filhas, sendo uma delas invariavelmente bi ou multinucleada (Fig. 14 célula A). Outro destino foi a morte celular em metáfase, que ocorreu após períodos longos em metáfase (mais que 3 h) ou após períodos curtos (cerca de 1 h). Não foi utilizado nenhum método para detecção do tipo de morte celular desencadeado nestas células, porém a morte da célula foi evidenciada pela formação de inúmeras bolhas na membrana da célula, condensação da cromatina e desligamento da célula do substrato (Fig. 14 célula B). O terceiro destino observado de células bi e multinucleadas foi a divisão bipolar, resultando em duas células-filhas mononucleadas. Em alguns destes casos foi possível observar que a célula, ao entrar em mitose, formou fusos multipolares, evidenciados pelo alinhamento dos cromossomos, e, após certo período em metáfase, os cromossomos se alinharam na placa equatorial, indicando a organização dos fusos de forma bipolar. Após o alinhamento dos fusos a célula progrediu para anáfase, telófase e citocinese, formando duas

células-filhas mononucleadas (Fig. 15 A). O quarto destino observado foi a formação de mitose multipolar, divisão em três ou quatro células-filhas, e fusão destas em apenas uma célula-filha multinucleada. Nestes casos a fusão ocorreu antes da formação da ponte intercelular, logo após a telófase (Fig. 15 B). Esses resultados mostram que células bi e multinucleadas podem entrar em mitose novamente, e que a maioria dos destinos dessas divisões foram a formação de novas células bi e multinucleadas por diferentes mecanismos, que incluem regressão da citocinese e fusão celular após o início da telófase.

A observação do destino de células multinucleadas revelou a ocorrência de regressão de citocinese, que foi então investigada em maior detalhe. Em alguns casos de mitoses multipolares a ponte intercelular foi formada após a divisão celular, o corpo intermediário chegou a ser observado, mas após algumas horas em citocinese as células se aproximaram e sofreram a falha neste processo, formando apenas uma célula multinucleada. Em muitos casos foi observada a presença de fibras na ponte intercelular (Fig. 16), mas em outros não (Fig. 17 A e B). A investigação da regressão na citocinese evidenciou que este processo também ocorreu após a divisão bipolar (Fig. 17 A), proveniente inclusive de células mononucleadas (Fig. 17 B), sendo este um processo que a partir de células mononucleadas leva à formação de células tetraploides, multinucleadas e com amplificação centrossômica – alterações muito evidentes após o tratamento com crisotila.

A falha na citocinese também pode levar à formação de células-filhas conectadas pela ponte intercelular, sem que ocorresse a regressão e formação de uma célula-filha durante o experimento. Foram observados casos após o tratamento com crisotila de células-filhas que entraram em metáfase ainda conectadas pela ponte intercelular, e assim o ingresso de uma célula em metáfase levou à entrada em mitose da outra célula-filha, ou as células estavam sincronizadas e entraram em mitose em período semelhante. As células se fundiram em mitose, formando mitoses multipolares, e tiveram um dos destinos de mitoses multipolares – divisão em mais que duas células-filhas que pode ser seguida de fusão celular ou regressão de citocinese, morte celular ou divisão em duas células-filhas (Fig. 18). É válido lembrar que os casos de falha na citocinese sem ocorrência de regressão foram menos frequentes que os casos com falha seguida de regressão.

Outro fato interessante é que após o processo de regressão de citocinese os núcleos das células formadas muitas vezes apresentaram morfologia alterada, com formação de núcleos lobulares e até mesmo divisão do núcleo em dois ou três. Geralmente as alterações nucleares estavam presentes em células com fibras visíveis (Fig. 19 A), porém alterações

nucleares também foram encontradas após a divisão celular na ausência de fibras e após divisões bipolares e multipolares (Fig. 19 e 17 B).

Os dados acima reunidos indicam que após o tratamento com crisotila a regressão da citocinese foi o processo principal relacionado à formação de células bi e multinucleadas. Além desse, outros processos também contribuíram para a formação destas células, como a fragmentação do núcleo e a fusão de células-filhas após divisões multipolares. As divisões multipolares ocorreram, na maioria dos casos, a partir de células interfásicas bi e multinucleadas, que, conforme observado, progrediram no ciclo celular formando novas células com um ou mais núcleos.

Figura 13. Mitoses em células HK2 controle transfetadas com o plasmídeo H2B-GFP. Células HK2 após 24 h da transfecção com o plasmídeo H2B-GFP foram observadas por *time-lapse* por 20 h. A cultura foi formada por células mononucleadas, e poucas células morrendo foram observadas (cabeças de setas brancas apontam células expressando H2B-GFP, pretas apontam células não expressando H2B-GFP). Muitas mitoses bipolares foram observadas tanto em células expressando a proteína H2B-GFP (setas brancas) quando em células sem expressão detectável da proteína (setas pretas). O tempo de divisão nessas células também foi semelhante, sendo que as células após chegarem a metáfase terminaram a mitose em de 45 min a 1 h 30 min.

Figura 14. Destinos de células HK2 multinucleadas: morte celular e divisão seguida de fusão. Células HK2 H2B-GFP foram observadas por *time-lapse* após 48 h de tratamento com crisotila. **Célula A)** Célula multinucleada entrou em mitose, passou cerca de 3 h em metáfase e se dividiu gerando três células-filhas. A ponte intercelular foi formada, mas após 2 h duas células-filhas se fundiram e formaram uma célula multinucleada; **Célula B)** Célula binucleada entrou em mitose e após cerca de 4 h em metáfase sofreu processo de morte celular.

Figura 15. Destinos de células HK2 multinucleadas: divisão bipolar e divisão multipolar seguida de fusão. Células HK2 H2B-GFP foram observadas por *time-lapse* após 48 h de tratamento com crisotila. Alguns destinos de células bi e multinucleadas foram observados. **A)** Célula binucleada entrou em mitose e mostrou alinhamento dos cromossomos típico de mitose multipolar. Porém, após 1h 15min em metáfase alinhou os cromossomos na placa metafásica evidenciando a formação de fusos bipolares, e se dividiu formando duas células-filhas mononucleadas; **B)** Célula multinucleada entrou em mitose, se dividiu em três ou quatro células-filhas que logo se fundiram formando apenas uma célula multinucleada e micronucleada. A fusão celular ocorreu antes da formação da ponte intercelular, provavelmente na transição entre telófase e citocinese.

Figura 16. Destino de células HK2 multinucleadas: formação de mitose multipolar e regressão de citocinese. Células HK2 H2B-GFP foram tratadas com crisotila por 48 h e observadas por *time-lapse*. **Célula A)** Célula multinucleada entrou em mitose multipolar, após 1h 30min se dividiu em três células-filhas. Estas sofreram fusão formando apenas duas células-filhas que entraram em citocinese. A ponte intercelular chegou a ser formada, e as células permaneceram em citocinese por cerca de 3 h, quando as células se aproximaram e se fundiram, formando apenas uma célula multinucleada. Durante o período em citocinese foi possível observar fibras na ponte intercelular; **Célula B)** Célula binucleada entrou em mitose multipolar, se dividiu em três células-filhas que logo se fundiram formando duas células-filhas. As células formaram a ponte intercelular e foi possível observar o corpo intermediário. Após 10 h em citocinese a separação das células-filhas não ocorreu, e durante esse período foi possível observar uma fibra delgada na ponte intercelular.

Figura 17. Regressão da citocinese sem fibra visível na ponte intercelular. Células HK2 H2B-GFP tratadas com crisotila por 24 h foram observadas por *time-lapse*. Foram observadas regressões de citocinese com fibras visíveis na ponte intercelular, mas também regressões quando não foram observadas fibras na ponte, conforme aqui apresentado. **A)** Duas células-filhas formadas ao final da divisão celular permaneceram em citocinese por cerca de 6 h, quando se fundiram e formaram apenas uma célula binucleada; **B)** Célula mononucleada entrou em mitose, se dividiu formando duas células-filhas e chegou a formar o corpo intermediário durante a citocinese. Após cerca de 1h 30min a ponte intercelular regrediu e uma célula-filha multinucleada foi formada. É interessante notar que as células passaram a expressar a proteína H2B-GFP durante a fusão das duas células-filhas, e que ainda os núcleos provenientes de cada célula se tornaram lobulados e/ou binucleados.

Figura 18. Falha na citocinese sem ocorrência de regressão seguida de divisão multipolar. Células HK2 H2B-GFP tratadas com crisotila por 48 h foram observadas por *time-lapse*. Foram observadas células conectadas pela ponte intercelular, e estas puderam entrar em mitose antes da citocinese se completar. Célula-filha entrou em mitose quando ainda estava conectada à outra célula-filha pela ponte intercelular, evidenciando que a citocinese não havia se completado. O outra célula-filha entrou em mitose 40 min após a entrada da primeira, e estas se fundiram durante a mitose, formando apenas uma célula metafásica. Esta se dividiu gerando três células-filhas, que se fundiram formando apenas duas células sendo uma multinucleada.

Figura 19. Alterações nucleares em células HK2: formação de núcleo lobular e divisão nuclear. Células HK2 H2B-GFP tratadas com crisotila por 48 h foram observadas por *time-lapse*. Alterações nucleares foram observadas, como a formação de núcleos lobulares e divisão do núcleo. **A)** Células em citocinese apresentaram fibra entre as duas células-filhas, e ocorreu regressão da citocinese. Os núcleos da célula-filha formada se tornaram lobulados, evidenciando que a presença da fibra pode alterar a morfologia nuclear; **B)** Núcleos detectados pela expressão da H2B-GFP evidenciaram a divisão bipolar, sendo que um dos lotes de cromossomos ao adquirir morfologia de núcleo interfásico sofreu divisão e gerou dois núcleos. A célula ainda sofreu regressão de citocinese, formando uma célula multinucleada; **C)** Núcleos detectados pela expressão da H2B-GFP evidenciaram a divisão bipolar, com a formação de núcleos lobulados nas duas células-filhas.

Observação das células tratadas com crisotila por *time-lapse*: formação de células multinucleadas e regressão da citocinese

- Células RPE

As células RPE são células muito delgadas, o que facilita a observação dos núcleos mesmo quando estes não estão corados. Dessa maneira, não foi necessária a transfecção desta linhagem com o vetor H2B-FGP para a observação da formação de células bi e multinucleadas. A ponte intercelular também fica muito evidente durante a citocinese nesta linhagem, assim como a presença do corpo intermediário, possibilitando o estudo da regressão da citocinese apenas pela observação ao microscópio de luz.

Células RPE controle se dividiram de maneira bipolar, sendo que nenhuma divisão multipolar foi observada em nenhum dos experimentos realizados – cerca de 60 divisões foram analisadas. A regressão da citocinese também não ocorreu em nenhuma das mitoses analisadas. Os primeiros eventos da mitose que indicaram a entrada nesta fase do ciclo foram a perda de adesão ao substrato e arredondamento das células. Passados cerca de 30 minutos desse momento as células chegaram em metáfase e levaram mais cerca de 1h 30min para atingir o fim da citocinese. Vale ressaltar que o corpo intermediário foi observado em todas as divisões de células controle, sendo visível desde o início da citocinese (Fig. 20).

Após tratamento com crisotila por 24 h ou 48 h as células puderam entrar em divisão mitótica e progredir no ciclo celular, atingindo a citocinese em tempo semelhante ao das células controle. O corpo intermediário se formou na maioria dos casos analisados, onde muitas células completaram a citocinese em tempo normal. Porém, em quase metade das citocineses foram observadas fibras de crisotila na ponte intercelular que conferiram diferentes destinos às células observadas.

A regressão da citocinese, observada nas células HK2, também ocorreu em células RPE. Este foi um processo longo na maioria dos casos, e o intervalo de tempo entre a entrada da célula em anáfase e a regressão da citocinese levou em média 10 h (Fig. 21). Em todos os casos de regressão de citocinese o corpo intermediário foi observado ao longo de toda esta etapa, e em alguns casos a citocinese parecia estar completa quando ocorreu a regressão (Fig. 22 e 21 B). Como as células-filhas formadas sempre apresentaram mais de um núcleo, constatou-se que a regressão da citocinese foi um processo formador de células bi e multinucleadas na linhagem RPE após o tratamento com as fibras (Fig. 21, 22).

As células com fibras de crisotila na ponte intercelular também puderam completar a citocinese e gerar assim duas células-filhas. Uma das maneiras para que isso ocorresse foi a ruptura da membrana em um ponto da ponte intercelular após longo período em citocinese.

Nestes casos as células-filhas, ainda ligadas pela ponte intercelular, se distanciaram e a fibra pareceu tensionar a membrana, ocorrendo sua ruptura em um sítio mais distante do centro do corpo intermediário quando comparado ao local onde ocorre a abscisão das membranas em células controle – geralmente muito próximo ao centro do corpo intermediário. A fibra ainda permaneceu associada a uma das células-filhas (Fig. 23 A). Em outros casos a ruptura da membrana correu em dois pontos distantes do corpo intermediário, e a fibra foi solta no meio extracelular juntamente com a membrana da ponte intercelular, inclusive levando consigo o corpo intermediário (Fig. 23 B). Nesses dois casos as células foram capazes de provocar a abscisão das membranas próximas a extremidades da fibra, ou a própria fibra levou à ruptura da membrana. É válido lembrar que nenhum desses processos foi acompanhado de morte celular durante o período observado.

Outra forma das células completarem a citocinese mesmo com fibras presentes na ponte intercelular foi o direcionamento da fibra para uma das células-filhas, enquanto a membrana da ponte intercelular, contendo o corpo intermediário, foi direcionada para a outra célula-filha – como se a membrana da ponte intercelular que envolve a fibra neste momento deslizasse sobre a fibra (Fig. 24). De maneira geral, esses resultados evidenciam que as fibras frequentemente se localizam na ponte intercelular durante a citocinese podendo interferir neste processo de diferentes maneiras. Pode ocorrer a regressão da citocinese ou a completa separação das células-filhas com a abscisão das membranas, mas possivelmente por mecanismos diferentes dos que ocorrem em células controle.

Em relação à células bi e multinucleadas, ficou claro pelas observações que a regressão da citocinese é um processo importante na formação destas células. A observação de células bi e multinucleadas revelou que estas células entraram em mitose com menor frequência do que células mononucleadas e geraram mitoses multipolares que deram origem a três ou quatro células-filhas. Porém, em todos os casos observados ocorreu a fusão das células-filhas, resultando em apenas uma ou duas células-filhas, bi ou multinucleadas (Fig. 25 A e B). Ainda, quando duas células-filhas foram formadas após a fusão, observaram-se fibras na ponte intercelular, podendo ou não ocorrer a regressão da citocinese (Fig. 25 A e B). Esses dados revelam que células bi e multinucleadas são responsáveis pela formação de mitoses multipolares, que por sua vez contribuem para a formação de novas células multinucleadas.

Figura 20. Divisão mitótica de célula RPE controle. Células RPE controle foram observadas por *time-lapse* por períodos de até 30 h. As células controle se dividiram apenas de maneira bipolar, gerando duas células mononucleadas. O corpo intermediário (seta) nestas divisões foi sempre visível, e não foram observadas regressões de citocinese.

Figura 21. Regressão da citocinese em célula RPE tratada com crisotila. Células RPE foram tratadas com crisotila por 24 h e observadas por *time-lapse*. Foram observadas diversas células em divisão mitótica, e cerca de 50% delas apresentaram fibras na ponte intercelular. **A)** Regressão da citocinese em célula com fibras localizadas na ponte intercelular. O corpo intermediário se formou e após ele ser direcionado para uma das células-filhas ocorreu a regressão da citocinese e a formação de apenas uma célula-filha multinucleada; **B)** Regressão da citocinese em célula com fibra delgada na ponte intercelular. O corpo intermediário foi direcionado para uma das células-filhas, e as células emitiram outros prolongamentos além a ponte intercelular. A regressão da citocinese ocorreu cerca de 9 h após o início da observação, e gerou apenas uma célula-filha multinucleada.

Figura 22. Regressão da citocinese em célula RPE tratada com crisotila. Células RPE foram tratadas com crisotila por 24 h e observadas por *time-lapse*. A regressão da citocinese foi observada em muitas divisões após o tratamento com as fibras, e pode ocorrer após diferentes períodos de tempo em citocinese. No caso aqui apresentado célula entrou em mitose, dividiu gerando duas células-filhas, a ponte intercelular se formou e nela foram observadas fibras. Após 6h 30min de observação a citocinese parecia completa e o corpo intermediário já havia sido direcionado para uma das células-filhas. Porém, as células se aproximaram novamente e ocorreu a regressão da citocinese. Foi formada ao final do processo uma célula-filha multinucleada.

Figura 23. Ruptura da membrana durante a citocinese com fibra na ponte intercelular. Células RPE foram tratadas com crisotila por 24 h e observadas por *time-lapse*. A presença de fibras na ponte intercelular foi observada em cerca de 50% das citocineses, e pode ocasionar diferentes anormalidades nesse processo. **A)** A fibra na ponte intercelular pode levar ao tensionamento da membrana na ponte intercelular e a ruptura desta em um ponto. Neste caso a fibra foi direcionada para uma das células-filhas; **B)** A ruptura da membrana pode ocorrer em dois pontos da ponte intercelular, ocorrendo a liberação da fibra e parte da ponte intercelular (neste caso contendo o corpo intermediário) no meio extracelular.

Figura 24. Direcionamento da fibra e membrana para células opostas durante a citocinese. Células RPE foram tratadas com crisotila por 24 h e observadas por *time-lapse*. As fibras presentes na ponte intercelular interferiram na citocinese, levando à regressão deste processo ou a completa separação das células-filhas por mecanismos não observados no controle, como este aqui apresentado. Célula entrou em mitose bipolar e se dividiu em duas células-filhas. Porém, fibras se localizaram na ponte intercelular que se estendeu com a migração das células-filhas para direções opostas. A fibra foi direcionada para uma das células-filhas, enquanto a membrana da ponte intercelular, contendo o corpo intermediário, foi direcionada para a outra célula-filha.

Figura 25. Formação e destinos de mitoses multipolares. Células RPE foram tratadas com crisotila por 24 h e observadas por *time-lapse*. Foram observadas muitas células bi e multinucleadas, e algumas destas células progrediram no ciclo celular. **A)** Célula binucleada com fibras em seu citoplasma entrou em mitose multipolar, se dividiu em três células-filhas que logo se fundiram formando apenas duas células-filhas. Formou-se uma ponte intercelular com corpo intermediário e fibra de crisotila. A ponte se estendeu e após aproximadamente 5 h a citocinese foi concluída, e a fibra permaneceu em uma das células-filhas; **B)** Mitose multipolar gerou três células-filhas que logo se fundiram e formaram duas células-filhas. Ocorreu a formação do corpo intermediário entre as duas células, com fibras na ponte intercelular. Porém, em 40 minutos a ponte se desfez e foi formada apenas uma célula-filha multinucleada.

Alterações durante a citocinese: localização de proteínas por imunofluorescência

As observações por *time-lapse* de células tratadas com crisotila evidenciaram alterações durante a citocinese, incluindo a regressão deste processo. Dessa forma, decidimos investigar quais etapas da citocinese poderiam estar alteradas pelo tratamento com crisotila a partir do estudo da localização de diferentes proteínas associadas a este processo. Foram selecionadas proteínas que atuam em diferentes fases da citocinese e a localização destas foi verificada por imunofluorescência em células controle e tratadas com crisotila por 24 h e 48 h.

Conforme descrito na introdução (esquema na página 27), uma maneira de dividir as proteínas que formam o corpo intermediário durante a citocinese é separá-las em i) proteínas presentes no corpo central, como RacGAP1, MKLP1, Cep55; ii) proteínas da zona escura; iii) proteínas das zonas flangeadoras, como Aurora B e CenpE; iv) e proteínas relacionadas com os sítios de constrição e abscisão das membranas, como Septin 9, Anillin e Alix. Estas proteínas citadas como exemplos de cada fase da citocinese ou região do corpo intermediário foram as marcadas para a observação da citocinese no presente estudo. Desse modo, diferentes subestruturas do corpo intermediário foram analisadas, facilitando a observação de qual ou quais etapas da citocinese foram alteradas após o tratamento com crisotila em células RPE e HK2. As células RPE geralmente possuem pontes intercelulares mais longas do que as células HK2, assim a localização das proteínas torna-se mais evidente. Portanto, alguns resultados aqui discutidos serão apenas mostrados em imagens de células RPE.

Primeiramente foram avaliadas as proteínas do corpo central. MKLP1, RacGAP1 e Cep55 formaram anéis muito evidentes nos corpos centrais das células controle e tratadas com crisotila por 24 h e 48 h em ambas linhagens celulares, evidenciando que o tratamento não levou a alterações no padrão de localização dessas proteínas no corpo central durante a citocinese.

Em relação às proteínas das zonas flangeadoras foram analisadas Aurora B e Cenp E. Ambas se localizam nos cinetócoros durante a metáfase, enquanto durante a anáfase migram para a zona intermediária para depois participarem das zonas flangeadoras do corpo intermediário, adjacentes ao corpo central. Cenp E se localizou conforme o esperado em células RPE e HK2 controle. Durante a metáfase Cenp E permaneceu nos cinetócoros e durante a citocinese foi detectada nas zonas flangeadoras do corpo central inclusive após o tratamento com crisotila.

Já Aurora B apresentou alteração no seu padrão de localização após o tratamento, sugerindo o acúmulo da proteína na ponte intercelular e ocorrência de marcações adicionais (Fig. 26 A, B e C). Essas alterações foram denominadas “localização alterada”. Nas células

controle foi possível observar que em apenas 8,6% e 7,8% das citocineses em células RPE e HK2, respectivamente, a localização de Aurora B não se restringiu às zonas flangeadoras, e algumas estruturas maiores e muitas vezes circulares foram observadas (Fig. 26). Após o tratamento ocorreu aumento para até 37% de citocineses com localização alterada de Aurora B na linhagem RPE e 25% na linhagem HK2 (Fig. 26 D). As estruturas alteradas nas células tratadas foram frequentemente maiores do que as observadas no controle, indicando que o tratamento não só aumentou sua frequência como também as modificou (Fig. 26 e 27). A presença de fibras na ponte intercelular foi observada na maioria das citocineses que apresentaram alteração da localização de Aurora B tanto em células RPE quanto em células HK2 (Fig. 27 e 28).

Em relação às proteínas que participam dos sítios de constrição e abscisão, primeiramente foi analisada a localização de Septin 9 e Anillin, que mostram-se muito semelhantes durante a mitose e a citocinese normal: durante a anáfase se localizam na zona intermediária, próximas à membrana, no início da formação da ponte intercelular e no período de estabilização desta participam dos túbulos e protrusões de membrana, e em estágios intermediários e tardios da citocinese se localizam no corpo central, e depois migram também para os sítios de constrição, formando dois ou três anéis nesta etapa. Nas células RPE controle em citocinese Septin 9 se localizou, conforme esperado, principalmente nos sítios de constrição. Em menos que 10% das citocineses foram observados túbulos ou ainda estruturas diferentes das esperadas. Após o tratamento com crisotila por 24 h e 48 h foram observadas citocineses contendo túbulos em maior frequência, e também ocorreu a formação de estruturas semelhantes aos túbulos, porém muito maiores do que as observadas nas células controle. A localização de Septin 9 não ficou restrita ao corpo central e sítios de constrição, mas abrangeu todo o corpo central e laterais da ponte na grande maioria das citocineses (Fig. 29). Em células HK2 não foi possível verificar a localização de Septin 9, uma vez que o anticorpo não apresentou reatividade em nenhuma das condições testadas.

A localização de Anillin também se mostrou alterada após o tratamento com crisotila. Em células RPE controle a localização de Anillin ficou restrita ao corpo central e sítios de constrição em cerca de 85% das citocineses, e cerca de 15% das citocineses apresentaram a formação de túbulos ou localização de Anillin não restrita aos sítios de constrição e corpo central, chamados aqui de “localização alterada”. Após o tratamento com crisotila por 24 h ou 48 h ocorreu alteração da localização desta proteína, quando até 46% das citocineses apresentaram grandes estruturas, na maioria das vezes em forma de anéis e túbulos, podendo ocorrer por todo o corpo intermediário, mas principalmente concentradas no corpo central,

ou se formando a partir deles (Fig. 30). Essas estruturas são muito semelhantes aos túbulos observados em fases iniciais da citocinese em células controle, porém maiores. Nas células com alterações no padrão de localização de Anillin foi observada, na maioria dos casos, a presença de fibras de crisotila na ponte intercelular (Fig. 31). Em células HK2 as alterações observadas no padrão de localização de Anillin foram muito semelhantes às células RPE. Nas células controle a localização alterada de Anillin foi observada em 28,7% das citocineses, esse número aumentou para 36,1%, 52,2% e 58% após 24 h e 48 h de tratamento, e 48 h de tratamento seguido de 24 h de recuperação, respectivamente (Fig. 32 D). Novamente fibras de crisotila na ponte intercelular foram observadas na maioria dos casos com alterações de localização de Anillin (Fig. 32).

A terceira proteína analisada que participa das etapas finais da citocinese foi Alix, requerida a abscisão das membranas e assim detectada apenas em estágios avançados dessa etapa da divisão. Em células RPE controle, Alix foi observada apenas em estágios avançados da citocinese, formando sempre duas estruturas paralelas, ao redor do corpo central (Fig. 33 A). O tratamento com crisotila por 24 h e 48 h alterou a localização de Alix nessas células de forma muito evidente: não foram mais observadas duas estruturas paralelas ao redor do corpo intermediário, mas apenas uma no corpo central (Fig. 33 B e C). Em células HK2 o padrão de localização de Alix nas células controle não ficou tão evidente, sendo detectada apenas no corpo central em algumas, formando uma estrutura contínua ou distribuída em pontos pequenos e próximos. Porém não foram observadas as duas estruturas paralelas ocorridas nas células RPE (Fig. 34 A). Após o tratamento com crisotila Alix foi detectada de forma semelhante ao controle em relação a sua presença no corpo intermediário, porém foi possível observar que esta proteína também se localizou em regiões ricas em fibras de crisotila, tanto na ponte intercelular quanto no corpo celular de células interfásicas (Fig. 34 B e C).

Ainda foi avaliada a presença dos sítios de constrição nas pontes intercelulares em células controle e tratadas com crisotila, que ficam evidentes em células marcadas para tubulina acetilada. Em células controle RPE e HK2 57,67% e 71,94% das pontes intercelulares apresentaram um ou dois sítios de constrição, respectivamente. Após o tratamento com crisotila por 24 h ocorreu redução dessa frequência para 43% em células RPE e 45,48% em células HK2, e após 48 h de tratamento para 36% e 45,84% em células RPE e HK2, respectivamente. Em células HK2 ainda foi avaliada a presença dos sítios de constrição após 48 h de tratamento seguido de 24 h de recuperação, onde 46,27% das pontes intercelulares apresentaram sítios de constrição (Fig. 35).

Esses resultados demonstraram que as proteínas que participam da citocinese nas células controle continuam presentes nas células tratadas com crisotila, porém algumas apresentaram alteração no seu padrão de localização. De forma geral, ocorreram alteração na localização de Aurora B, uma quinase regulatória de citocinese, e na localização de proteínas relacionadas às etapas finais da citocinese, dentre elas Septin 9, Anillin, Alix, além da redução da frequência de pontes intercelulares com sítios de constrição.

D % de citocineses com localização alterada de Aurora B

Figura 26. Localização de Aurora B em células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila. Células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila por 24 h e 48 h foram submetidas à imunofluorescência para estudo da localização de Aurora B. **A)** Imagem da localização de Aurora B frequentemente observada em células RPE e HK2 controle, concentrada nas zonas flangeadoras, adjacentes ao corpo central; **B e C)** Padrão de localização de Aurora B alterado encontrado em células tratadas com crisotila por 24 h, formando anéis na região do corpo intermediário durante a citocinese; **D)** Quantificação da presença de Aurora B com localização não restrita às zonas flangeadoras em células RPE e HK2 controle (cont) e tratadas com crisotila por 24 h e 48 h (24 h criso e 48 h criso). O tratamento levou ao aumento da frequência de células com alteração no padrão de localização nas duas linhagens. Barra=10 µm.

Figura 27. Localização alterada de Aurora B em células RPE e sua correlação com a presença de fibras na ponte intercelular. Células RPE tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para investigação da localização de Aurora B. Fibras de crisotila em branco. Foram adquiridas também imagens em DIC para visualização do contorno das células e da presença de fibras na ponte intercelular. **A)** Citocinese com fibra na ponte intercelular e diversos anéis formados por Aurora B; **B)** Citocinese com fibra na ponte intercelular e localização de Aurora B no corpo central, e não apenas nas zonas flangeadoras. Barra=10 μ m.

Figura 28. Localização alterada de Aurora B em células HK2 tratadas com crisotila e sua correlação com a presença de fibras. Células HK2 tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção de Aurora B. Fibras de crisotila em branco. Foram adquiridas também imagens em DIC para visualização do contorno das células e da presença de fibras na ponte intercelular. **A)** Células-filhas em citocinese com fibras na ponte intercelular e padrão de localização alterado de Aurora B, concentrada no corpo intermediário e não restrita às zonas flangeadoras; **B)** Citocinese com fibra na ponte intercelular, e Aurora B presente nas zonas flangeadoras, porém se estendendo em direção ao corpo da célula-filha. Barra=10 μm.

Figura 29. Localização de Septin 9 em células RPE. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção de Septin 9. **A)** Células RPE controle apresentaram Septin 9 concentrada ao redor do corpo central durante a citocinese, formando na maior parte dos casos duas estruturas distintas, ou apenas uma adjacente ao corpo central; **B e C)** Após o tratamento com crisotila foram observadas estruturas grandes formadas por Septin 9, maiores do que as observadas nas células controle. Estas estruturas tiveram origem na região do corpo central, e concentraram-se nesta região (C) ou formaram estruturas alongadas em direção ao corpo de uma das células-filhas (B). Barra=10 μ m.

Figura 30. Localização de Anillin em células RPE controle e tratadas com crisotila. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para estudo da localização de Anillin. **A)** Células controle apresentaram Anillin frequentemente restrita aos sítios de constrição secundários (A) ou ao corpo central; **B e C)** O tratamento das células com crisotila por 24 h levou à alteração desse padrão de localização, e Anillin foi detectada formando túbulos e anéis concentrados próximos ao corpo central ou espalhados pelo corpo intermediário; **D)** Foi quantificado o número de citocineses com alteração do padrão de localização de Anillin, chamado aqui de “localização alterada”. Após o tratamento com crisotila por 24 h e 48 h ocorreu aumento da frequência de localização alterada dessa proteína. Barra=10 μ m.

Figura 31. Localização alterada de Anillin em citocineses de células RPE com fibras na ponte intercelular. Células RPE tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção de Anillin. Fibras de crisotila em branco. Foram adquiridas também imagens em DIC para visualização do contorno das células e presença de fibras na ponte intercelular. **A)** Citocinese com fibra localizada na ponte intercelular. Foi detectado acúmulo de Anillin no corpo central e zonas flancoadoras, formando uma estrutura grande nesta região; **B e C)** Células em citocinese com fibras localizadas na ponte intercelular. Anillin se localizou adjacente ao corpo central, mas também formou estruturas anelares e tubulares partindo do corpo central. Barra=10 μm.

A legenda dessa figura encontra-se no verso da página anterior

Figura 33. Localização de Alix em células RPE controle e tratadas com crisotila. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para estudo da localização de Alix. Foram também adquiridas imagens em DIC para visualização do contorno das células, ponte intercelular e da presença de fibras. Fibras de crisotila em branco. **A)** Células RPE controle só apresentaram marcação de Alix em estágios avançados da citocinese. Alix formou nessas células duas estruturas paralelas, ao lado da marcação de Anillin, que nesta etapa pode se concentrar em um ou dois pontos – na imagem em um; **B)** Citocinese com fibra de crisotila na ponte intercelular e com localização alterada de Anillin. Alix não formou as duas estruturas observadas nas células controle, e se manteve em apenas um ponto, co-localizado com uma das marcações de Anillin; **C)** Citocinese com fibra de crisotila na ponte intercelular apresentou alteração da localização de Anillin. Alix se localizou no centro da ponte intercelular formando apenas uma estrutura muito próxima à Anillin, e também formou outras estruturas próximas à fibra em uma das células-filhas. Barra=10 µm.

Figura 34. Localização de Alix em células HK2 controle e tratadas com crisotila. Células HK2 controle e tratadas com crisotila por 24 h foram submetidas à imunofluorescência para estudo da localização de Alix. Foram também adquiridas imagens em DIC para visualização do contorno das células, ponte intercelular e da presença de fibras. **A)** Nas células controle Alix foi detectada em poucas células em citocinese, com marcação muito delicada no corpo central. Nesta região apresentou-se de forma contínua ou em pequenos pontos; **B e C)** Após o tratamento com crisotila (em branco) por 24 h a localização de Alix ficou mais evidente, e, além de presente em alguns corpos centrais (localizados também por MKLP1), Alix foi observada junto às fibras de crisotila (setas). Barra=10 μ m.

A % de pontes intercelulares com sítios de constrição em células RPE

B % de pontes intercelulares com sítios de constrição em células HK2

Figura 35. Frequência de sítios de constrição em células RPE e HK2 tratadas com crisotila. Células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila por diferentes tempos foram submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti- α -tubulina acetilada para visualização dos sítios de constrição secundários na ponte intercelular. Ocorreu redução significativa da porcentagem de citocineses com sítios de constrição após o tratamento com crisotila nas duas linhagens (RPE em A e HK2 em B), em todos os tempos de tratamento e recuperação.

Expressão de genes relacionados com a citocinese e ciclo celular

A exposição às fibras de crisotila levou a diferentes alterações no ciclo celular de células RPE e HK2, além de modificações marcantes na mitose e citocinese. Foi investigado também se o tratamento altera os níveis transcricionais de genes relacionados com estes processos. Foram desenhados *primers* para detecção e quantificação da expressão de genes por PCR quantitativo. As reações foram feitas para células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila por 48 h em três experimentos independentes, e cada experimento teve as corridas feitas em triplicata. A análise da expressão foi feita considerando a massa de RNA total, e o controle sempre foi considerado como 1,00.

Em relação à citocinese, foram avaliados os níveis de transcrição dos genes Aurora A, Aurora B, MKLP1, CenpE, Anillin, Septin 2, Septin 7. Dentre estes genes, apenas MKLP1 e Septin 7 não sofreram alteração de expressão nas duas linhagens analisadas após o tratamento com crisotila. Na linhagem RPE, Aurora A e Cenp E também não apresentaram alteração de expressão. Ocorreu aumento de expressão de Aurora B e Septin 2 nas duas linhagens. Em células HK2 também houve aumento de expressão de Cenp E e Aurora A. Já os níveis de Anillin se mostraram alterados após o tratamento nas duas linhagens, porém a linhagem RPE apresentou redução de expressão e a linhagem HK2 aumento (Fig. 36 A e A').

Foram também analisados genes relacionados à citocinese que atuam no processo de abscisão: CHMP4, CHMP3 e CHMP3.1 (variante 1) e TSG101, que são componentes dos complexos ESCRT, e Alix. Após o tratamento com crisotila as duas linhagens apresentaram aumento de expressão de TSG101, sendo este mais evidente nas células RPE. Em ambas linhagens não ocorreu alteração na expressão de CHMP3. Já a análise da expressão de CHMP3.1 evidenciou aumento de sua expressão apenas em células HK2. A análise da expressão de CHMP4 evidenciou que não ocorreu alteração de sua expressão após o tratamento com crisotila na linhagem RPE, mas na linhagem HK2 os dados obtidos não foram conclusivos – os resultados dos três experimentos foram muito diferentes, alternando entre aumento e redução da expressão (Fig. 36 B e B').

Esses resultados indicam que o tratamento com crisotila levou a alterações na expressão de genes que participam da citocinese nas duas linhagens analisadas. De maneira geral, a linhagem HK2 apresentou aumento da expressão de genes ligados à citocinese, sendo que as maiores alterações não ocorreram em genes relacionados diretamente com o processo de abscisão, mas sim em genes que atuam principalmente durante as etapas iniciais e intermediárias da citocinese, incluindo proteínas requeridas para a formação dos sítios de constrição secundários (Aurora B, Cenp E, Septin 2 e Anillin). A linhagem RPE apresentou

alteração da expressão de três genes cujas proteínas participam da formação dos sítios de constrição secundários durante a citocinese (aumento de Aurora B e Septin2, e redução de Anillin), e também aumento da expressão de dois genes relacionados principalmente com o processo de abscisão (TSG101 e CHMP3.1).

Figura 36. Expressão de genes relacionados com a mitose e citocinese em células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila. A expressão de genes relacionados com a mitose e principalmente com a citocinese foi avaliada por PCR quantitativo. É apresentada a expressão de genes em células RPE e HK2 tratadas com crisotila por 48 h em relação a expressão detectada nas células controle, que foi estabelecida como 1. **A e A')** Expressão de genes relacionados com a mitose e citocinese. Células RPE apresentaram aumento da expressão de Aurora B e Septin 2, e redução da expressão de Anillin (A). Células HK2 apresentaram aumento da expressão de Aurora A, Aurora B, CenpE, Anillin e Septin 2 (A'); **B e B')** Expressão de genes relacionados principalmente ao processo de abscisão das membranas. Na linhagem RPE ocorreu aumento da expressão de TSG101 e CHMP3.1 (B); nas células HK2 foi detectado aumento da expressão de TSG01 e Alix (B').

Relação entre as fibras de crisotila, corpos intermediários pós-mitóticos e vesículas autofágicas

A investigação da localização das proteínas que participam da citocinese em células tratadas com crisotila gerou dois resultados que estão relacionados com outro aspecto sobre as fibras de crisotila: sua interação com vesículas intracelulares.

O primeiro resultado, conforme já citado, foi a detecção de Alix junto às fibras, indicando que as fibras podem estar interagindo com vesículas membranosas dentro das células, uma vez que essa proteína participa na formação de vesículas determinando a fusão/fissão das membranas. O segundo resultado foi em relação à proteína MKLP1, que se localiza no corpo central durante todo o processo de citocinese e ainda é marcadora de corpos intermediários pós-mitóticos. Células RPE e HK2 apresentaram corpos intermediários pós-mitóticos retidos em células interfásicas, identificados e quantificados pela marcação com MKLP1, onde 10,82% das células RPE controle e 16,1% das células HK2 controle em cultura apresentaram corpos intermediários pós-mitóticos. Após o tratamento com crisotila por 48 h ocorreu aumento do número de células com corpos intermediários pós-mitóticos para 20,51% e 27,5% na linhagem RPE e HK2, respectivamente (Fig. 37 A e B). Em células HK2 ainda foi avaliada a presença dos corpos intermediários pós-mitóticos após 24 h de tratamento com crisotila e após 48 h de tratamento seguido de 24 h de recuperação, quando a frequência dessas estruturas se manteve aumentada em 34,16% e 29,96%, respectivamente (Fig. 37 B).

Corpos intermediários pós-mitóticos, quando retidos intracelularmente, são degradados pela maquinaria de autofagia. Assim, uma das possíveis causas para o aumento do número destas estruturas após o tratamento com crisotila é a redução na atividade autofágica. Decidimos então investigar a presença de vesículas autofágicas em células RPE através da marcação com anticorpo anti-LC3. Células controle apresentaram vesículas positivas para LC3 espalhadas pelo citoplasma, mas principalmente presentes na região perinuclear. Após o tratamento com crisotila por 24 h LC3 se acumulou junto às fibras de crisotila, muitas vezes marcando toda a extensão das fibras. Após 48 h de tratamento a grande maioria das vesículas parecia estar associada às fibras, havendo poucas vesículas livres na região perinuclear (Fig. 38).

A atividade da maquinaria autofágica também foi verificada por PCR quantitativo com *primers* para LC3A e LC3B. Os resultados provenientes de três experimentos não foram conclusivos em relação à expressão de LC3A na linhagem HK2 e de LC3B na linhagem RPE, já que as alterações observadas não ocorreram de forma uniforme. Porém, a análise da expressão de LC3A foi possível na linhagem RPE e de LC3B na linhagem HK2. Após o

tratamento com crisotila ocorreu aumento da expressão de LC3A na linhagem RPE, chegando a ter o dobro da expressão observada na condição controle. A expressão de LC3B apresentou aumento na linhagem HK2, chegando a ser até 4 vezes maior após o tratamento com crisotila (Fig. 39).

Esses resultados mostram que as fibras de crisotila quando internalizadas associam-se à LC3 e levam a redução do número de vesículas autofágicas livres no citoplasma. O tratamento causou também o aumento da expressão de genes relacionados à maquinaria autofágica.

Figura 37. Porcentagem de células RPE e HK2 com corpos intermediários pós-mitóticos. Células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila por diferentes tempos foram submetidas à imunofluorescência com o anticorpo anti-MKLP1 para visualização dos corpos intermediários pós-mitóticos. Foram quantificadas as células que apresentaram essas estruturas, e verificou-se que após o tratamento com crisotila por 48 h ocorreu aumento de células que contem essa estrutura nas duas linhagens celulares (RPE em A e HK2 em B). Na linhagem HK2 foi feito o estudo em diferentes tempos de tratamento, e o aumento da porcentagem de células com corpos intermediários pós-mitóticos foi maior em todos eles quando comparado ao controle.

Figura 38. Localização de LC3 em células RPE controle e tratadas com crisotila. Células RPE controle e tratadas com crisotila por 48 h foram submetidas à imunofluorescência com o anticorpo anti-LC3 para visualização das vesículas autofágicas. Fibras de crisotila em branco. Imagens em DIC também foram adquiridas para visualização do contorno das células, fibras e núcleos. **A)** Células controle apresentaram diversas vesículas autofágicas concentradas principalmente na região perinuclear; **B e C)** Após 48 h de tratamento LC3 foi observado associado às fibras, chegando a recobri-las. Poucas vesículas autofágicas não associadas às fibras foram observadas. Fibras localizadas na ponte intercelular durante a citocinese também mostraram-se recobertas por LC3 (B).

Expressão gênica de LC3A e LC3B em células RPE e HK2

Figura 39. Expressão de genes relacionados com a maquinaria autofágica em células RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila. A expressão dos genes LC3A e LC3B, relacionados à maquinaria autofágica, foi analisada em células RPE e HK2 tratadas com crisotila por 48 h em relação a expressão detectada nas células controle. Células RPE apresentaram aumento da expressão de LC3A após o tratamento, e células HK2 apresentaram aumento da expressão de LC3B.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram investigadas as alterações causadas por fibras de crisotila em células humanas epiteliais normais e tumorais com foco no entendimento dos processos que originam células aneuploides após o tratamento com crisotila. Já havia sido reportado que as fibras induzem aneuploidia, formação de células bi e multinucleadas e mitoses multipolares. Entretanto, ainda não havia sido estabelecida a causa da amplificação centrossômica e se este processo é realmente o principal responsável pela formação das células aneuploides.

Alterações de ploidia, morfologia, ciclo e proliferação celular e sua relação com a amplificação centrossômica

Foram avaliadas as alterações do ciclo celular, por diferentes metodologias, em células RPE, uma linhagem de células humanas de origem epitelial normal. Por citometria de fluxo foi verificado que o tratamento com crisotila leva ao aumento da população de células hipodiploides, que são associadas à morte celular. Contudo esse aumento foi discreto e a observação da cultura por microscopia de luz e de fluorescência não evidenciou a presença significativa de células em apoptose, revelando que a indução de apoptose não é uma resposta marcante ao tratamento com crisotila nessas células. Resultados semelhantes foram observados em células tumorais HK2 tratadas com crisotila, sendo que as maiores frequências de apoptose foram encontradas após 24 h e 48 h de recuperação após o tratamento (Cortez & Machado-Santelli, 2008). A morte celular induzida por crisotila ocorre via apoptose, conforme observado por trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro* (Burmeister *et al.*, 2004; Kido *et al.*, 2008). Este processo parece ser induzido pela presença de espécies reativas de oxigênio. Outros tipos de asbesto que contêm maior quantidade de metais em sua superfície do que a crisotila – e assim estão relacionados com a maior produção de espécies reativas de oxigênio – induzem maiores taxas de morte celular via apoptose (Broaddus *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000). Alguns dos estudos que detectaram um grande aumento de apoptose em células em cultura utilizaram concentrações de crisotila mais altas do que as utilizadas no presente estudo. A morte celular também foi observada em experimentos *in vivo* (Kido *et al.*, 2008). Porém, nos tecidos existem distintos tipos celulares que podem responder de maneira diferente a presença das fibras, e ainda liberam diversas moléculas sinalizadoras que podem interferir nas respostas celulares, tornando difícil a comparação entre os modelos.

Algumas diferenças entre o ciclo celular de células RPE e HK2 foram observadas após o tratamento com crisotila. O tratamento das células RPE com crisotila levou a redução de

células G0/G1, mas esta redução foi mais evidente em células tumorais HK2 tratadas com crisotila. Células HK2 também mostraram aumento da população G2/M após o tratamento (Cortez *et al.*, 2011), já células RPE tratadas não apresentaram alteração nesta população. Estudos utilizando outras linhagens tumorais, normais e ou células transformadas também verificaram aumento da população em G2/M após o tratamento (Levresse *et al.*, 1997; Cortez *et al.*, 2011). Já a análise do índice mitótico revelou que células RPE tratadas com crisotila têm redução da frequência de células em mitose, e a curva de crescimento também apontou para a redução da proliferação. A análise da incorporação de BrdU, ensaio específico para detecção de fase S do ciclo celular, mostrou que após o tratamento células diploides e tetraploides/hipertetraploides são capazes de entrar em fase S, e o número total de células nesta fase manteve-se similar as células controle. Dessa forma, a manutenção da população em G2/M observada por citometria de fluxo pode ser resultado do aumento de células em G2 e redução de células em M. Outro fator que pode levar à manutenção da população em G2/M mesmo com a redução da proliferação destas células é a formação de células tetraploides, fato observado por outras metodologias empregadas no presente estudo (contagem dos cromossomos e cinetócoros e observação das células por *time-lapse*).

Por citometria de fluxo também foi detectado aumento de células hipertetraploides, um indicador da formação de células com conteúdo de DNA aumentado. O aumento em células RPE foi de aproximadamente 4% após o tratamento de 48 h com crisotila, semelhante ao observado em células HK2 (Cortez & Machado-Santelli, 2008). A análise da contagem dos cromossomos também revelou a formação de células com aproximadamente o dobro do número de cromossomos após a exposição às fibras. Os resultados a partir das preparações metafásicas indicam que as células com o número aumentado de cromossomos são capazes de progredir no ciclo celular e entrar em mitose tanto na linhagem tumoral quanto na linhagem normal. Células HK2 apresentaram, logo após o tratamento, aumento do número de células com conteúdo cromossômico similar ao tetraploide, porém após períodos de recuperação ocorreu aumento de células com número de cromossomos variados, entre o conteúdo diploide e o tetraploide. Já células RPE não apresentaram essa variação no número de cromossomos após o tratamento e períodos de recuperação, sendo que o aumento se concentrou nos intervalos correspondentes à mitoses tetraploides. Estes resultados indicam o tratamento seguido de períodos de recuperação em células HK2 leva à formação de células com conteúdos cromossômicos variados, e que estas células são capazes de progredir no ciclo celular e entrar em fase M novamente. Isso não ocorre em células RPE: nestas células normais não ocorreu a formação de células com conteúdos variados de cromossomos, ou estas células

foram formadas, mas não foram capazes de entrar em mitose novamente. Células normais devem então dispor de mecanismos regulatórios que não permitem que células com conteúdo cromossômico diferentes do diploide e do tetraploide proliferem.

A análise do número de cromossomos também revelou outra semelhança em células RPE e HK2 após o tratamento com crisotila e períodos de recuperação: ocorreu aumento do número de mitoses com número de cromossomos ligeiramente inferior que o considerado diploide. Esse aumento foi mais evidente nas células HK2, o que é esperado, já que estas células na situação controle apresentam conteúdo de cromossomos aumentado, e perdas de cromossomos nessas células não devem ser tão deletérias quanto a perda em células RPE, que na situação controle apresentam 46 cromossomos (Weaver & Cleveland, 2008; Williams *et al.*, 2008). Estudos também indicam que células com redução do número de cromossomos podem proliferar mais rapidamente do que células com ganho de cromossomos (Weaver & Cleveland, 2008), o que pode aumentar a frequência destas células na cultura e nas preparações metafásicas.

A presença de células tetraploides com posterior formação de células aneuploides pode ser um mecanismo que favorece a formação dos tumores (Ganem *et al.*, 2007). Os dados aqui mostram que esse processo pode ocorrer em células tratadas com crisotila, e podem assim ter influência do desenvolvimento dos tumores após a exposição á fibras. Como nas duas linhagens não foram observadas altas taxas de morte celular após o tratamento com crisotila, os resultados indicam que as células tetraploides e aneuploides formadas foram viáveis. Células normais RPE aneuploides não foram capazes de proliferar, mas certamente foram formadas após a ocorrência de mitoses multipolares. A proliferação destas células não foi verificada pelos métodos aqui empregados dentro dos intervalos estabelecidos para os experimentos, mas isso pode não refletir uma situação *in vivo*, quando estas células, ou algumas delas, podem ser capazes de proliferar. As consequências da proliferação das células aneuploides foram observadas nas células HK2, que evidenciaram que células com conteúdos variados de cromossomos podem se formar, e podem assim ter relação com a tumorigênese ou progressão tumoral.

A análise da morfologia celular após o tratamento com crisotila revelou que as células normais e tumorais apresentaram muitas semelhanças. As principais alterações nas duas linhagens foram o aumento da frequência de células com mais de um núcleo, formação de células com amplificação centrossômica e mitoses multipolares. Dessa forma, verificou-se que a amplificação centrossômica não é uma resposta ao tratamento com fibras restrito às células tumorais. Foi objetivo do presente estudo a investigação da causa dessa amplificação após o

tratamento com crisotila, uma vez que este processo pode ser o principal responsável pela formação de células aneuploides. Primeiramente foi analisada a morfologia dos centrossomos em células controle e células tratadas com amplificação centrossômica. Estas últimas apresentaram todas as proteínas centrossômicas esperadas, e não foram observados focos de matriz pericentriolar sem a presença das proteínas marcadoras dos centríolos. Isso demonstra que não houve fragmentação da matriz pericentriolar, indicando que esta não deve ser a causa da amplificação centrossômica.

Um segundo processo que leva à amplificação centrossômica é a reduplicação dos centríolos durante o ciclo celular, resultado de anormalidades no ciclo centrossômico. A verificação deste tipo de anomalia é feita a partir da observação do número de centríolos por centrossomo, e ainda pelo balanço entre a quantidade de centríolos-mãe e centríolos-filhos. No presente estudo foram encontradas anomalias no número de centríolos majoritariamente em células com mais de um núcleo nos dois tipos celulares analisados. Considerando-se que células com mais de um núcleo são resultados de falhas na divisão celular, é esperado que também apresentem amplificação centrossômica. Além do mais, se essas células forem capazes de entrar novamente no ciclo celular, durante a fase S os centrossomos serão novamente duplicados tornando os níveis de amplificação ainda maiores – até oito centríolos poderão ser observados nestas células –, e a análise do balanço entre centríolos-mãe e centríolos-filhos se torna mais complexa. Mesmo assim, na maioria dos casos, os níveis de amplificação centrossômica observados em células tratadas com crisotila foram condizentes com os esperados em células que sofreram falhas na divisão celular e continuaram proliferando.

Outro resultado que dá suporte à hipótese de que a amplificação centrossômica é resultado da falha na citocinese é a formação de mitoses multipolares. Se a falha na citocinese é o processo responsável pela formação de células bi e multinucleadas, estas certamente apresentam amplificação centrossômica e irão formar mitoses multipolares na próxima fase M. Nos experimentos de *time-lapse* com células HK2 e RPE, mitoses multipolares foram formadas principalmente a partir de células bi e multinucleadas, sugerindo que a amplificação centrossômica é resultado da falha na citocinese.

Uma vez que a falha da divisão celular leva à formação de células com conteúdo duplicado de centrossomos e cromossomos, a correlação entre o número de centrossomos e cromossomos pode indicar se a amplificação centrossômica observada após o tratamento com crisotila é decorrente da falha na divisão. Foi então verificado o número de cromossomos e centrossomos em células mitóticas RPE e HK2 controle e tratadas com crisotila. Células RPE e

HK2 multipolares após o tratamento apresentaram, de forma geral, o dobro do número de cinetócoros do que o observado em mitoses bipolares. Esses dados reunidos sugerem que a amplificação centrossômica observada em células tumorais e normais após o tratamento com as fibras, estando associada a células multinucleadas e a mitoses com o aumento do número de cromossomos, é resultado principalmente da falha na divisão celular.

Investigação da falha na citocinese em células tratadas com crisotila

Falhas na citocinese foram observadas em células em cultura expostas a asbestos por microscopia de luz, quando longas fibras foram observadas entre as duas células-filhas (Jensen & Watson, 1999). Fibras na ponte intercelular foram também observadas em outros estudos com células em cultura (MacCorkle *et al.*, 2006; Cortez & Machado-Santelli, 2008), evidenciando que nas etapas finais da divisão celular as fibras tendem a se localizar nessa região. Porém estes trabalhos não investigaram as causas da falha na citocinese e quais os mecanismos que levam à sua regressão e à formação de apenas uma célula-filha.

Nas duas linhagens celulares aqui estudadas, após 24 h e 48 h de tratamento com fibras de crisotila até metade das citocineses observadas apresentaram fibras na ponte intercelular. Os destinos destas células foram estudados em maior detalhe na linhagem RPE. Foi observado o alongamento da ponte intercelular seguido de ruptura da membrana, ocasionando o direcionamento da fibra para uma das células-filhas, ou ainda a liberação da fibra no meio extracelular junto da ponte intercelular e corpo intermediário. A ruptura da membrana ocasionada pela presença de fibra já havia sido observada por Jensen e Watson (1999), porém não havia sido até então reportada a ruptura da membrana em dois pontos seguida da liberação da fibra no meio extracelular. Esta é a primeira vez que foi observada a fibra sendo liberada pela célula sem ser acompanhada de morte celular.

O destino de citocineses com fibras na ponte intercelular mais frequente foi a regressão deste processo seguido da formação de uma célula-filha com mais de um núcleo. A regressão ocorreu após mitoses bipolares e também multipolares, e levou à formação de células bi e multinucleadas. O corpo intermediário foi observado em todas as citocineses que sofreram regressão, evidenciando que a formação da ponte intercelular ocorreu normalmente até certo ponto. Foi investigada então, através da localização de proteínas que participam de diferentes fases da citocinese, qual etapa da citocinese é alterada após o tratamento com as fibras e como as alterações encontradas podem estar relacionadas à falha e regressão da citocinese.

A análise da localização das proteínas que participam da citocinese em células controle e tratadas com crisotila revelou dados interessantes sobre a interferência das fibras nestas células. Proteínas que se localizam nos cinetócoros, depois na zona intermediária durante a anáfase e ponte intercelular durante a citocinese não sofreram alterações de localização que pudessem ser observadas ao microscópio confocal de varredura a laser. Já proteínas que têm participação importante nas etapas finais da citocinese, como Anillin, Septin 9 e Alix, e a quinase Aurora B que regula a citocinese, se localizaram na ponte intercelular mas formaram estruturas morfológicamente distintas das observadas nas células controle.

Em relação a Septin9 e Anillin, os dados obtidos em células RPE apresentaram alterações muito semelhantes na localização destas duas proteínas, com o aumento da formação de estruturas tubulares e formação de estruturas maiores do que as observadas nas células controle. Septin 9 não foi detectada em células HK2, pois o anticorpo não mostrou reatividade, mas os dados semelhantes em relação à localização de Anillin e Aurora B nas duas linhagens nos fazem imaginar que a localização de Septin 9 também esteja alterada em células HK2 tratadas com crisotila. Em relação à Anillin, seu padrão de localização tubular ocorreu em cerca de 15% e 28% das citocineses em células controle RPE e HK2, respectivamente, indicando que estas células estavam provavelmente em estágios iniciais da formação da ponte intercelular, quando ocorre a formação destas estruturas tubulares. A frequência mais alta encontrada em células HK2 pode ser decorrente de sua origem tumoral ou das diferenças entre os tipos celulares quanto ao intervalo de tempo de cada etapa da citocinese. Nas duas linhagens após o tratamento com crisotila cerca de metade das células em citocinese apresentou estruturas tubulares com Anillin, ou ainda estruturas maiores e mais evidentes. Estas estruturas ocorreram mesmo em células com pontes intercelulares longas e estreitas, incompatíveis com a morfologia do início da formação das pontes, evidenciando a ocorrência de alteração no padrão de localização da proteína, e não apenas a ocorrência de um intervalo de tempo maior para a estabilização da ponte intercelular. Alguns trabalhos também mostram que Anillin e Septinas se localizam inicialmente no centro do corpo intermediário e depois migram para as futuras regiões dos sítios de constrição, sendo assim candidatas a determinantes da localização destes sítios (Hu *et al.*, 2012). As células tratadas com crisotila apresentaram estruturas formadas por Anillin (nas duas linhagens) e Septin 9 (na linhagem RPE) maiores do que as observadas no controle, mas não foi observado posicionamento da proteína nos presuntivos sítios de constrição. O não direcionamento dessas proteínas aos

sítios de constrição pode levar a não determinação destes sítios, comprometendo o processo de citocinese.

A localização alterada de Alix após o tratamento, principalmente nas células RPE, indica que esta proteína não foi capaz de migrar para os sítios de constrição secundários e para o futuro sítio de abscisão, o que implicaria em anormalidades no processo de abscisão (Morita *et al.*, 2007; Carlton *et al.*, 2008; Ettinger *et al.*, 2011). Também ocorreu redução na formação dos sítios de constrição secundários observados pelo *gap* na estrutura de microtúbulos na ponte intercelular. Esses sítios correspondem aos locais onde as proteínas responsáveis pela determinação do sítio de abscisão das membranas se direcionam, como Anillin e Septin 9, sendo uma etapa importante na progressão da citocinese. A detecção exata do sítio de abscisão depende da localização dos complexos ESCRT, e ainda está em discussão se esse ponto corresponde a um dos sítios de constrição secundária ou se o complexo ESCRT irá se instalar em local próximo a um desses sítios (Elia *et al.*, 2012; Renshaw *et al.*, 2014). Anillin e Septin 9 não se localizam no sítio de abscisão das membranas, mas parecem ter influência na sua determinação. A presença ou ausência dos túbulos no início da citocinese se correlaciona com o estreitamento da ponte intercelular, que é fator importante para a abscisão, evidenciando mais uma vez a importância do correto posicionamento das Septinas e Anillin para a abscisão (Zhao & Fang, 2005; Renshaw *et al.*, 2014). Nas células tratadas com crisotila essas proteínas tiveram seu padrão de localização alterado, o que pode então resultar no não amadurecimento e estreitamento da ponte intercelular, indeterminação dos sítios de constrição secundários e na consequente não formação dos sítios de abscisão.

Em relação à expressão de genes envolvidos na mitose e citocinese, as duas linhagens apresentaram alterações na expressão de alguns deles. Algumas alterações não foram compartilhadas pelas células HK2 e RPE, mostrando que as células podem ter respostas diferentes à presença de fibras. Porém, outras alterações ocorreram em células tumorais e normais, como alteração da expressão de Septin 2, Aurora B, TSG101 (aumento da expressão nas duas linhagens) e Anillin (redução em células RPE e aumento em células HK2). Esses genes codificam proteínas relacionadas com as etapas da citocinese que se mostraram alteradas quando observadas as células submetidas à imunofluorescência, sendo que alterações na localização de Aurora B, Anillin e Septin 9 – proteína da mesma família que Septin 2 – também foram observada nas células fixadas. A localização alterada dessas proteínas pode ser em decorrência da alteração dos seus níveis de RNAm e assim dos seus níveis proteicos. As alterações de expressão podem representar respostas das células quando elas não são capazes de realizar a citocinese devido a presença de fibras. Porém, outros estudos devem ser

realizados a fim de investigar se a alteração de expressão destes genes é causa ou consequência da falha na citocinese após a exposição às fibras.

Logo, os dados acima apontam que o tratamento com crisotila não afeta o recrutamento das proteínas que formam o anel contrátil, a ponte intercelular, os anéis do corpo central do corpo intermediário e o recrutamento de proteínas necessárias à abscisão para a ponte intercelular. Porém, ocorre alteração no padrão de localização de algumas proteínas importantes para a citocinese na ponte intercelular. A estabilização da ponte pode ser afetada, uma vez que os túbulos de Anillin e Septin são mais frequentes e maiores em células tratadas com crisotila. Essas proteínas não se restringem ao corpo central tardio e também não migram para os sítios de constrição secundários. Assim estes não são determinados, conforme evidenciado pela marcação com tubulina. A indeterminação dos sítios de constrição secundários deve bloquear a progressão da citocinese, sendo que a próxima etapa seria a formação do sítio de abscisão. Dessa forma, Alix e outras proteínas relacionadas com a abscisão não migram para este sítio, levando a falha na citocinese.

Fibras de crisotila foram observadas na maioria das citocineses avaliadas, porém em alguns casos não foi possível detectá-las na ponte intercelular pelos dois sistemas utilizados – microscopia de luz (DIC ou contraste de fase) e ao microscópio confocal pela sua autofluorescência. É sabido que as fibras, ao serem mantidas a 37°C e internalizadas pelas células, sofrem processos de fragmentação, levando à formação de fragmentos de fibras menores até que 1 µm. Talvez as abordagens utilizadas para detecção das fibras não sejam sensíveis o suficiente para observar estes pequenos fragmentos, que poderiam também interferir na etapa da citocinese, levando a alterações neste processo. Outra possibilidade ainda é que a presença das fibras na ponte intercelular não seja necessária para que as alterações na citocinese ocorram. Porém, esta possibilidade é menos provável, uma vez que as fibras representam uma barreira física e assim devem ter grande influência nesse processo.

O papel das fibras no desencadeamento das alterações observadas na citocinese ainda necessita ser discutido. A presença das fibras representa uma barreira física à citocinese, mas qual etapa do processo seria responsável por detectar e responder à presença das fibras? Nossos dados sugerem que as primeiras alterações na citocinese ocorrem na localização de Anillin e Septin, muito provavelmente nas etapas de estabilização da ponte intercelular e determinação dos sítios de constrição. A presença das fibras então pode afetar a estabilização da ponte intercelular, dificultando seu amadurecimento e ocasionando a falha na citocinese. Ainda mais, foi observada alteração na expressão de genes envolvidos nessas etapas, indicando que a resposta das células à presença de fibras inclui também processos

regulatórios da transcrição de genes relacionados com a citocinese. Essa ideia é ainda corroborada por estudos que mostram que a falha apenas no processo de abscisão não leva à regressão da citocinese, mas faz com que as células permaneçam conectadas pela ponte intercelular, sem que ocorra a fusão dos corpos celulares (Elia *et al.*, 2011; Carlton *et al.*, 2012). Já falhas em etapas anteriores no processo de citocinese levam à sua regressão e à formação de células bi e multinucleadas, algo semelhante ao que foi observado em células tratadas com crisotila.

Relação entre vesículas autofágicas, mecanismos de fusão de membranas e fibras de crisotila

Como apresentado na introdução, o corpo intermediário após a citocinese pode ser incorporado por uma das células-filhas ou pode ser liberado no ambiente extracelular. Estes diferentes destinos de corpos intermediários pós-mitóticos se relacionam com a presença de células-tronco, tumorais ou ainda com processos de diferenciação (Ettinger *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013), e, desta forma, podem também ter papel importante no comportamento de células após a internalização das fibras.

Após o tratamento com crisotila foi observado o aumento do número de células com corpos intermediários pós-mitóticos nas duas linhagens estudadas. Parte desse aumento foi devido à falha na citocinese, que provoca incorporação da ponte intercelular pela célula-filha e assim dá origem a células geralmente com mais de um núcleo e um corpo intermediário pós-mitótico. No entanto, foi também observado grande número de células mononucleadas com corpos intermediários pós-mitóticos após o tratamento com crisotila, o que nos fez buscar outros processos que poderiam resultar no aumento da frequência com que essas estruturas aparecem. Essa investigação gerou resultados interessantes que abriram novos caminhos à respeito das alterações celulares causadas pelas fibras.

Uma primeira possibilidade considerada para o aumento de células com corpos intermediários pós-mitóticos após o tratamento com as fibras consiste na redução da segunda abscisão da membrana após a citocinese, levando à redução da frequência de liberação dos corpos intermediários para o meio extracelular. Essa segunda abscisão é mediada por Alix e TSG 101 (Morita *et al.*, 2007), proteínas que participam da fissão de membranas. Duas alterações no padrão de localização de Alix foram observadas após o tratamento com crisotila: durante a citocinese, quando se concentrou no corpo central, e em células interfásicas ou no final da divisão celular, quando Alix se associou às fibras mesmo quando estas estavam posicionadas na ponte intercelular. Dessa forma, é possível que a presença das fibras altere a

localização e função de Alix, levando à redução da liberação dos corpos intermediários após a citocinese. Após o tratamento com crisotila os níveis de expressão de TSG 101 também se mostraram aumentados, sugerindo que o tratamento também tenha causado algum efeito sobre os níveis dessa proteína.

Um estudo de 1990 mostrou que vesículas lipídicas unilamelares – modelos que mimetizam a membrana plasmática – têm afinidade por fibras de amianto crocidolita e crisotila. As vesículas ficam aderidas às fibras, e as membranas passam a apresentar maior rigidez. Os autores sugerem que o amianto pode interferir em processos celulares como fagocitose, migração e metabolismo, e podem eventualmente desencadear a morte celular devido a sua ação sobre as membranas (Gendek & Brody, 1990). Estudos também evidenciam que as fibras de asbestos, como a crisotila, apresentam afinidade por ácidos nucleicos e por membranas, e, se colocadas em solução com plasmídeos e depois em contato com células de mamífero ou bactérias, são capazes de mediar transfecções e transformações (Appel *et al.*, 1988; Yoshida *et al.*, 2007). Esses estudos em conjunto evidenciam que as fibras possuem afinidade por diferentes membranas. Dados do presente estudo evidenciaram que as fibras possuem afinidade por possíveis vesículas membranosas marcadas por Alix, e também por vesículas positivas para LC3. As fibras podem então, ao interagir com diferentes membranas, causar um grande estresse celular, alterando o metabolismo das células e assim contribuindo as para alterações causadas pelas fibras, como morte celular e redução de proliferação. Ainda, para que a citocinese se complete é necessário intenso tráfego de vesículas e processos de fusão e fissão de membranas na ponte intercelular (Schiel *et al.*, 2013). Assim, as alterações nas membranas provocadas pelas fibras poderiam interferir nesses processos, comprometendo inclusive a citocinese.

A segunda possibilidade é a redução na degradação dos corpos intermediários pós-mitóticos pela via autofágica. No presente estudo foi realizada a observação de vesículas autofágicas através do uso do anticorpo LC3, que em células tratadas com crisotila evidenciou a presença de LC3 associado às fibras, chegando a recobri-las por toda a sua extensão. Após 48 h de tratamento, em algumas células não foram observadas vesículas livres no citoplasma, mas apenas associadas às fibras. A ausência de vesículas autofágicas livres no citoplasma pode causar um estresse na via autofágica, comprometendo a degradação de estruturas celulares como os corpos intermediários pós-mitóticos (Kuo *et al.*, 2011). Ainda, por PCR quantitativo foram detectados os níveis de transcrição de genes relacionados à autofagia, LC3A e LC3B. Ocorreu aumento da expressão da LC3A na linhagem RPE e aumento da expressão de LC3B na linhagem HK2 após o tratamento com as fibras. As fibras internalizadas possivelmente

provocaram o estímulo da via autofágica através da expressão de LC3, o que pode ser uma resposta ao estresse celular causado pelo recrutamento de LC3 para as fibras.

A associação entre vesículas autofágicas e fibras de asbesto internalizadas ainda não está totalmente elucidada. Jaurand e colaboradores (1983) observaram que o tratamento de células em cultura com crisotila leva ao aumento da presença de vacúolos, e sugerem que os vacúolos se assemelhem a autofagossomos quando observados por microscopia eletrônica de transmissão (Jaurand *et al.*, 1983). Porém, outros estudos que investigaram a internalização e alterações celulares causadas pelas fibras não apresentaram resultados que mostram a presença de fibras em autofagossomos, caracterizados pela presença de dupla membrana. As fibras são visualizadas envoltas por uma membrana única, o que seria então incompatível com a presença de vesículas autofágicas (Suzuki, 1974; MacCorkle *et al.*, 2006; Ricardi, 2013, entre outros). Já um estudo recente investigou pela primeira vez a relação entre a exposição aos asbestos (no caso fibras de crisotila) e a autofagia. Eles verificaram que o tratamento ocasionou estresse oxidativo com consequente aumento da expressão AKT e aumento dos níveis de ativação de JNK, que levam ao aumento da expressão de LC3. Também verificaram que ocorreu aumento o número de vesículas autofágicas, e assim concluem que o tratamento com crisotila leva à indução de autofagia, e que esta indução não se relaciona com os níveis de apoptose após o tratamento. Porém, as imagens de microscopia eletrônica não são claras sobre a presença de fibras nos autofagossomos (Lin *et al.*, 2014).

Tendo isso em mente, foi demonstrado aqui que a presença de fibras internalizadas ocasionou a redução de vesículas autofágicas disponíveis para degradação do material intracelular no citoplasma das células tratadas, o que de fato pode levar à redução da degradação de material intracelular, como os corpos intermediários pós-mitóticos. A indução da autofagia pode ocorrer, conforme demonstrado por Lin e colaboradores (2014) e sugerido pelos níveis de expressão de LC3 observados no presente estudo, mas isso talvez não signifique que a degradação de material intracelular será favorecida. Ainda, a presença de LC3 junto às fibras de crisotila pode não indicar sua associação com vesículas autofágicas, já que estudos recentes mostram que LC3, que possui atuação descrita no processo de autofagia e é marcador de vesículas autofágicas, pode também se ligar diretamente a membranas únicas de fagossomos, que depois serão fusionados aos lisossomos para degradação no material extracelular. Dessa forma, novos experimentos devem ser realizados para verificar se as fibras se associam às vesículas autofágicas, ou se LC3 passa a se associar preferencialmente às vesículas que contêm fibras.

Alterações na autofagia estão relacionadas também a tumorigênese. Foi descrito que células tumorais geralmente apresentam níveis de autofagia reduzidos quando comparadas às células normais do mesmo tecido, e que células tratadas com carcinógenos também apresentam redução da autofagia. Ainda, a indução de autofagia em células tumorais reduz sua capacidade tumorigênica (Otsuka & Moskowitz, 1978; Schwarze & Seglen, 1985; Qu *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2003). A autofagia foi colocada como supressora tumoral, e assim sua atividade encontra-se reduzida no início do processo de tumorigênese, quando as células tumorais mantêm seu nível de síntese proteica maior do que o de degradação (Kondo *et al.*, 2005; Ogier-Denis & Codogno, 2003). Já em estágios avançados da formação dos tumores, quando a massa tumoral torna-se grande e a disponibilidade de nutrientes no seu interior encontra-se reduzida, a autofagia é ativada a fim de garantir sua sobrevivência em condições de escassez de nutrientes. Dessa forma, a modulação da autofagia parece ser um mecanismo importante para a tumorigênese e progressão tumoral, e assim passou a ser alvo de terapias anticâncer (Ogier-Denis & Codogno, 2003; Kondo *et al.*, 2005). O presente estudo trouxe evidências de que as fibras de crisotila podem alterar os níveis de autofagia, e poderiam assim ter papel importante na tumorigênese induzida por asbestos. Se as fibras forem capazes de “sequestrar” LC3 às vesículas contendo as fibras, poderiam reduzir os níveis de autofagia, facilitando o processo de tumorigênese. Contudo, experimentos mais direcionados devem ser feitos para estabelecer a relação entre a exposição a fibras de asbestos e alterações no nível de autofagia.

Independente do mecanismo que levou ao aumento do número de células com corpos intermediários pós-mitóticos, esse aumento pode ter consequências no comportamento das células. O aumento do número de corpos intermediários pós-mitóticos pode interferir na determinação de polaridade celular, comunicação intercelular, proliferação celular e mecanismos de diferenciação (Ettinger *et al.*, 2011; Kuo & Doxsey, 2012; Chen *et al.*, 2013). Esses mecanismos ainda vêm sendo estudados, mas já demonstram que células tumorais, normais, e células indiferenciadas possuem taxas de retenção de corpos pós-mitóticos distintos, e que a indução de modificações nestas taxas leva à alterações no estado de diferenciação celular (Ettinger *et al.*, 2011). Logo, o acúmulo de corpos intermediários pós-mitóticos decorrente do tratamento com crisotila também pode ter importante participação na transformação celular.

CONCLUSÃO

O presente estudo elucidou mecanismos relacionados com as alterações celulares causadas por fibras de crisotila em células normais e tumorais em cultura. Além disso, o trabalho gerou resultados importantes sobre a falha e regressão na citocinese.

Concluimos que células normais e tumorais respondem de forma similar à exposição a fibras de crisotila, formando células multinucleadas e com amplificação centrossômica. A principal causa da formação destas células é a falha e regressão da citocinese devido à presença de fibras na ponte intercelular. As fibras ocasionam alterações na expressão de genes relacionados com a citocinese e alterações na localização de proteínas envolvidas na formação dos sítios de constrição secundários e de abscisão, levando à indeterminação destes. As alterações causadas levam não só à falha na citocinese, mas também a sua regressão, resultando na formação das células multinucleadas, tetraploides e com amplificação centrossômica.

Células tetraploides normais e tumorais podem entrar em fase S do ciclo novamente e formar mitoses multipolares que podem se dividir e gerar uma, duas ou três células-filhas, contribuindo assim para a formação de células aneuploides. Células tumorais aneuploides com números variados de cromossomos ainda podem progredir no ciclo celular; já células aneuploides normais parecem ser incapazes de entrar novamente em fase M, possivelmente devido a um mecanismo de proteção presente em células normais.

Os dados ainda sugerem que as fibras permanecem associadas a vesículas positivas para LC3 possivelmente reduzindo a capacidade da célula de realizar autofagia e contribuindo para o aumento de corpos intermediários pós-mitóticos, que por sua vez podem regular a proliferação e diferenciação celular, interferindo assim em seu comportamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andolfi, L., Trevisan, E., Zwyer, M., Prato, S., Troian, B., Vita, F., Borelli, V., Soranzo, M. R., Melato, M., and Zabucchi, G. (2013). The crocidolite fibres interaction with human mesothelial cells as investigated by combining electron microscopy, atomic force and scanning near-field optical microscopy. *J. Microsc.* *249*, 173–183.
- Appel, J. D., Fasy, T. M., Kohtz, D. S., Kohtz, J. D., and Johnson, E. M. (1988). Asbestos fibers mediate transformation of monkey cells by exogenous plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 7670–7674.
- Ault, J. G., Cole, R. W., Jensen, C. G., Jensen, L. C., Bachert, L. a, and Rieder, C. L. (1995). Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells. *Cancer Res.* *55*, 792–798.

Beamer, C. A., and Holian, A. (2005). Scavenger receptor class A type I / II (CD204) null mice fail to develop fibrosis following silica exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1552, 186–195.

Berman, D. W., and Crump, K. S. (2008). Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. *Crit. Rev. Toxicol.* 38 Suppl 1, 1–47.

Bernstein, D., Dunnigan, J., Hesterberg, T., Brown, R., Velasco, J. A. L., Barrera, R., Hoskins, J., and Gibbs, A. (2013). Health risk of chrysotile revisited. *Crit. Rev. Toxicol.* 43, 154–183.

Bernstein, D. M., Chevalier, J., and Smith, P. (2005). 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.

Bernstein, D. M., and Hoskins, J. a (2006). The health effects of chrysotile: current perspective based upon recent data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 45, 252–264.

Broadus, V. C., Yang, L., Scavo, L. M., Ernst, J. D., and Boylan, a M. (1996). Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* 98, 2050–2059.

Brody, a R., Liu, J. Y., Brass, D., and Corti, M. (1997). Analyzing the genes and peptide growth factors expressed in lung cells in vivo consequent to asbestos exposure and in vitro. *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl , 1165–1171.

Burmeister, B., Schwerdtle, T., Poser, I., Hoffmann, E., Hartwig, a, Müller, W.-U., Rettenmeier, a W., Seemayer, N. H., and Dopp, E. (2004). 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, 81–92.

Carlton, J. G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10541–10546.

Carlton, J. G., Caballe, A., Agromayor, M., and Kloc, M. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science* (80-.). 336, 220–225.

Chen, C.-T., Ettinger, A. W., Huttner, W. B., and Doxsey, S. J. (2013). Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies. *Trends Cell Biol.* 23, 118–128.

Cole, R. W., Ault, J. G., Hayden, J. H., and Rieder, C. L. (1991). Crocidolite asbestos fibers undergo size-dependent microtubule-mediated transport after endocytosis in vertebrate lung epithelial cells. *Cancer Res.* 51, 4942–4947.

Cortez, B. a, and Machado-Santelli, G. M. (2008). Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. *BMC Cancer* 8, 181.

Cortez, B. D. A., Quassollo, G., Caceres, A., and Machado-Santelli, G. M. (2011). The fate of chrysotile-induced multipolar mitosis and aneuploid population in cultured lung cancer cells. *PLoS One* 6, e18600.

Desai, R., and Richards, R. J. (1978). The adsorption of biological macromolecules by mineral dusts. *Environ. Res.* 16, 449–464.

Desai, R., and Richards, R. J. (1983). Effects of chrysotile on a lysosomal enzyme preparation and on the hydrolytic enzyme activity of cultured alveolar macrophages. *Environ. Health Perspect.* 51, 125–130.

Dönmez-Altuntas, H., Baran, M., Oymak, F. S., Hamurcu, Z., Imamoğlu, N., Ozesmi, M., and Demirtas, H. (2007). Investigation of micronucleus frequencies in lymphocytes of inhabitants environmentally exposed to chrysotile asbestos. *Int. J. Environ. Health Res.* 17, 45–51.

Dopp, E., Schuler, M., Schiffmann, D., and Eastmond, D. a (1997). 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. *Mutat. Res.* 377, 77–87.

Dopp, E., Yadav, S., Ansari, F. A., Bhattacharya, K., von Recklinghausen, U., Rauen, U., Rödelisperger, K., Shokouhi, B., Geh, S., and Rahman, Q. (2005). ROS-mediated genotoxicity of asbestos-cement in mammalian lung cells in vitro. Part. *Fibre Toxicol.* 2, 9.

Elia, N., Fabrikant, G., Kozlov, M. M., and Lippincott-Schwartz, J. (2012). Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling. *Biophys. J.* 102, 2309–2320.

Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., and Lippincott-schwartz, J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission.

Ettinger, A. W., Wilsch-Bräuninger, M., Marzesco, A.-M., Bickle, M., Lohmann, A., Maliga, Z., Karbanová, J., Corbeil, D., Hyman, A. a, and Huttner, W. B. (2011). Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat. Commun.* 2, 503.

Ganem, N. J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 157–162.

Gazzano, E. *et al.* (2007). Iron-loaded synthetic chrysotile: a new model solid for studying the role of iron in asbestos toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 380–387.

Gazzano, E., Foresti, E., Lesci, I. G., Tomatis, M., Riganti, C., Fubini, B., Roveri, N., and Ghigo, D. (2005). Different cellular responses evoked by natural and stoichiometric synthetic chrysotile asbestos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206, 356–364.

Gendek, E. G., and Brody, a R. (1990). Changes in lipid ordering of model phospholipid membranes treated with chrysotile and crocidolite asbestos. *Environ. Res.* 53, 152–167.

Hu, C.-K., Coughlin, M., and Mitchison, T. J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 23, 1024–1034.

- Iyer, R., Hamilton, R. F., Li, L., and Holian, a (1996). Silica-induced apoptosis mediated via scavenger receptor in human alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *141*, 84–92.
- Jaurand, M. C., Bastie-Sigeac, I., Magne, L., Hubert-Habart, M., and Bignon, J. (1983). Studies on in vitro chrysotile-pleural mesothelial cell interaction: morphological aspects and metabolism of benzo-3,4-pyrene. *Environ. Health Perspect.* *51*, 159–165.
- Jensen, C. G., and Watson, M. (1999). Inhibition of cytokinesis by asbestos and synthetic fibres. *Cell Biol. Int.* *23*, 829–840.
- Jones, B. M., Edwards, J. H., and Wagner, J. C. (1972). Absorption of serum proteins by inorganic dusts. *Br. J. Ind. Med.* *29*, 287–292.
- Kamp, D. W. (2009). Asbestos-induced lung diseases: an update. *Transl. Res.* *153*, 143–152.
- Kido, T., Morimoto, Y., Asonuma, E., Yatera, K., Ogami, A., Oyabu, T., Tanaka, I., and Kido, M. (2008). Chrysotile asbestos causes AEC apoptosis via the caspase activation in vitro and in vivo. *Inhal. Toxicol.* *20*, 339–347.
- Kodama, Y., Boreiko, C. J., Maness, S. C., and Hestberg, T. W. (1993). Cytotoxic and cytogenetic effects of asbestos on human bronchial epithelial cells in culture. *Carcinogenesis* *14*, 691–697.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., and Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 726–734.
- Kubo, Y., Takenaka, H., Nagai, H., and Toyokuni, S. (2012). Distinct affinity of nuclear proteins to the surface of chrysotile and crocidolite. *J Clin Biochem Nutr* *51*, 221–226.
- Kuo, T.-C. *et al.* (2011). Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1214–1223.
- Kuo, T.-C., and Doxsey, S. (2012). Fates and roles of post-mitotic midbodies beyond cytokinesis. *Cell Cycle* *11*, 7–8.
- Levresse, V., Renier, a, Fleury-Feith, J., Levy, F., Moritz, S., Vivo, C., Pilatte, Y., and Jaurand, M. C. (1997). 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.
- Lin, Z., Liu, T., Kamp, D. W., Wang, Y., He, H., Zhou, X., Li, D., Yang, L., Zhao, B., and Liu, G. (2014). AKT/mTOR and c-Jun N-terminal kinase signaling pathways are required for chrysotile asbestos-induced autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* *72*, 296–307.
- Liu, W., Ernst, J. D., and Broaddus, V. C. (2000). Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *23*, 371–378.
- MacCorkle, R. a, Slattery, S. D., Nash, D. R., and Brinkley, B. R. (2006). Intracellular protein binding to asbestos induces aneuploidy in human lung fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* *63*, 646–657.

Mikalsen, S. O., and Modalsli, K. R. (1994). A simple fluorescence method for the study of internalization of particles. *Toxicol. Vitro*, 8, 243–250.

Morita, E., Sandrin, V., Chung, H.-Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26, 4215–4227.

Mossman, B. T., and Churg, A. (1998). Mechanisms in the Pathogenesis of Asbestosis and Silicosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 1666–1680.

Nagai, H., Ishihara, T., Lee, W.-H., Ohara, H., Okazaki, Y., Okawa, K., and Toyokuni, S. (2011). Asbestos surface provides a niche for oxidative modification. *Cancer Sci.* 102, 2118–2125.

Ogier-Denis, E., and Codogno, P. (2003). Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1603, 113–128.

Okayasu, R., Takahashi, S., Yamada, S., Hei, T. K., and Ullrich, R. L. (1999). Asbestos and DNA Double Strand Breaks. *Cancer Res* 59, 298–300.

Otsuka, H., and Moskowitz, M. (1978). Differences in the rates of protein degradation in untransformed and transformed cells. *Exp. Cell Res.* 2, 127–135.

Pierce, J. S., McKinley, M. a, Paustenbach, D. J., and Finley, B. L. (2008). An evaluation of reported no-effect chrysotile asbestos exposures for lung cancer and mesothelioma. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 191–214.

Qu, X. *et al.* (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. 112, 1809–1820.

Quinlan, T. R., Bérubé, K. a, Marsh, J. P., Janssen, Y. M., Taishi, P., Leslie, K. O., Hemenway, D., O'Shaughnessy, P. T., Vacek, P., and Mossman, B. T. (1995). Patterns of inflammation, cell proliferation, and related gene expression in lung after inhalation of chrysotile asbestos. *Am. J. Pathol.* 147, 728–739.

Renshaw, M. J., Liu, J., Lavoie, B. D., and Wilde, A. (2014). Anillin-dependent organization of septin filaments promotes intercellular bridge elongation and Chmp4B targeting to the abscission site. *Open Biol.* 4, 1–15.

Ricardi, L. R. (2013). Interação célula-crisotila em duas diferentes linhagens: uma abordagem morfológica e molecular. In: Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Robledo, R. F., Buder-Hoffmann, S. a, Cummins, a B., Walsh, E. S., Taatjes, D. J., and Mossman, B. T. (2000). Increased phosphorylated extracellular signal-regulated kinase immunoreactivity associated with proliferative and morphologic lung alterations after chrysotile asbestos inhalation in mice. *Am. J. Pathol.* 156, 1307–1316.

Schiel, J. a, Childs, C., and Prekeris, R. (2013). Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance. *Trends Cell Biol.* 23, 319–327.

Schwarze, P. E., and Seglen, P. O. (1985). Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp. Cell Res.* *157*, 15–28.

Shukla, A., Gulumian, M., Hei, T. K., Kamp, D., Rahman, Q., and Mossman, B. T. (2003). Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Radic. Biol. Med.* *34*, 1117–1129.

Suzuki, Y. (1974). Interaction of Asbestos with Alveolar Cells. *Environ. Health Perspect.* *9*, 241–252.

Weaver, B. a, and Cleveland, D. W. (2008). The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* *14*, 431–433.

Williams, B. R., Prabhu, V. R., Hunter, K. E., Glazier, C. M., Whittaker, C. A., Housman, D. E., and Amon, A. (2008). Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells. *Science* (80-.). *322*, 703–709.

Xu, a, Wu, L. J., Santella, R. M., and Hei, T. K. (1999). Role of oxyradicals in mutagenicity and DNA damage induced by crocidolite asbestos in mammalian cells. *Cancer Res.* *59*, 5922–5926.

Yoshida, N., Nakajima-Kambe, T., Matsuki, K., and Shigeno, T. (2007). Novel plasmid transformation method mediated by chrysotile, sliding friction, and elastic body exposure. *Anal. Chem. Insights* *2*, 9–15.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15077–15082.

Zalma, R., Bonneau, L., Guignard, J., Pezerat, H., and Jaurand, M.-C. (1987). Formation of oxy radicals by oxygen reduction arising from the surface activity of asbestos. *Can. J. Chem.* *65*, 2338–2341.

Zhao, W.-M., and Fang, G. (2005). Anillin is a substrate of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) that controls spatial contractility of myosin during late cytokinesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 33516–33524.

Capítulo 3: Alterações em células normais e tumorais expostas à vincristina

RESUMO

Vincristina é uma droga antimitótica utilizada para tratamento de diversos tipos de tumores. Ela atua sobre os microtúbulos, impedindo a formação dos fusos mitóticos, o que leva à retenção das células em metáfase. A retenção seguida de morte celular foi tida como a principal causa dos efeitos citotóxicos da vincristina. Porém, estudos recentes vêm mostrando essa retenção pode não ser a única responsável pela morte celular após o tratamento dos tumores com drogas antimicrotúbulos, e assim seus mecanismos de ação vêm sendo revistos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações de ploidia em células em cultura após o tratamento com vincristina, e investigar como essas alterações foram provocadas. Foram utilizadas células RPE e HK2 – células humanas de origem epitelial normal e tumoral, respectivamente – e realizados tratamentos de 24 h com a droga em concentração suficiente para causar a retenção em metáfase, seguidos de recuperação em meio livre de droga por 24 a 72 horas. O tratamento levou a altas taxas de morte celular nas duas linhagens, mas nas células que permaneceram na cultura foi observado aumento da frequência de células bi e multinucleadas, micronucleadas e com amplificação centrossômica. A amplificação centrossômica e tetraploidia foram resultados de um processo observado em experimentos de *time-lapse*: a saída da mitose sem a divisão celular, gerando apenas uma célula-filha com o dobro do conteúdo de DNA e de centrossomos. Porém, não foi possível explicar as alterações observadas no número de centrossomos após o tratamento como consequência apenas da saída da mitose, sugerindo a ocorrência de outro processo de amplificação centrossômica. Os dados indicaram que esse processo pode ser decorrente da fragmentação da matriz pericentriolar durante a retenção em mitose e do acúmulo de matriz nos centrossomos de células interfásicas durante os períodos de recuperação. Essas alterações da matriz podem desencadear a reduplicação dos centríolos, formando grandes centrossomos com até dez centríolos. Em células HK2 também foi detectado o aumento da expressão de Aurora A, que por sua vez pode gerar a amplificação centrossômica. Células HK2 se mostraram capazes de progredir no ciclo celular e formaram mitoses multipolares que resultaram em células-filhas com diferentes graus de aneuploidia. Já células RPE não progrediram no ciclo celular após as alterações ocasionadas pelo tratamento, e assim não deram origem a mitoses multipolares e células aneuploides com capacidade de proliferação.

ABSTRACT

Vincristine is an anti-microtubule drug, used as a chemotherapeutic agent against a wide range of tumors. It prevents spindles formation during mitosis, leading to M phase retention and cell death. For many years it was believed that cell retention was the main cause of cell death after vincristine treatment. However, recent data show that cell death can occur without M phase delay, and the mechanisms related to cell death after anti-microtubules drugs treatment have been revisited. The present study aimed to investigate ploidy alterations in normal and cancer cultured cells treated with vincristine, and to elucidate the processes related to these alterations. Two human cell lineages – RPE, normal cells, and HK2, cancer cells – were treated with vincristine for 24 h, period long enough to cause M phase retention. After treatment, cells were recovered in drug-free medium for 24, 48 and 72 hours. Vincristine treatment led to similar alterations in both lineages: it was observed an increment of binucleated, multinucleated, micronucleated and hypertetraploid cells frequencies, as well as increased frequency of cells with centrosome amplification. It was observed by time-lapse experiments a process that led to tetraploid cells formation, which contains duplicated number of centrosomes. This process, called mitotic slippage, is characterized by mitosis exit without cell division. However, mitotic slippage could not be the unique cause of all centrosome abnormalities observed during the recovery periods, suggesting the existence of another centrosome amplification mechanism. It was found that the vincristine treatment led to pericentriolar matrix fragmentation during M phase retention, and during the recovery periods cells showed huge centrosomes with increased matrix containing up to 8 centrioles. HK2 cells also showed increased Aurora A expression, which is related to centrosome amplification. The presence of supernumerary centrosomes was responsible for multipolar mitoses that resulted in aneuploid daughter cells with different numbers of chromosomes. HK2 aneuploid cells were able to progress through cell cycle, but RPE were not, suggesting that these cells could not progress through cell cycle with altered number of chromosomes and centrosomes. Vincristine treatment also reduced proliferation in RPE cells, as indicated by the expression of genes related to cell cycle and mitosis, and also by BrdU incorporation. The same experiments showed that HK2 cells were able to proliferate even with all cell abnormalities acquired after vincristine treatment.

INTRODUÇÃO

Os tumores são muito diferentes entre si, uma vez que podem ser formados em diferentes órgãos e por diferentes tipos celulares. Dentro de um mesmo tumor também pode haver grande diversidade celular que contribui para a heterogeneidade tumoral. Porém existem algumas características que ocorrem frequentemente em diferentes tumores e nas diferentes células de um tumor, como a perda da capacidade de responder a sinais extracelulares, perda de componentes dos pontos de checagem e proliferação acentuada (Hanahan *et al.*, 2000). O uso de drogas que atuam sobre componentes relacionados a essas características pode ter sucesso no combate a diferentes tipos de tumor, como ocorre no caso das drogas que agem sobre a divisão mitótica – chamadas antimitóticas – que têm maior eficiência contra células que proliferam rapidamente (Manchado *et al.*, 2012).

Dentre as drogas antimitóticas existe o grupo das que agem sobre os microtúbulos, chamadas também de venenos dos fusos ou drogas antimicrotúbulos. Fazem parte deste grupo os taxanos (paclitaxel, taxol, docetaxol), a colchicina, e os alcaloides da vinca (Abal *et al.*, 2003). Os microtúbulos estão envolvidos em diferentes processos celulares, como transporte de vesículas e posicionamento de organelas, mas a sua atuação mais marcante é durante a mitose, quando formam os fusos mitóticos e participam ativamente da segregação dos cromossomos. Assim, quando células são tratadas com venenos dos fusos a alteração celular mais marcante é a retenção das células em metáfase, já que os microtúbulos não são capazes de se organizar para formar os fusos necessários à progressão da mitose. Como as células tumorais geralmente apresentam taxa de proliferação maior que grande parte das células normais, acabam sendo mais afetadas pela ação destas drogas quando em comparação com células normais (Blajeski *et al.*, 2001; Islam & Iskander, 2004; Jung *et al.*, 2004).

O uso dos venenos dos fusos apresenta limitações que favorecem sua substituição por outras drogas. Por exemplo, o tratamento com venenos dos fusos por ciclos repetitivos – como ocorre no caso da quimioterapia – pode levar à aquisição de resistência à droga, levando à ineficácia do tratamento. A alta citotoxicidade *in vivo* leva também à morte de células normais, tendo como um dos efeitos iniciais a perda de neutrófilos e de outras células do sangue. Efeitos colaterais no sistema nervoso também são observados, já que nas células nervosas os microtúbulos têm atuação essencial e não restrita à mitose. Além disso, o reaparecimento dos tumores após período livre de doença é comum quando eles são tratados com venenos dos fusos (Manchado *et al.*, 2012; Marzo & Naval, 2013). Estes efeitos indesejados poderiam ser reduzidos – e o desenvolvimento de novas drogas poderia evitar o

surgimento desses efeitos – se os mecanismos de ação das drogas antimicrotúbulos fossem mais bem entendidos (Gascoigne & Taylor, 2009).

Vincristina, outros venenos dos fusos e seus mecanismos de ação

A vincristina é um dos alcaloides extraídos da planta *Catharanthus roseus*, chamados de alcaloides da vinca, que foram identificados na década de 1950 por pesquisadores canadenses. O uso desta planta por diferentes comunidades para tratamento de alterações de glicemia direcionou primeiramente o uso de seus alcalóides para tratamento de diabetes e pressão alta. Contudo, esses alcaloides são altamente citotóxicos e passaram a ser empregados nas terapias contra o câncer poucos anos após sua descoberta, hoje sendo ainda amplamente utilizados sozinhos ou combinados com outras drogas. São quatro os alcaloides da vinca mais estudados para tratamento de câncer: vincristina, vimblastina, vinorelbina e vindesina. Os três primeiros são aprovados para uso em terapias em humanos na maioria dos países e são empregados no tratamento de diferentes tumores, como mama, pulmão e linfomas (Johnson *et al.*, 1963; Gascoigne & Taylor, 2009; Manchado *et al.*, 2012; Marzo & Naval, 2013). Um novo alcaloide da vinca sintético, chamado vinflunine, foi desenvolvido em 2008 e está aprovado para uso no tratamento de alguns tumores na Europa (Bennouna *et al.*, 2008).

Assim como ocorre com muitas drogas utilizadas em terapias, os alcaloides da vinca mostraram-se eficientes para o tratamento de diferentes tipos de câncer e passaram a ser utilizados sem que seu mecanismo de ação fosse conhecido (Johnson *et al.*, 1963). Posteriormente, no início da década de 1990, descobriu-se que estes compostos têm afinidade pelos microtúbulos, afetando sua dinâmica tanto em células tumorais quanto em células normais.

A ação das drogas antimicrotúbulos sobre o citoesqueleto pode ocorrer de diferentes maneiras: há aquelas que estabilizam os microtúbulos e impedem seu crescimento e sua despolimerização, como o taxol e o paclitaxel, e outras que promovem a despolimerização dos microtúbulos, como a vincristina. Porém, alguns estudos sugerem que o modo de ação da droga depende da concentração utilizada (Jordan *et al.*, 1991, 1993).

A vincristina, assim como os outros alcaloides da vinca, se liga à β -tubulina na região adjacente ao sítio de ligação ao GTP (Rai & Wolff, 1996). Este sítio de ligação é diferente do sítio de ligação dos taxanos e colchicina à tubulina. Também foram identificados sítios de alta e baixa afinidade dos alcaloides da vinca por tubulina. Os sítios de alta afinidade se localizam nas extremidades *mais* dos microtúbulos, e assim as drogas, mesmo em baixas concentrações,

se ligam às extremidades dos microtúbulos e ocasionam sua despolimerização. Em concentrações altas, as drogas podem também se ligar aos sítios de baixa afinidade que se localizam nas paredes ao longo dos microtúbulos, levando a sua quebra e desorganização (Jordan *et al.*, 1991; Mollinedo & Gajate, 2003).

Como as células morrem após o tratamento com drogas antimicrotúbulos ainda é motivo de discussão na comunidade científica. A primeira alternativa, e mais estudada, é a morte celular decorrente da retenção em metáfase. Diversos estudos relatam a morte celular após período prolongado em metáfase, e isso ocorre com todas os venenos dos fusos testados. Mesmo quando células são tratadas com baixas concentrações das drogas e microtúbulos estruturalmente normais são observados durante a mitose, ocorre a parada em metáfase. Isso porque a dinâmica dos microtúbulos é afetada, e seu rápido crescimento/encurtamento é essencial para o encontro e ligação dos fusos aos cinetócoros. As drogas, mesmo em baixas concentrações, levam à redução desta dinâmica e consequente redução do número de microtúbulos ligados aos cinetócoros, o que ativa o ponto de checagem mitótico e leva à parada das células em metáfase (Wendell *et al.*, 1993).

Recentemente foi descrito o mecanismo que encaminha células retidas em metáfase para a morte celular. Durante essa retenção ocorre o gradual aumento de sinais pró-apoptóticos, como Bak e Bax. Existe um limite mínimo de sinais pró-apoptóticos para que a apoptose seja disparada, e quando este limite é atingido a célula é encaminhada a apoptose. A outra forma de morte celular descrita que pode ocorrer após tratamento com drogas dos fusos é a catástrofe mitótica. Este processo é conhecido por ser uma rota de morte celular iniciada durante a mitose, sendo geralmente acompanhada de retenção em mitose. A célula pode morrer durante a mitose ou ainda pode formar uma única célula-filha, caracterizada pela presença de múltiplos pequenos núcleos e protuberâncias na membrana plasmática. Esta única célula formada irá sofrer o processo de morte ou entrará em senescência durante a intérfase (Huang *et al.*, 2010; Galán-Malo *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2012).

Quando ocorre a retenção em metáfase é possível haver outro destino além da morte celular: a saída da mitose sem que aconteça a divisão celular, chamada *mitotic slippage*. Esta saída ocorre quando a Ciclina B, responsável por levar à entrada em mitose, é degradada até que sua concentração não seja suficiente para manter a célula em mitose. Com níveis reduzidos de Ciclina B a célula sofre alterações que levam à formação de apenas uma célula interfásica, geralmente multinucleada. A degradação de Ciclina B é um processo independente da formação dos sinais pró-apoptóticos, e assim a ocorrência de morte celular ou saída da mitose depende do limite que for atingido primeiro: se o nível reduzido de Ciclina B for

atingido antes que os sinais pró-apoptóticos sejam suficientes para disparar a apoptose, a célula sairá de mitose. Na situação contrária, quando os sinais apoptóticos se tornam fortes antes que a Ciclina B seja degradada até níveis incompatíveis com a manutenção da mitose, a célula será encaminhada para a morte celular. O balanço entre morte celular e saída da mitose depende da linhagem celular utilizada. Além disso, dentro de uma mesma linhagem as células não seguem o mesmo destino, tornando ainda mais complexo o entendimento de como as células morrem após o tratamento com drogas antimicrotúbulos (Gascoigne & Taylor, 2008, 2009; Galán-Malo *et al.*, 2012).

A saída da mitose gera células tetraploides com conteúdo de centrôssomos duplicado. Essas características são suficientes para que nos ciclos celulares subsequentes ocorram divisões multipolares, que conferem instabilidade cromossômica e levam à formação de células aneuploides (Nitta *et al.*, 2002; Nakagawa, 2006). A aneuploidia, como já discutido no Capítulo 1, pode estar relacionada à morte celular e também à progressão tumoral, dependendo das consequências da perda ou ganho de cromossomos ou parte deles (Storchova & Kuffer, 2008; Weaver & Cleveland, 2008; Sheltzer & Amon, 2011). Assim, a saída da mitose e formação de células tetraploides que vão formar mitoses multipolares e gerar células aneuploides pode ser um mecanismo relacionado com a morte celular e também com a progressão tumoral após o tratamento com drogas antimicrotúbulos.

Porém, um estudo recente mostrou que a formação de células aneuploides após o tratamento com paclitaxel, uma droga antimicrotúbulo, pode também não ser dependente da formação de células tetraploides. Nesse estudo os autores trataram células com concentrações baixas de paclitaxel que não capazes de levar à retenção em mitose, mas sim à formação de fusos multipolares durante a mitose. A presença destes fusos leva a erros de segregação cromossômica e à formação de células aneuploides, que por sua vez não são capazes de progredir no ciclo celular e morrem em interfase ou ainda durante a divisão celular. Mais interessante é que as concentrações da droga utilizadas nesse estudo são muito semelhantes às encontradas em células de tumores de mama de indivíduos submetidos ao tratamento com paclitaxel. Além disso, a regressão do tumor durante o tratamento não se correlaciona com a indução de retenção em metáfase, e assim os autores sugerem que a morte celular que leva à regressão dos tumores não ocorre devido à retenção em metáfase, mas sim devido a erros de segregação cromossômica após a formação de fusos multipolares com consequente formação de células aneuploides (Zasadil *et al.*, 2014).

Alterações na morfologia celular e nos centríolos após tratamento com drogas dos fusos

Células multinucleadas são amplamente encontradas após o tratamento de células em cultura com diferentes drogas dos fusos. A formação de células multinucleadas, por exemplo, ocorre após o tratamento com concentrações acima de 10 nM de paclitaxel, 10 nM de taxol, e 50 nM de vincristina (Jordan *et al.*, 1996; Blajeski *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005; Tennyson *et al.*, 1983; Nakagawa, 2006). Estas células devem ser formadas por *mitotic slippage* ou por falhas da citocinese, já que ambos os processos formam células tetraploides, com o dobro de centríolos e geralmente multinucleadas (Zhu *et al.*, 2005). Micronúcleos também são amplamente observados após o tratamento de células com venenos dos fusos, e indicam a presença de instabilidade cromossômica uma vez que são estruturas formadas após erros de segregação cromossômica durante a mitose (Lotfi & Machado-Santelli, 1996, 2006; Andreassen *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2009).

Durante períodos de recuperação após o tratamento com drogas antimicrotúbulos são observadas figuras de mitoses multipolares. Estas poderiam ser o principal mecanismo na formação de células aneuploides após o tratamento com drogas dos fusos (Jordan *et al.*, 1996; Nakagawa, 2006). Porém, anormalidades nos fusos mitóticos são encontradas ainda durante o período de tratamento com venenos dos fusos, levando pesquisadores a investigar possíveis alterações nos centríolos e a formação de fusos multipolares durante e após o tratamento com essas drogas.

O tratamento de células em cultura com taxol é capaz de levar à formação de múltiplos pontos de onde se irradiam microtúbulos durante a retenção em metáfase. Esses pontos, chamados de ásteres pelos autores, são positivos para as proteínas Numa e HSET, que participam dos centríolos durante a mitose, mas curiosamente não agregam outras proteínas centríolares, como γ -tubulina (Hornick *et al.*, 2008). Fusos monopolares e multipolares também foram observados por Zhu e colaboradores (2005) após o tratamento com taxol. Os centríolos “extras” mostram-se positivos para Pericentrina, mas não para γ -tubulina (Zhu *et al.*, 2005).

Células Hela tratadas com vimblastina em baixas concentrações (2nM), que não provocam alterações estruturais nos microtúbulos, apresentam alterações nos centríolos. Quando observados por microscopia eletrônica de transmissão, os centríolos apresentam estrutura alterada, como a presença de fendas entre os microtúbulos que formam os centríolos e microtúbulos longos no seu interior (Wendell *et al.*, 1993).

O tratamento de células Hela com diferentes concentrações de paclitaxel (de 0,4 a 100 nM) leva à formação de fusos multipolares durante o período de tratamento. Porém, os polos

dos fusos não possuem centríolos e tampouco são positivos para Pericentrina, levando os autores a concluir que não ocorre amplificação centrossômica, mas apenas a formação de novos pontos de onde os fusos se organizam (Bian *et al.*, 2010). O uso de paclitaxel em baixas concentrações também leva à formação de mitoses multipolares em células de mama normais e tumorais, nas quais até mais de cinco polos dos fusos foram observados (Zasadil *et al.*, 2014).

Já células em cultura tratadas com vincristina apresentaram a formação de múltiplos polos dos fusos durante o tratamento e após períodos de recuperação. Foram observadas mitoses com mais de oito polos dos fusos após 24 h de recuperação após o tratamento, indicando que algum mecanismo de amplificação centrossômica deve ter ocorrido além da saída de mitose sem a ocorrência de divisão celular (Nakagawa, 2006).

O uso dos venenos dos fusos e inibidores de Aurora A

Em diferentes tipos de tumor foi detectada a alta expressão da proteína Aurora A, que passou então a ser alvo de terapias. Drogas que atuam sobre ela foram desenvolvidas e já estão em testes pré-clínicos e clínicos (Carvajal *et al.*, 2006). Altos níveis de Aurora A estão diretamente relacionados com a amplificação centrossômica, o que pode ser uma causa importante deste fenômeno em células tumorais. Em células em cultura, o aumento da expressão de Aurora A leva à amplificação centrossômica, à formação de mitoses multipolares e à instabilidade genética (Anand *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006).

O aumento da expressão de Aurora A também leva à saída de mitose em células tratadas com drogas antimicrotúbulos, diminuindo também o período de retenção em mitose. O aumento de Aurora A não permite que o ponto de checagem do fuso seja ativado mesmo na presença de Mad2 nos cinetócoros, fazendo com que as células entrem em anáfase, mas não completem a citocinese, formando assim células multinucleadas. A porcentagem de células em morte celular também foi reduzida em células tratadas com taxol quando Aurora A estava superexpressa, indicando que altos níveis da proteína podem ter grande influência na resistência de células tumorais ao tratamento com venenos dos fusos (Anand *et al.*, 2003).

O uso de inibidores ou o silenciamento de Aurora A podem aumentar a sensibilidade de células ao tratamento com venenos dos fusos. A redução dos níveis de Aurora A em células tumorais em cultura aumentou a sensibilidade destas células ao tratamento com vincristina, levando a maiores taxas de morte celular (Lentini *et al.*, 2008). Em tumores de tireoide também foi observada maior redução do tumor quando este foi tratado com inibidor de

Aurora A e paclitaxel (Isham *et al.*, 2013), e resultados semelhantes foram alcançados em linfomas tratados com vincristina e inibidores de Aurora A (Mahadevan *et al.*, 2012).

Estudos em modelos tridimensionais

Quando células são extraídas de um tecido para o cultivo em monocamada, também chamada de cultura 2D, perdem diversas características que possuíam *in vivo* passando a se comportar de maneira distinta. Devido a diferenças entre o comportamento das células *in vivo* e *in vitro*, há grande interesse no desenvolvimento de sistemas de cultivo que mimetizem as características encontradas *in vivo* para, por exemplo, o estudo do comportamento de células tumorais tratadas com drogas anticâncer (Prestwich, 2008). A cultura em três dimensões (3D) consiste em uma maneira de cultivo que propicia a ocorrência de interações célula-célula ou célula-matriz por todo o limite celular, sendo uma condição de cultura mais próxima do observado *in vivo* (Cukierman *et al.*, 2001; Bokhari *et al.*, 2007).

O incremento da interação com outras células e com a matriz, observado no modelo de cultivo em 3D, pode aumentar a diferenciação celular (Hall *et al.*, 1982; William *et al.*, 1992; do Amaral *et al.*, 2010, 2011), atuar na sinalização devido aos componentes da matriz extracelular (Page *et al.*, 2013), modificar o padrão de expressão gênica (Spencer *et al.*, 2010; Luca *et al.*, 2013) e alterar a expressão de moléculas envolvidas com a adesão célula-matriz (integrinas) e célula-célula (caderinas) (Santini *et al.*, 2000). Existem diversos modelos de cultura de células em ambiente em 3D: esferoides multicelulares (Friedrich *et al.*, 2007; Hirschhaeuser *et al.*, 2010), esferas (*microcarrier beads*) e utilização de materiais sintéticos (géis sintéticos) ou naturais (colágeno tipo I e matrigel) que propiciem o crescimento de células em um sistema tridimensional e a cultura de explantes organotípicos (Page *et al.*, 2013).

O cultivo 3D de células tumorais tem trazido grande interesse no estudo do câncer, como, por exemplo, em pesquisas que testam a eficiência de drogas. Quando cultivadas dessa maneira as células tendem a apresentar maior resistência às drogas, e geralmente as concentrações de drogas na cultura 3D que causam efeitos semelhantes aos observados na cultura 2D são maiores. A primeira causa para este fenômeno seria a barreira física à penetração da droga devido à presença de várias camadas de células e de elementos da matriz extracelular. Porém, alguns estudos mostram que certas drogas, como a doxorrubicina, são capazes de atingir as camadas mais internas das culturas tridimensionais, necessitando somente de um intervalo de tempo pouco maior. Outra possibilidade é que da adesão célula-célula e célula-matriz mediada por integrinas aumente a expressão de genes que estão relacionados com a resistência à morte por apoptose, tornando as células mais resistentes às

drogas. Esse processo – hoje alvo de terapias – é chamado de “resistência a drogas mediada por adesão celular”. Outros genes geralmente associados à resistência a drogas em células cultivadas em monocamadas podem estar superexpressos quando as células são cultivadas em três dimensões. Esse aumento de expressão, por exemplo, já foi observado em genes que codificam proteínas que atuam no bombeamento de drogas para fora das células e também em genes antiapoptóticos (Niero *et al.*, 2014).

Estudos com drogas antimicrotúbulos mostram que seus efeitos em células vão muito além da morte celular após a retenção em metáfase. Diferentes alterações foram encontradas e evidenciam que a formação de mitoses multipolares e erros de segregação cromossômica têm grande influência nas consequências ao tratamento com essas drogas. A elucidação dos seus mecanismos de ação sobre células em cultura pode evidenciar os erros ocorridos durante a mitose que levam à formação de células aneuploides viáveis e também à morte celular.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo identificar as alterações de ploidia causadas pelo tratamento com vincristina de células normais e tumorais em cultura, e investigar como estas alterações são causadas. Os objetivos específicos foram:

- 5) Investigar a causa da amplificação centrossômica após tratamento com vincristina;
- 6) Analisar as alterações de ploidia e alterações do ciclo celular que estão associadas à formação de células aneuploides;
- 7) Avaliar os mecanismos que levam à formação de células bi e multinucleadas após o tratamento, e se as células com mais de um núcleo são capazes de proliferar;
- 8) Comparar as alterações causadas pela vincristina em células normais e tumorais de origem epitelial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos relacionados à Cultura de Células, Imunofluorescência e Aquisição de Imagens, Citometria de Fluxo, Preparação Metafásica e Contagem de Cromossomos, Time –Lapse, Extração de RNA, PCR Quantitativo estão descritos no Capítulo 1 (pag. 28), já que são metodologias comuns aos Capítulos 2 e 3. Aqui estão descritas as metodologias exclusivas ao presente capítulo:

Tratamento com Vincristina

Para o tratamento as células HK2 e RPE foram plaqueadas e após 48 h de cultivo, quando as culturas apresentaram cerca de 80% de confluência, o meio de cultura foi

substituído por meio contendo vincristina por 24 h. Conforme apresentado nos resultados, estabeleceu-se a concentração da droga 0,05 µg/mL (54,2 nM) para tratamento das células RPE e 0,0125 µg/mL (13,55 nM) para a linhagem HK2. Todos os tratamentos foram realizados por 24 h. Após, as células foram gentilmente lavadas com PBS duas vezes por 10 minutos. As células foram então submetidas às diferentes análises, ou foram recuperadas em meio de cultura livre de droga por 24 h, 48 h, 72 h ou 96 h, e então analisadas.

Extração de RNA, síntese do cDNA e qPCR

Esse método está descrito em detalhe no Capítulo 1. Os *primers* utilizados para realização dos PCRs quantitativos foram:

GENE	PRIMERS (left/right)	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)	REFERÊNCIA NO GENE BANK
Ciclina B	CGGGAAGTCACTGGAAACAT/ AAACATGGCAGTGACACCAA	55	NM_031966.3
CiclinaE	CGTGCGTTTGCTTTTACAGA/ AGCACCTTCCATAGCAGCAT	55	NM_001238.2
β-tubulina	CTCTGAAGCTGACCACACCA/ GCCAGGCATAAAGAAATGGA	52	NM_178012.4
β-actina	CATGAGGTAGTCAGTCAGGT/ ATGACCCAGATCATGTTTGAG	52	NM_178012.4
Y-tubulina	TCTCCCAGATCAACCAGCTG/ TCCGTAGTGAGAGGGGTGTA	55	NM_001070.4
Aurora A	TTGGGTGGTCAGTACATGCT/ CCTGGCTCCCTCTGTTACAA	55	NM_198437.1
Aurora B	GACACCCGACATCTTAACGC/ CGCCCTCCTTCTCTATCTGG	55	NM_001256834.1

Western Blotting

A verificação dos níveis proteicos de Aurora A e B foi realizada através de Western Blotting. Para tanto as placas com as células controle e tratadas foram lavadas extensivamente com PBS, até que a maioria das células mitóticas tivesse sido descartada e a população estivesse enriquecida com células interfásicas. As células foram lisadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0%, ácido deoxicolato de sódio 0,5% em Tris 50mM-HCl, pH=7,5) contendo uma mistura de inibidores de proteases e fosfatase. Os lisados foram sonicados e, em seguida, centrifugados a 10.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e as proteínas foram quantificadas através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, IL, USA). Em seguida, as

amostras foram ressuspensas em tampão de amostra contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Foi carregado 30µg de proteína por poço, que foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (preparado com 1,5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Foi realizada eletroforese seguindo o método SDS-PAGE. Após a separação, as proteínas foram transferidas (100 V, 250mA por 2 horas) para membrana de PVDF (Amersham Bioscience). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS-tween (TTBS) por 1 hora. As membranas incubadas com anticorpos para detecção de proteínas fosforiladas, foram submetidas a bloqueio com 5% BSA. As membranas foram incubadas com anti-Aurora A fosforilado (Abcam, 1:500), anti-Aurora B (Abcam, 1:500) e anti α -actina (Sigma, 1:10.000), utilizado como controle para checar as condições do carregamento de proteínas no gel. Esses anticorpos primários foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Protocolo de quimoluminescência (ECL kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos.

Cultura de Células em 3D

A cultura de células 3D foi feita segundo Amaral e colaboradores (2011) com algumas modificações. De forma geral, as células em monocamada foram tripsinizadas e transferidas para placas de cultura de 60 mm de diâmetro ($4 \cdot 10^6$ células por placa) sem tratamento para promover a adesão das células (placas comuns para cultura de bactérias). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, e a morfologia das esferas acompanhada diariamente por microscopia de luz.

Análise do número de centríolos

Células RPE e HK2 controle, tratadas com vincristina por 24 h e tratadas e recuperadas por 24 h e 48 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos centríolos e matriz pericentriolar, conforme descrito no capítulo 1. Neste capítulo são mostradas imagens dos centríolos adquiridas ao microscópio confocal de varredura a laser, e algumas foram ainda reconstruídas tridimensionalmente pelo software Imaris (Bitplane). Este software ao reconstruir as imagens segundo os parâmetros determinados pelo pesquisador, identifica as estruturas e as quantifica, auxiliando na análise do número de centríolos. Todas as imagens adquiridas ao microscópio confocal aqui apresentadas correspondem a máxima projeção das fatias ópticas obtidas.

RESULTADOS

Alterações na morfologia em células HK2 e RPE tratadas com vincristina

Estudo prévio realizado em nosso laboratório sobre o efeito da vincristina em linhagens de células epiteliais de bexiga utilizou a droga na concentração de 0,05 µg/mL por 24 h seguidas de 24 h ou 48 h de recuperação. Este período de tratamento/recuperação foi adequado para o estudo da indução de morte celular, formação de células multinucleadas e formação de células aneuploides nas linhagens estudadas.

No presente estudo foram utilizadas células de carcinoma de pulmão humano e células epiteliais normais humanas. Inicialmente foi realizado tratamento semelhante ao já estabelecido (0,05 µg/mL por 24 h seguidas de 24 h de recuperação). Células RPE responderam ao tratamento de forma muito semelhante ao observado nas células de bexiga, assim o esquema de tratamento foi mantido. Porém, as células HK2 se mostraram mais sensíveis ao tratamento, e diferentes concentrações da droga e tempos de tratamentos foram testados. Chegou-se à conclusão que o tratamento mais adequado para as células HK2 foi o uso de ¼ da concentração anteriormente testada, ou seja, 0,0125 µg/mL, por 24 h. Já os tempos de recuperação realizados foram 24 h, 48 h, 72 h e 4 dias e 8 dias.

A observação das células RPE e HK2 por microscopia de luz indicou que o tratamento por 24 h levou à retenção das células em mitose e redução dos prolongamentos em células interfásicas (Fig. 1 B e 2 B). Após 24 h de recuperação muitas células soltas da placa foram observadas, indicando alta frequência de morte celular. As alterações observadas perduraram por menos tempo na cultura de células RPE quando comparado com células HK2: após 24 h de recuperação a morfologia das células RPE interfásicas mostrou-se mais semelhante ao controle, não foram observadas células retidas em metáfase, e após 72 h de recuperação foram observadas poucas células mortas, embora células multinucleadas ainda estivessem presentes (Fig. 1). A cultura HK2 apresentou células retidas em metáfase mesmo após 48 h de recuperação, quando a morfologia das células ainda mostrou-se alterada – com a redução dos prolongamentos e forma mais arredondada das células – e a frequência de células mortas manteve-se alta (Fig. 2). Células bi e multinucleadas foram observadas nas duas linhagens estudadas a partir de 24 h de recuperação após o tratamento com vincristina. A presença destas células foi observada mesmo após 72 h de recuperação (Fig. 1 e 2).

Células HK2 foram observadas após 4 dias de recuperação, quando a cultura ainda apresentou células bi e multinucleadas. Após 8 dias de recuperação a maior parte da cultura

se assemelhou ao controle e poucas células soltas foram observadas. Porém, ainda foram observadas células multinucleadas muito maiores do que as células controle (Fig. 3).

A frequência de células bi e multinucleadas foi estimada em células tratadas e submetidas à imunofluorescência para visualização dos microtúbulos e cromatina. Este procedimento também possibilitou a visualização e quantificação de células apoptóticas, micronúcleos e a distinção entre mitoses bipolares e multipolares. As células retidas em metáfase foram caracterizadas pela alta condensação dos cromossomos não alinhados na placa metafásica, chamadas de c-mitose ou d-mitoses (*delayed mitosis*), termo utilizado neste estudo.

Em células HK2 após 24 h de tratamento, quando mais de um terço das células estavam retidas em metáfase, tanto a frequência de células apoptóticas como de células micronucleadas se manteve semelhante ao controle, e ocorreu um pequeno aumento no número de células multinucleadas em relação ao controle (Fig. 4 A). Todas as mitoses observadas tiveram morfologia de d-mitose, com cromatina muito condensada e ausência de fusos mitóticos, ou presença de fusos muito curtos ao redor dos centrossomos. Após 24 h de recuperação as mitoses já apresentaram fusos mitóticos formados e cerca de 30% das mitoses foram multipolares (Fig. 4 C). Neste momento cerca de 20% das células apresentaram micronúcleos, 7% das células apresentaram morfologia de células em apoptose, e cerca de 35% das células mostraram-se com mais de um núcleo (Fig. 4 A e B). Após 48 h de recuperação a frequência de células bi/multinucleadas diminuiu, mas ainda se manteve aumentada quando comparada as células controle. O mesmo ocorreu com a frequência de células micronucleadas. Já a frequência de mitoses multipolares aumentou, chegando a 47% das mitoses. Após 72 h de recuperação as alterações continuaram aumentadas em relação ao controle, mas diminuíram quando comparadas as células recuperadas por 48 h (Fig. 4).

Foram quantificadas também as alterações na morfologia de células RPE após o tratamento com vincristina. Nas culturas controle foram observadas baixas frequências de células binucleadas e multinucleadas – 1,3% e 1% das células, respectivamente – assim como baixas frequências de células com morfologia apoptóticas e células micronucleadas – 0,8 e 0,6% das células, respectivamente. Após o tratamento por 24 h com vincristina ocorreu aumento de células bi e multinucleadas para 11% e 18%, respectivamente. A frequência dessas células mostrou-se ainda mais aumentada após o tratamento e períodos de recuperação: após 24 h de recuperação 13% das células foram binucleadas e 32% multinucleadas, e após 48 h e 72 h de recuperação as porcentagens de células se mantiveram semelhantes, com cerca de 13% das células binucleadas e de 30% de células multinucleadas. A

presença de células com micronúcleos também sofreu aumento após o tratamento com vincristina, passando de 0,8% no controle para 19,5% após o tratamento seguido de 24 h de recuperação. Após 72 h de recuperação essa porcentagem diminuiu para 7,2%. A indução de apoptose também foi verificada em células submetidas à imunofluorescência. Nas células controle a presença de células em apoptose foi um evento raro (0,6% da população). Após o tratamento e 24 h de recuperação 5% da população apresentou morfologia de células apoptóticas, e após 72 h de recuperação essa porcentagem mostrou-se reduzida, sendo 1,5% (Fig. 5).

A análise de células mitóticas revelou que o tratamento com vincristina por 24 h levou a retenção das células em mitose, e apenas d-mitoses foram observadas. Após 24 h e 72 h de recuperação não foram observadas mitoses multipolares – apenas bipolares.

Esses resultados indicam que o tratamento com vincristina levou a alterações semelhantes em células RPE e HK2, com a formação de células bi e multinucleadas, micronucleadas e células apoptóticas. A maior diferença entre as linhagens foi em relação à formação de mitoses multipolares: nas células HK2 durante os períodos de recuperação foi observado grande aumento da frequência de mitoses multipolares, enquanto que nas células RPE essas mitoses não foram observadas.

Figura 1. Morfologia de células RPE controle e tratadas com vincristina. Células RPE controle e tratadas com vincristina (VCR) foram observadas ao microscópio de luz. As imagens foram adquiridas após lavagens das placas para remoção das células mortas. **A)** A cultura de células RPE controle mostrou-se formada por células mononucleadas e com extremidades alongadas, e divisões bipolares; **B)** Após 24 h de tratamento com VCR a maior parte das células ficaram retidas em metáfase, e as células interfásicas apresentaram menos prolongamentos; **C)** Após 24 h de tratamento e 24 h de recuperação a retenção em metáfase não foi mais evidente. Diversas células interfásicas multinucleadas foram observadas (as mais evidentes estão apontadas por setas); **D e E)** Após 48 h (D) e 72 h (E) de recuperação ainda foram observadas células multinucleadas na cultura (setas).

Figura 2. Morfologia de células HK2 controle e tratadas com vincristina. Células HK2 controle e tratadas com vincristina (VCR) foram observadas ao microscópio de luz. As imagens foram adquiridas após lavagens das placas para remoção da maior parte das células mortas. **A)** Cultura de células controle formada em sua maioria por células mononucleadas, com morfologia semelhante a de células epiteliais e grandes áreas de contato entre as células; **B)** Após 24 h de tratamento com VCR grande parte das células mostrou-se retida em metáfase e as células interfásicas apresentaram redução dos prolongamentos e forma mais arredondada; **C)** Após o tratamento seguido de 24 h de recuperação ainda foram observadas algumas células retidas em metáfase e também células interfásicas bi e multinucleadas (setas); **D)** Após 48 h de recuperação células em morte foram observadas mesmo após a lavagem da placa. Foram também observadas células em metáfase e muitas células interfásicas multinucleadas (setas).

Figura 3. Morfologia de células HK2 após tratamento com vincristina e longos períodos de recuperação. Células HK2 foram tratadas com vincristina (VCR), recuperadas por 4 e 8 dias em meio de cultura livre de droga e observadas ao microscópio de luz. **A)** Após 4 dias de recuperação a cultura ainda mostrou-se diferente da cultura controle, com muitas células interfásicas multinucleadas (setas); **B)** Após 8 dias de recuperação a cultura em sua maioria foi formada por células mononucleadas com morfologia semelhante as células controle. Porém, foram também observadas células grandes multinucleadas (setas).

Figura 4. Alterações morfológicas em células HK2 tratadas com vincristina. Foram quantificadas as alterações na morfologia de células HK2 controle, tratadas com vincristina (VCR) por 24 h, e tratadas e recuperadas por 24 h, 48 h e 72 h. **A)** Após o tratamento com VCR por 24 h foi observado aumento de células multinucleadas na cultura. Porém, esse aumento foi muito mais evidente após 24 h de recuperação, quando ocorreu também aumento do número de células binucleadas. Após 48 h e 72 h de recuperação a porcentagem de células multinucleadas diminuiu, mas se manteve maior do que o observado na cultura controle. A porcentagem de células binucleadas apresentou tendência de redução após 48 h e 72 h de recuperação, mas se manteve similar a porcentagem observada após 24 h de recuperação; **B)** O tratamento com VCR também levou ao aumento de células apoptóticas e micronucleadas em todos os períodos analisados. Células micronucleadas foram observadas em maior frequência após 24 h de recuperação, já células apoptóticas foram observadas em frequências similares após 24 h e 48 h de recuperação; **C)** Após 24 h de tratamento com VCR todas as mitoses observadas apresentaram características de d-mitoses, com alta condensação dos cromossomos não alinhados na placa metafásica. Após 24 h de recuperação ocorreu aumento da frequência de mitoses multipolares, e essa frequência aumentou após 48 h de recuperação.

Figura 5. Alterações morfológicas em células RPE tratadas com vincristina. Foram quantificadas as alterações na morfologia de células RPE controle, tratadas com vincristina (VCR) por 24 h, e tratadas e recuperadas por 24 h e 72 h. **A)** O tratamento levou ao aumento de células bi e multinucleadas verificado logo após as 24 h de tratamento. A porcentagem de células binucleadas se manteve durante os períodos de recuperação, enquanto a porcentagem de células multinucleadas apresentou aumento ainda maior após 24 h de recuperação; **B)** O tratamento provocou o aumento do número de células micronucleadas e apoptóticas. A porcentagem de células com micronúcleos aumentou após 24 h de recuperação e mostrou redução após 72 h de recuperação, mas ainda manteve-se aumentada em relação ao controle. O aumento do número de células apoptóticas ocorreu após 24 h de recuperação, mas mostrou-se semelhante ao controle após 72 h de recuperação.

Alterações no ciclo celular de células RPE e HK2 tratadas com vincristina

O ciclo celular de células RPE e HK2 controle e tratadas com vincristina foi analisado por citometria de fluxo após coloração dos núcleos com iodeto de propídeo. De acordo com o conteúdo de DNA as células foram divididas em 5 classes: hipodiploides, G0/G1, S, G2/M e hipertetraploides.

A cultura de células RPE controle apresentou cerca de 60% das células em G0/G1, 19% em fase S e 16,5% em G2/M. Células hipodiploides e hipertetraploides representaram 2,2% e 2,1% da cultura, respectivamente. O tratamento com vincristina por 24 h levou ao acúmulo de cerca de 50% das células em G2/M. Neste momento também foi verificado aumento de células hipodiploides (7,9% células), correspondendo a células em processo de morte celular. O número de células em fase S sofreu redução para 12% assim como o número de células em G0/G1, que passou para menos de 30%. Durante os períodos de recuperação de 24 h, 48 h e 72 h a retenção de células em G2/M foi reduzida, porém se manteve ao redor de 25%, porcentagem maior do que o observado na situação controle. O pico de células em G0/G1 também sofreu aumento durante o período de recuperação, porém se manteve em torno de 35% e, portanto, menor do que na situação controle. Já a porcentagem de células em fase S se restabeleceu após 24 h e 48 h de recuperação. A população hipodiploide se manteve muito aumentada durante todos os períodos de recuperação avaliados, atingido seu máximo após 24 h de recuperação, quando chegou a 30%. A população hipertetraploide sofreu gradativo aumento ao longo dos períodos de recuperação, atingindo após 72 h de recuperação 6,38% (Fig. 6).

O tratamento de células tumorais HK2 com vincristina levou a alterações mais drásticas no ciclo celular quando comparada as células RPE. A cultura controle foi representada por 1,9% de células hipodiploides, 42,4% de células em G0/G1, 24,3% de células em fase S, 26,7% de células em G2/M e 4,6% de células hipertetraploides. Após o tratamento com vincristina por 24 h cerca de 70% das células estavam retidas em G2/M, e apenas 6% das células estavam em G0/G1. Ocorreu neste período também aumento de células hipodiploides (3,2%) e redução de células em fase S para 12,9%. A retenção de células em G2/M foi reduzida após 24 h de recuperação, quando a porcentagem de células nesta fase do ciclo ficou semelhante à observada nas células controle – em torno de 26%. Porém, após 72 h e 96 h de recuperação essa população de células foi ainda menor, chegando a 19% - valor reduzido em relação ao controle. Já a população de células em G0/G1, que foi drasticamente reduzida durante o tratamento, apresentou aumento após os períodos de recuperação, mas só se mostrou similar ao controle após 96 h de recuperação. O número de células em fase S

também aumentou durante o período de recuperação, mas se manteve menor do que o controle em todos os períodos de recuperação estudados. A população hipodiploide, que representa a população de células em morte celular, sofreu grande aumento durante os períodos de recuperação. Após 24 h e 48 h de recuperação cerca de 30% das células foram hipodiploides, e após 72 h e 96 h de recuperação esse número passou para cerca de 20%. A porcentagem de células que apresentam conteúdo de DNA hipertetraploides aumentou após 48 h de recuperação, e se manteve maior que o controle também após 72 h de recuperação (Fig. 7).

Estes resultados indicam que o tratamento com vincristina levou a retenção de células em metáfase nas duas linhagens analisadas, e que durante os períodos de recuperação, quando o pico formado em G2/M foi gradualmente reduzido, muitas células foram encaminhadas a morte celular. Durante os períodos de recuperação também foi detectado um aumento na formação de células hipertetraploides nas duas linhagens.

Ainda foi investigada a proliferação celular a partir da incorporação de BrdU por citometria de fluxo. O kit utilizado permite a detecção da incorporação de BrdU e também do conteúdo de DNA das células. Como a taxa de incorporação de BrdU foi diferente para as duas linhagens estudadas, foi considerado o total de células positivas para BrdU na situação controle como 100% para cada linhagem, e a porcentagem de células tratadas positivas para BrdU foi calculada em relação ao controle. Desta forma as alterações encontradas nas duas linhagens puderam ser comparadas mais facilmente.

Em células RPE, após o tratamento com vincristina e 24 h, 48 h e 72 h de recuperação ocorreu redução de mais de 50% no número de células em fase S, indicando redução da proliferação (Fig. 8 A). Quando analisada a distribuição de células positivas para BrdU de acordo com seu conteúdo de DNA (diploide/tetraploide ou hipertetraploides), não foram verificadas alterações estatisticamente significativas em relação ao controle (Fig. 8 B).

Em células HK2 o tratamento com vincristina também levou a redução de células em fase S em quase 50% após 48 h de recuperação. Porém, após 72 h de recuperação a redução foi menor, indicando que talvez essas células possam se recuperar e voltar a proliferar em taxas semelhantes às células controle (Fig. 8 A). Quando analisadas células diploides/tetraploides e hipertetraploides separadamente, ocorreu aumento de células hipertetraploides em fase S após o tratamento (Fig. 8 B).

Esses resultados mostram que o tratamento com vincristina levou a redução do número de células em fase S nas duas linhagens analisadas, mas de forma mais evidente nas células RPE. Também, células HK2 com conteúdo de DNA maior que tetraploide mostram-se

capazes de incorporar BrdU, sendo que o número destas células apresentou aumento após o tratamento. Já na linhagem RPE não foi detectado aumento significativo no número de células hipertetraploides em fase S após o tratamento.

Figura 6. Alterações no ciclo celular em células RPE tratadas com vincristina. Células RPE controle e tratadas com vincristina (VCR) tiveram seus núcleos corados e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. As células foram divididas em 5 classes de acordo com o seu conteúdo de DNA: hipodiploides, G0/G1, S, G2/M e hipertetraploides. **A)** Histogramas gerados ao citômetro de fluxo de células controle, tratadas com VCR por 24 h e tratadas e recuperadas por 24 h , 48 h e 72 h, evidenciando o pico de células em G2/M após o tratamento e o aumento da população hipodiploide nos períodos de recuperação; **B)** Porcentagens de células controle e tratadas nas diferentes fases do ciclo celular. O tratamento por 24 h levou a retenção das células em G2/M, e durante os períodos de recuperação o número de células retidas em G2/M diminuiu, mas se manteve maior que o detectado nas células controle mesmo após 72 h de recuperação. Após 24 h de recuperação muitas células hipodiploides, que correspondem a células em morte celular, foram detectadas. Após 48 h e 72 h de recuperação a porcentagem de células em morte celular diminuiu, mas ainda se manteve maior que o controle. Ocorreu redução do número de células em G0/G1, que também se manteve mesmo após 72 h de recuperação. O tratamento levou ao aumento de células hipertetraploides, principalmente após 72 h de recuperação.

Figura 7. Alterações no ciclo celular em células HK2 tratadas com vincristina. Células HK2 controle e tratadas com vincristina (VCR) tiveram seus núcleos corados e o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. As células foram divididas em 5 classes de acordo com o seu conteúdo de DNA: hipodiploides, G0/G1, S, G2/M e hipertetraploides. **A)** Histogramas gerados ao citômetro de fluxo de células controle, tratadas com VCR por 24 h e tratadas e recuperadas por 24 h , 48 h, 72 h e 96 h, evidenciando a formação do pico em G2/M após 24 h de tratamento, e a redução do pico G0/G1 e aumento da população hipodiploide durante os períodos de recuperação; **B)** Porcentagens de células controle e tratadas nas diferentes fases do ciclo celular. O tratamento por 24 h levou a retenção das células em G2/M, mas após 24 h e até 72 h de recuperação a porcentagem de células nessa fase do ciclo mostrou-se semelhante ao controle; já após 96 h de recuperação o número de células em G2/M apresentou-se reduzido em relação ao controle. O pico de células em G0/G1 sofreu grande redução após o tratamento, mas durante o período de recuperação o número de células nessa fase do ciclo aumentou gradualmente, sendo similar ao observado nas células controle após 96 h de recuperação. Células hipodiploides correspondem a células em morte celular, e a porcentagem destas células apresentou grande aumento após 24 h de recuperação e se manteve maior que o controle mesmo após 96 h de recuperação. O tratamento também levou ao aumento de células hipertetraploides após 48 h e 72 h de recuperação.

Figura 8. Porcentagem de células RPE e HK2 em fase S do ciclo celular após tratamento com vincristina.

Células RPE e HK2 controle e tratadas com vincristina (VCR) foram analisadas quanto a sua incorporação de BrdU, que indica presença de células em fase S do ciclo celular. A cromatina também foi corada, e ao citômetro de fluxo foi possível distinguir células em fase S e células diploides (2C), tetraploides (4C) e hipertetraploides (>4C). **A)** O total de células controle positivas para BrdU foi considerado como 100% para cada linhagem. O tratamento com vincristina levou a redução do número de células positivas para BrdU nas duas linhagens analisadas, mas de forma mais significativa em células RPE. A redução ocorreu em todos os períodos de recuperação analisados; **B)** Foi analisada a porcentagem de células em fase S considerando seu conteúdo nuclear. Foi considerado 100% o total de células positivas para BrdU em cada ponto analisado. Células RPE e HK2 controle apresentaram maioria das células em fase S sendo diploides-tetraploides. Nas células RPE ocorreu tendência de aumento na porcentagem de células tratadas com conteúdo hipertetraploide em fase S, porém o aumento não foi estatisticamente significativo. Já em células HK2 ocorreu aumento de células hipertetraploides que incorporaram BrdU após 24 h e 48 h de recuperação, indicando que células hipertetraploides formadas após o tratamento foram capazes de entrar em fase S.

Número de cromossomos em células RPE e HK2 controle e tratadas com vincristina

O número de cromossomos de células RPE e HK2 foi determinado a partir da análise de preparações metafásicas submetidas ao processo de bandeamento G. As lâminas foram observadas ao microscópio de luz, e o número de cromossomos em cada metáfase foi determinado com o auxílio de software de análise de imagens. Para cada tratamento/tempo de recuperação foram analisadas 100 metáfases de células da linhagem HK2 e 50 da linhagem RPE.

Em relação a linhagem RPE, as células controle apresentaram em 46 das 50 metáfases analisadas número de cromossomos entre 41 e 50, ou seja, muito próximo aos 46 cromossomos esperados para uma célula normal humana (Fig. 9 A). Após 24 h de tratamento com vincristina seguido de 48 h de recuperação poucas alterações foram observadas em relação ao número de cromossomos. 44 metáfases apresentaram entre 41 e 50 cromossomos, indicando discreta redução do número de metáfases diploides. Ocorreu também aumento de metáfases com número de cromossomos menor que 41: duas metáfases nas células controle, e cinco metáfases após o tratamento seguido de 48 h de recuperação (Fig. 9 B).

Já o tratamento das células HK2 com vincristina levou a alterações drásticas em relação ao número de cromossomos em células mitóticas. As células controle apresentaram grande variação do número de cromossomos, mas um pico considerado como diploide foi estabelecido: 86% das metáfases analisadas se concentraram dentro do intervalo entre 61 e 80 cromossomos, considerado então como diploide para esta linhagem. 8% das metáfases analisadas apresentaram número de cromossomos menor que 61, e 6% número maior que 80. Após o tratamento com vincristina por 24 h seguidas de 48 h de recuperação, o pico de metáfases consideradas diploides foi reduzido para 50%. Ocorreu notável aumento das populações consideradas hiperdiploide (entre 81 e 120) e tetraploide (entre 121 e 155 cromossomos), que passaram de 3% para 17% e 22%, respectivamente. 2% das metáfases ainda apresentaram número de cromossomos maior que 155, e 9% com número de cromossomos menor que 61 – valores semelhantes ao controle (Fig. 10).

Como o número de cromossomos em metáfases de células HK2 foi muito alterado após o tratamento com vincristina, optou-se também por analisar metáfases após períodos de recuperação mais longos. Após 72 h de recuperação o número de cromossomos se manteve ainda bem variado: 6% com conteúdo hipodiploide, 52% das metáfases com conteúdo

diploide, 16% e 18% com conteúdos cromossômicos hiperdiploide e tetraploide, respectivamente, e 8% das metáfases com conteúdo de cromossomos hipertetraploides, sendo a principal diferença entre o número de cromossomos de metáfases de células recuperadas por 48 h e 72 h foi o aumento do número de metáfases com conteúdo de cromossomos hipertetraploide. Já após 96 h de recuperação a porcentagem de metáfases diploides aumentou para 57%, mas ainda mostrou-se muito menor do que a observada nas células controle. O número de metáfases hipodiploides se manteve similar ao controle, e a frequência de metáfases hipertetraploides mostrou-se aumentado – 6%. A porcentagem de células tetraploides foi 8%, valor maior do que observado nas células controle, porém o menor valor encontrado entre os períodos de recuperação. A frequência de metáfases com conteúdo hiperdiploide neste momento foi de 20%, sendo a maior frequência de metáfases dentro deste intervalo observada em todos os experimentos (Fig. 10).

Estes resultados indicam uma resposta distinta em células RPE e HK2 após o tratamento com vincristina. Ocorreram poucas alterações no número de cromossomos em mitoses de células RPE. Porém, o tratamento de células HK2 levou a profundas alterações no número de cromossomos destas células, evidenciando a formação de células aneuploides com conteúdos variados de cromossomos. Essa resposta das células HK2 indica a existência de um mecanismo celular que possibilita sua proliferação mesmo após diversas alterações no seu cariótipo.

A**Número de cromossomos em células RPE controle** **B****Número de cromossomos em células RPE tratadas com VCR e recuperadas por 48h**

Figura 9. Número de cromossomos em células RPE controle e tratadas com vincristina. Foram analisadas 50 metáfases em preparações metafásicas de células RPE controle e tratadas com vincristina (VCR) por 24 h e recuperadas por 48 h. **A)** As células controle apresentaram de 42 a 50 cromossomos em 46 das metáfases analisadas, como esperado para uma linhagem de célula humana normal; **B)** Após o tratamento seguido de recuperação não foram observadas alterações significativas no número de cromossomos em células mitóticas. Ocorreu pequeno aumento de mitoses com menos de 42 cromossomos.

A

Número de cromossomos em células HK2 controle

Número de cromossomos em células HK2 tratadas com VCR e recuperadas por 48h

Número de cromossomos em células HK2 tratadas com VCR e recuperadas por 72h

Número de cromossomos em células HK2 tratadas com vincristina e recuperadas por 96h

B

Figura 10. Número de cromossomos em células HK2 controle e tratadas com vincristina. Foram analisadas 100 metáfases obtidas em preparações metafásicas de células HK2 controle, tratadas com vincristina (VCR) por 24 h e recuperadas por 48 h, 72 h e 96 h. **A)** Células HK2 controle apresentaram grande variação no número de cromossomos, mas 86 das 100 metáfases apresentaram entre 61 a 80 cromossomos – considerado aqui como intervalo diploide. Após o tratamento e períodos de recuperação muitas alterações no número de cromossomos foram observadas. Após 48 h de recuperação ocorreu redução do número de células com o conteúdo cromossômico diploide, e aumento de mitoses com número de cromossomos hiperdiploide e tetraploide. Após 72 h de recuperação as alterações observadas após 48 h de recuperação se mantiveram de maneira semelhante, porém também foi observado aumento de mitoses com número de cromossomos hipertetraploide. Após 96 h de recuperação ocorreu aumento de mitoses diploides, porém estas ainda foram observadas em menor frequência do que no controle. Neste momento o aumento do número de mitoses hiperdiploides se acentuou, enquanto o aumento do número de mitoses tetraploides mostrou-se reduzido em relação aos outros períodos de recuperação; **B)** Imagens obtidas a partir das preparações metafásicas, mostrando mitoses com número de cromossomos considerado diploide para a linhagem HK2 (80 cromossomos), hiperdiploide (98 cromossomos) e hipertetraploide (160 cromossomos).

Número de cinetócoros em células HK2 tratadas com vincristina

O tratamento de células HK2 com vincristina levou a muitas alterações em relação ao número de cromossomos em células metafásicas, conforme descrito acima. Decidiu-se então investigar o número de cromossomos em mitoses multipolares de células HK2 tratadas com vincristina e recuperadas por 48 h. Para tanto os cinetócoros das células foram evidenciados após imunofluorescência com anticorpo anti-Hec1, que detecta o cinetócoro de cada uma das cromátides, e os fusos foram marcados com anticorpos anti- α e anti- β -tubulina. As imagens das mitoses foram adquiridas ao microscópio confocal de varredura a laser, depois passaram por processo de *deconvolution* (Fig. 11 A) e posteriormente foram reconstruídas tridimensionalmente (Fig. 11 B).

Em células HK2 controle foram observadas mitoses majoritariamente bipolares que apresentaram em média 142 cinetócoros por metáfase, equivalente a 71 cromossomos (n=11). Após o tratamento com vincristina seguido de 48 h de recuperação a quantificação foi possível em apenas uma mitose bipolar, que apresentou 152 cinetócoros. Já em mitoses quadripolares (com quatro polos dos fusos), o número de cinetócoros variou de 135 a 280, com média de 181 cinetócoros (n=6). Porém, a maior parte das mitoses apresentaram entre 135 e 182 cromossomos, valores próximos aos observados nas células controle. Mitoses com mais de quatro polos dos fusos, chamadas neste momento de multipolares, apresentaram de 112 a 380 cinetócoros, resultando em média de 261 cinetócoros por mitose (n=10). Embora o número de cinetócoros tenha sido bastante variado nesse grupo, sua distribuição sugere a presença de dois conjuntos de células: um com número de cinetócoros semelhantes aos observados nas metáfases controle, e outro com aproximadamente o dobro do número de cinetócoros (Fig. 11 C).

Os resultados acima indicam uma grande variação do número de cinetócoros em mitoses com mais que dois polos dos fusos após o tratamento com vincristina, que refletem a variação do número de cromossomos observada nas preparações metafásicas. Mitoses com mais que quatro polos dos fusos apresentaram de forma geral mais cromossomos que mitoses quadripolares, indicando que o aumento do número de centrosomos está relacionado com o aumento do número de cromossomos. Porém, em mitoses quadripolares, quando seria esperado o dobro do número de cromossomos se a duplicação dos centrosomos fosse acompanhada pela replicação do DNA, foi observado número de cromossomos semelhante ao de mitoses bipolares controle. Isso indica que a amplificação centrossômica nessas células

deve ser independente de processos que levem ao aumento do conteúdo cromossômico, como ocorre no caso de falhas na divisão celular.

C Número de cinetócoros em mitoses de células HK2 tratadas com vincristina

Figura 11. Número de cinetócoros em células HK2 tratadas com vincristina. Células HK2 controle e tratadas com vincristina (VCR) por 24 h e recuperadas por 48 h foram submetidas à imunofluorescência para detecção dos cinetócoros e fusos. Foram adquiridas imagens ao microscópio confocal de mitoses bipolares, quadripolares e também de mitoses com mais do que 4 polos dos fusos, chamadas de multipolares. Após processo de *deconvolution* as imagens foram reconstruídas tridimensionalmente e as estruturas correspondentes aos cinetócoros foram quantificadas. **A)** Imagem de mitose multipolar após tratamento com VCR e 48 h de recuperação após processo de *deconvolution*; **B)** Reconstrução da imagem pelo software Imaris, com detecção dos cinetócoros (pontos brancos). 305 cinetócoros foram detectados nesta imagem; **C)** Foram quantificados os números de cinetócoros em mitoses bipolares de células controle, e em mitose bipolar, quadripolares e multipolares de células tratadas. Os valores apresentados correspondem a média do número de cinetócoros em cada grupo, e os símbolos cada uma das mitoses analisadas. O número de cinetócoros em mitoses quadripolares não foi o dobro do número observado em mitoses bipolares. Em mitoses multipolares o número de cinetócoros variou entre as metáfases analisadas.

Observação de células HK2 em tempo real

O tratamento de células HK2 com vincristina levou a alterações marcantes na morfologia das células, com a formação de células bi e multinucleadas e mitoses multipolares. Experimentos indicaram que as células tratadas continuaram proliferando, inclusive as que apresentaram aumento do conteúdo de DNA. Dessa forma decidimos acompanhar por microscopia em tempo real a formação de células bi e multinucleadas e de mitoses multipolares após o tratamento com vincristina. Foram utilizadas células HK2 transfectadas com o vetor H2B-GFP para visualização da cromatina por fluorescência. Após 24 h da transfecção as células foram tratadas com vincristina por 24 h, lavadas gentilmente com PBS e observadas por períodos de até 24 h.

Células controle H2B-GFP não apresentaram alta frequência de morte celular, e se dividiram de maneira muito semelhante as células controle não transfectadas. A maior parte das divisões foi bipolar e resultaram em duas células-filhas mononucleadas (dado mostrado na Fig. 13 do capítulo 2).

Nas primeiras 24 h de recuperação após o tratamento foram observados os destinos de células retidas em mitose. Estas células puderam permanecer retidas em mitose ainda por longos períodos (até 18 h), não progredindo no ciclo celular durante o período de observação. O segundo destino observado foi a morte celular diretamente da mitose, com a fragmentação da cromatina, a formação de inúmeras “bolhas” na membrana plasmática e a perda da adesão da célula ao substrato. O terceiro destino observado foi a saída da mitose sem divisão celular, chamada *mitotic slippage* (Fig. 12). Em células HK2 este processo ocorreu após diversas alterações na forma das células, com a formação de protuberâncias e perda da forma esférica observada em células em metáfase. Foi observado também durante esse processo o espalhamento da cromatina, que deixou de se manter concentrada em uma única estrutura (Fig. 12 B). A célula filha resultante após a saída da mitose foi na maior parte dos casos bi ou multinucleada, mas também foram observadas células com apenas um núcleo após este processo (Fig. 12 A). Estes dados mostram que muitas das células retidas em metáfase foram encaminhadas à morte celular ainda em metáfase, embora outras consigam sair da fase M sem que ocorra a divisão celular, formando apenas uma célula mononucleada ou não, que deve carregar conteúdo de DNA tetraploide e ter o dobro do número de centrôssomos.

Após 48 h e 72 h de recuperação foram observadas diversas mitoses bipolares originadas de células mononucleadas que resultam em células-filhas mononucleadas, e também muitas mitoses multipolares. As mitoses multipolares foram originadas a partir de

células mononucleadas, bi ou multinucleadas, e puderam também formar células-filhas com um ou mais núcleos. No início da telófase e citocinese da maioria das divisões multipolares formaram-se três ou até quatro células-filhas que geralmente sofreram fusão logo após a telófase ou durante o início da citocinese. Dessa maneira o resultado final mais frequente após uma divisão multipolar foi a formação de duas células-filhas com mais de um núcleo (Fig. 13 A). Também foi observada a divisão dos cromossomos em três ou mais lotes concomitante com a divisão do citoplasma em apenas duas células-filhas. Nestes casos ocorreu a formação de duas células-filhas, sendo uma delas com mais de um núcleo (Fig. 13 C). Em outros casos as células-filhas geradas após divisões multipolares apresentaram apenas um núcleo, este íntegro ou lobulado, ou ainda apresentaram micronúcleos (Fig. 13 B).

Em alguns casos foram observadas divisões bipolares originadas de células bi ou multinucleadas que geraram células-filhas mononucleadas. A divisão bipolar ocorreu após o alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e a divisão em duas células-filhas. As células-filhas formadas, embora mononucleadas, puderam apresentar micronúcleos (Fig. 14).

Células mononucleadas observadas durante o período de recuperação após o tratamento com vincristina na maioria dos casos formaram mitoses bipolares e geraram duas células-filhas. Porém, em alguns casos foram observadas células mononucleadas que deram origem a células binucleadas devido à fusão das células-filhas logo após a telófase (Fig. 15 célula A). Outras anormalidades mitóticas ainda foram observadas após o tratamento com vincristina, como a entrada e saída da mitose em apenas 30 minutos sem ocorrência de divisão celular, com formação de célula-filha binucleada. Esta célula ainda pode entrar em mitose novamente, e gerar duas células-filhas binucleadas (Figura 15 célula B).

Estes resultados evidenciam que células mononucleadas e multinucleadas podem ser formadas pelo processo de saída da mitose sem divisão celular após o tratamento com vincristina. Durante 48 h de recuperação após o tratamento células mononucleadas e multinucleadas deram origem a células-filhas com um ou mais núcleos através de mitoses multipolares. Muitas anormalidades durante as mitoses foram observadas, sugerindo a ocorrência de muitos erros de segregação cromossômica.

Figura 12. Mitotic Slippage em células HK2 tratadas com vincristina. Células HK2 transfectadas com o plasmídeo H2B-GFP para visualização da cromatina foram tratadas com vincristina por 24 h e observadas por *time-lapse* durante as primeiras 24 h de recuperação em meio livre de droga. Foram observadas diversas células retidas em metáfase que foram capazes de sair da fase M sem passar pela anáfase e telófase, processo chamado de *mitotic slippage*. **A)** Célula entrou em metáfase e foi capaz de sair da mitose sem passar pela divisão celular, formando uma célula mononucleada. Durante o processo foram observadas diversas protrusões da membrana; **B)** Célula retida em metáfase saiu da mitose sem passar pela divisão celular. Durante o processo a morfologia da célula sofreu grandes alterações e até a cromatina foi dividida. Apenas um célula-filha binucleada foi formada.

Figura 13. Destinos de células bi e multinucleadas após tratamento com vincristina. Células HK2 transfetadas com o plasmídeo H2B-GFP para visualização da cromatina foram tratadas com vincristina por 24 h, recuperadas por 48 h e observadas por *time-lapse*. Diversas células bi e multinucleadas foram observadas e seus destinos foram analisados. **A)** Célula multinucleada entrou em mitose multipolar e se dividiu em três células-filhas. Porém, duas delas se fundiram formando uma célula multinucleada; **B)** Célula binucleada entrou em mitose multipolar e se dividiu gerando três células-filhas, duas com núcleo lobulado e uma mononucleada; **C)** Célula binucleada entrou em mitose e os cromossomos se dividiram em três lotes, porém o citoplasma se dividiu em duas células, uma mononucleada e uma binucleada.

Figura 14. Destino de célula multinucleada após tratamento com vincristina: divisão bipolar. Células HK2 transfectadas com o plasmídeo H2B-GFP para visualização da cromatina foram tratadas com vincristina por 24 h, recuperadas por 48 h e observadas por *time-lapse*. Diversas células bi e multinucleadas foram observadas e seus destinos foram analisados. Célula multinucleada entrou em mitose e, em intervalo de tempo similar ao observado em células controle, se dividiu em duas células-filhas mononucleadas.

Figura 15. Destino de células mononucleadas após tratamento com vincristina. Células HK2 transfetadas com o plasmídeo H2B-GFP para visualização da cromatina foram tratadas com vincristina por 24 h, recuperadas por 48 h e observadas por *time-lapse*. **Célula A)** Célula mononucleada entrou em mitose e os cromossomos foram divididos em dois lotes. Porém, a célula não foi capaz de se dividir e formou apenas uma célula-filha binucleada; **Célula B)** Célula mononucleada apresentou cromatina condensada e forma arredondada, como se fosse entrar em mitose. Porém, após 30 min voltou ao estado interfásico, gerando uma célula binucleada. Esta entrou em mitose novamente e formou duas células-filhas binucleadas.

Amplificação centrossômica em células HK2 e RPE tratadas com vincristina

O tratamento com vincristina levou a muitas alterações na morfologia das células, como a formação de células micronucleadas e multinucleadas. Durante os períodos de recuperação ainda foram observadas células em divisão multipolar nas células HK2, o que nos levou a investigar aspectos relacionados aos centrossomos nas células RPE e HK2 tratadas com vincristina. As células foram submetidas à imunofluorescência e foram adquiridas imagens ao microscópio confocal de varredura a laser. Em alguns casos as estruturas presentes nos centrossomos, como os centríolos e a matriz pericentriolar, foram reconstruídas tridimensionalmente para auxiliar sua visualização.

- Células RPE

Células RPE controle apresentaram um centrossomo por célula formado por dois centríolos positivos para Centrina rodeados por matriz pericentriolar contendo Pericentrina e γ -tubulina (Fig. 16 B e C). Quanto aos centríolos, na maioria dos casos um deles foi positivo para Cenexin e o outro para Centrobina, indicando assim a presença de um centríolo-mãe e um centríolo-filho, respectivamente (Fig. 16 E). Em algumas células interfásicas ainda foram observados quatro centríolos envoltos pela mesma matriz pericentriolar, ou divididos em dois centrossomos distintos. Esses casos devem corresponder a células em fase S ou G2, que já apresentam os centríolos duplicados. Em células mitóticas foram observados dois centrossomos, cada um contendo dois centríolos, sendo um centríolo-mãe e um centríolo-filho, envoltos por matriz contendo Pericentrina, γ -tubulina (Fig. 16 A e E) e Aurora A.

Durante as 24 h de tratamento com vincristina muitas células ficaram retidas em metáfase, as chamadas d-mitoses. Estas células apresentaram microtúbulos curtos ou fragmentados, agregados próximos aos centrossomos ou em diferentes pontos das células (Fig. 17 A). A partir da marcação de Pericentrina foram observados dois centrossomos, ou ainda a fragmentação da matriz pericentriolar em diversos pontos pelo citoplasma (Fig. 17 A, B e C). A fragmentação da matriz pericentriolar foi mais evidente após a marcação de Aurora A, quando a maior parte das células metafásicas apresentaram múltiplos focos da proteína (Fig. 17 C). Já a marcação de γ -tubulina não indicou a fragmentação da matriz, sendo que apenas dois focos da proteína foram observados na maioria das células (Fig. 17 D). Quando analisados os centríolos em células retidas em metáfase, a marcação com Centrina revelou a presença de quatro centríolos na maior parte das células, observados formando dois pares de centríolos ou quatro centríolos distantes uns dos outros (Fig. 17 B e D). A presença de mais que quatro centríolos por célula ocorreu em poucos casos (menos que 5% das células analisadas). A

marcação de Centrina ainda pode parecer difusa e espalhada pelo citoplasma, padrão não observado nas preparações de células controle (Fig. 17 B). A marcação de Centrobin e Cenexin também revelou padrão semelhante ao observado nas células mitóticas controle: presença de dois centríolos-mãe e dois centríolos-filhos (Fig. 17 E).

Em relação às células que permaneceram em interfase após o tratamento com vincristina, a marcação dos microtúbulos revelou a ausência da rede de microtúbulos pelo citoplasma, mostrando apenas estruturas curtas e agregadas em alguns pontos das células (Fig. 18 A). Células mononucleadas apresentaram um ou dois centrossomos formados por dois ou quatro centríolos, semelhante ao observado nas células controle (Fig. 18 B). Já células multinucleadas apresentaram alterações nessas estruturas: foram observados mais que dois centrossomos por célula e a análise dos centríolos revelou a presença de mais que quatro centríolos por célula, e perda do balanço entre o número de centríolos-mãe e centríolos-filho (Fig. 18 C e D).

Durante os períodos de recuperação de 24 h e 48 h foi observada a amplificação centrossômica em células com um ou mais núcleos. Nas células com amplificação foram observados de um a quatro focos de Pericentrina ou γ -tubulina, e ainda a presença de até oito centríolos marcados para Centrina (Fig. 19 A e B). Estes centríolos ainda puderam estar concentrados em apenas um centrossomo, indicando a ocorrência de processo de aumento do número de centríolos sem a formação de novos centrossomos. Células multinucleadas com apenas dois centríolos em um centrossomo foram também observadas, mostrando que a amplificação centrossômica, além de não estar limitada a células com mais de um núcleo, não está presente em todas as células multinucleadas (Fig. 19 C). A marcação dos centríolos com Centrobin e Cenexin evidenciou alterações no balanço entre o número de centríolos-mãe e centríolos-filhos, com maior presença destes últimos. As alterações foram mais frequentes em células multinucleadas, quando foram observados um ou dois centríolos-mãe e de quatro a seis centríolos-filhos. (Fig. 20).

Figura 16. Centrossomos em células RPE controle. Células RPE controle foram submetidas à imunofluorescência para visualização de seus centrossomos. Cromatina em azul. **A)** Células RPE mitóticas apresentaram dois centrossomos (marcados por Pericentrina) com dois centríolos (marcados por Centrina) cada; **B e C)** Células interfásicas apresentaram dois centríolos (Centrina) rodeado por matriz pericentriolar (Pericentrina e γ -tubulina); **D)** Célula mitótica com dois centrossomos, cada um deles formado por um centríolo-filho (Centrobin) e um centríolo-mãe (Cenexin); **E)** Células interfásicas apresentaram um centrossomo, composto por um centríolo-filho (Centrobin) e um centríolo-mãe (Cenexin). Barra=10 μ m.

A legenda dessa figura encontra-se no verso da página ao lado.

Figura 18. Centrossomos em células RPE interfásicas após 24 h de tratamento com vincristina. Células RPE foram tratadas com vincristina por 24 h e submetidas à imunofluorescência para visualização dos centríolos e matriz pericentriolar. Foram adquiridas imagens de células interfásicas e analisados seus centrossomos. Cromatina em azul. **A)** Após o tratamento foram observados apenas microtúbulos (marcados por α -tubulina) muito curtos próximos ou não dos centrossomos (marcados por Pericentrina). Apenas um ou dois centrossomos foram observados em células mononucleadas; **B)** Células interfásicas mononucleadas com apenas um centrossomo composto por dois centríolos marcados por Centrina envolvidos por matriz pericentriolar; **C)** Célula multinucleada com quatro focos de Centrina e quatro de Pericentrina, dois co-localizados e dois não; **D)** Célula multinucleada com mais centríolos-filhos (marcados por Centrobina) do que centríolos-mãe (marcados por Cenexin), e centríolos-filhos distantes de centríolos-mãe foram observados. Barra=10 μ m.

■ centrina ■ pericentrina ■ cromatina

A legenda desta figura encontra-se no verso da página anterior.

Figura 20. Centríolos-filhos e centríolos-mãe em células RPE tratadas com vincristina. Células RPE foram tratadas com vincristina por 24 h, recuperadas por 24 h e submetidas à imunofluorescência para observação dos centríolos-filhos (Centrobín) e centríolos-mãe (Cenexín). As imagens adquiridas foram também reconstruídas tridimensionalmente para melhor visualização dos centríolos (detalhes em A'-A''' e B'-B'''). **A)** Células mononucleadas e multinucleadas formadas após o tratamento com vincristina. Em A': célula multinucleada com amplificação centrossômica. Foram observados cinco centríolos marcados com Centrobín, um marcado com Cenexín e um positivo para as duas proteínas. Apenas um centríolo-filho estava próximo do centríolo-mãe. Em A'': célula mononucleada com quatro centríolos, todos positivos para Centrobín e dois positivos para Cenexín. Em A''': célula mononucleada com um centríolo-filho e um centríolo-mãe próximos; **B)** Célula mononucleada, binucleada e multinucleada após tratamento com vincristina. Em B' e B'': célula multinucleada (B') e binucleada (B'') com quatro centríolos-filhos e um centríolo-mãe. Em B''': célula mononucleada com um centríolo-filho e um centríolo-mãe.

-Células HK2

Células HK2 controle apresentaram células interfásicas com um ou dois centrossomos formados por dois a quatro centríolos envoltos por matriz positiva para Pericentrina e γ -tubulina. Em células mitóticas foram observados dois centrossomos positivos para Pericentrina, γ -tubulina e Aurora A formando os polos dos fusos (Fig. 21).

Primeiramente foi analisada a matriz pericentriolar dos centrossomos de células tratadas com vincristina. Após o tratamento por 24 h as células retidas em metáfase apresentaram a fragmentação da matriz pericentriolar revelada pela presença de Aurora A e Pericentrina em múltiplos pontos da célula, e não apenas nos dois centrossomos (Fig. 22 A, D, E e F). Após 24 h e 48 h de recuperação essa fragmentação não foi mais observada, e apenas os polos dos fusos de mitoses bipolares e multipolares foram positivos para essas proteínas (Fig. 22 B, C, G e J). Em células interfásicas foram observados de um a quatro centrossomos, sendo que a presença de mais que dois centrossomos foi mais frequente em células bi e multinucleadas. Quando apenas um centrossomo foi observado nessas células, sua matriz apresentou-se maior do que a observada nas células controle (Fig. 22 G, H, I, J).

Em relação à presença dos centríolos, o tratamento com vincristina levou a alterações no número de centríolos principalmente durante os períodos de recuperação após o tratamento. Após o tratamento com vincristina por 24 h muitas das células retidas metáfase apresentaram marcação mais difusa de Centrina, mas não foram observados mais que quatro centríolos por célula. A marcação de apenas dois centríolos foi muito frequente, e possivelmente em decorrência da baixa deposição de Centrina nos centríolos-filho ou pela maior proximidade dos centríolos-mãe e filho durante a fase M, dificultando a distinção entre eles (Fig. 23 C). As células que permaneceram em interfase após o tratamento com vincristina por 24 h também foram observadas. Células mononucleadas apresentaram dois ou quatro centríolos envoltos por matriz, como observado nas células controle (Fig. 23 A). Células interfásicas multinucleadas apresentaram de dois a oito centríolos, distribuídos em de um a quatro centrossomos. Números não esperados de centríolos foram observados, como cinco ou seis, evidenciando a ocorrência de processo de amplificação nessas células (Fig. 23 B).

Nas culturas tratadas com vincristina e recuperadas por 48 h foram observadas diversas células multinucleadas e mitoses multipolares. A análise dos centríolos nestas células revelou a presença de amplificação centrossômica, sendo que até dez centríolos foram observados em uma única célula. Os centríolos apresentaram-se distribuídos em de um a quatro centrossomos, detectados pela presença de matriz pericentriolar positiva para Pericentrina (Fig. 24). Em alguns casos células multinucleadas e mononucleadas apresentaram

oito centríolos envoltos pela mesma matriz pericentriolar, sugerindo a ocorrência de processo de amplificação centrossômica (Fig. 24 C e Fig. 25 A). Em mitoses multipolares após o tratamento seguido de períodos de recuperação até dez centríolos foram observados, distribuídos entre quatro a oito centrossomos. Nessas células também foram observados focos de Pericentrina com apenas um centríolo (Fig. 25 B). A presença de marcação de Pericentrina sem a ocorrência de detecção de Centrina ocorreu em alguns casos (Fig. 24 A), mas este não foi um evento tão frequente quanto a presença de um grande foco de Pericentrina contendo múltiplos centríolos.

Esses resultados mostram a ocorrência de amplificação centrossômica em células HK2 e RPE tratadas com vincristina. De forma geral, foi observada a fragmentação da matriz pericentriolar durante a retenção em metáfase, e ainda células multinucleadas apresentaram números variados de centríolos logo após o tratamento. Nos períodos de recuperação foram observadas células mononucleadas e multinucleadas com até dez centríolos envoltos por uma abundante matriz pericentriolar. Essas alterações indicam a ocorrência de processo de amplificação que envolva o aumento do número de centríolos, como a reduplicação destes.

Figura 21: Centrossomos em células HK2 controle. Células HK2 controle foram submetidas à imunofluorescência para observação dos centrossomos. Em A, B e C cromatina em vermelho. **A e B)** Células mitóticas apresentaram dois centrossomos, um em cada polo dos fusos, positivos para γ -tubulina e Aurora A; **C)** Células interfásicas apresentaram um ou dois centrossomos positivos para Pericentrina, e células mitóticas apresentaram dois centrossomos, um em cada polo dos fusos; **D)** Células interfásicas mononucleadas apresentaram um centrossomo positivo para Pericentrina, contendo dois ou quatro centríolos cada (marcados para Centrina). Imagem em DIC evidencia contorno das células e dos núcleos. Os centríolos e matriz pericentriolar foram reconstruídos tridimensionalmente para melhor visualização destas estruturas, como mostrado em D', D'' e D'''. Em D' e D'': detalhe dos centrossomos com dois centríolos. Em D''': detalhe do centrossomo com quatro centríolos muito próximos, provavelmente recém-duplicados. Barra=10 μ m.

A legenda desta figura encontra-se no verso da página anterior.

Figura 23. Centríolos e matriz pericentriolar em células HK2 tratadas com vincristina. Células HK2 foram tratadas com vincristina por 24 h e submetidas à imunofluorescência para observação dos centríolos (Centrina) e matriz pericentriolar (Pericentrina). As imagens adquiridas foram também reconstruídas tridimensionalmente para melhor visualização dos centrosomos (detalhes em A'-A''', B'-B''' e C'). **A)** Durante o tratamento células interfásicas mononucleadas apresentaram centríolos duplicados, distribuídos em um ou dois centrosomos, indicando que as células estavam provavelmente em S ou G2. Em A': centrosomo com quatro centríolos. Em A'' e A''': dois centrosomos observados na mesma célula apresentaram dois centríolos cada; **B)** Após o tratamento algumas células multinucleadas apresentaram amplificação centrosômica. Célula multinucleada com três centrosomos observados pela marcação de Pericentrina, dois deles com dois centríolos (B'' e B''') e um deles com um centríolo (B'); **C)** Células retidas em mitose apresentaram duas marcações para Centrina e fragmentação da matriz pericentriolar. A reconstrução (C') permitiu a visualização de dois centríolos em cada célula, envolvidos por matriz pericentriolar, e outros pontos de concentração de Pericentrina e sem marcação de Centrina. Barra=10μm.

Figura 24. Centríolos e matriz pericentriolar em células HK2 multinucleadas após tratamento com vincristina. Células HK2 foram tratadas com vincristina por 24 h, recuperadas por 48 h e submetidas à imunofluorescência para observação dos centríolos (Centrina) e matriz pericentriolar (Pericentrina). As imagens adquiridas também foram reconstruídas tridimensionalmente para melhor visualização dos centrossomos (detalhes em A', B'-B'' e C'-C''). Imagens em DIC foram adquiridas para visualização do contorno das células e núcleos, evidenciando a presença de células multinucleadas. **A)** Célula multinucleada com dois focos principais de Pericentrina e outros três menores. Cinco centríolos foram detectados, quatro deles distribuídos entre os focos principais de Pericentrina (A'); **B)** Célula multinucleada com amplificação centrossômica apresentou cinco focos de Centrina distribuídos em quatro focos de Pericentrina. Um quinto foco de Pericentrina foi observado, mas este sem marcação para Centrina; **C)** Célula multinucleada com um foco de Pericentrina contendo nove centríolos muito próximos. Barra=10μm.

Figura 25. Centríolos e matriz pericentriolar em células HK2 tratadas com vincristina. Células HK2 foram tratadas com vincristina por 24 h, recuperadas por 48 h e submetidas à imunofluorescência para observação dos centríolos (Centrina) e matriz pericentriolar (Pericentrina). As imagens adquiridas também foram reconstruídas tridimensionalmente para melhor visualização dos centrosomos (detalhes em A'-A'', B'-B''). Imagens em DIC foram adquiridas para visualização do contorno das células e núcleos. **A)** Célula interfásica mononucleada com um centrosomo contendo sete centríolos muito próximos; **B)** Mitose multipolar com sete focos de Pericentrina, todos com de um a três centríolos, somando dez centríolos. Barra=10μm.

Expressão de genes relacionados ao ciclo celular, mitose e citoesqueleto em células HK2 e RPE tratadas com vincristina

O tratamento com vincristina levou a alterações na proliferação e ciclo celular, e também levou a anormalidades centrossômicas. Desta forma foi investigada a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, mitose e citoesqueleto através de PCR quantitativo. Foram desenhados *primers* de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e mitose (Aurora A, Aurora B, Ciclina B, Ciclina E), e de genes relacionados ao citoesqueleto (β -tubulina, actina e γ -tubulina), utilizando RNA proveniente de células RPE e HK2 controle, tratadas com vincristina por 24 h e tratadas e recuperadas por 48 h em meio livre de droga. Como o tratamento leva a um grande aumento de células em mitose, foram coletadas para extração de RNA populações enriquecidas em células interfásicas, obtidas após lavagem das culturas para remoção das células mitóticas. Esse procedimento foi realizado tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado e tratado e recuperado por 48 h. A análise foi feita considerando a massa de RNA total utilizado nas reações e os resultados obtidos foram apresentados em relação ao controle, sempre considerado 1.

De forma geral as células RPE responderam de forma mais uniforme ao tratamento, e os três experimentos independentes geraram resultados similares em relação à expressão dos genes analisados. As células HK2 mostraram resultados mais variados, e para os genes Ciclina B e Ciclina E não foi possível estabelecer um resultado como padrão de resposta.

A análise dos genes relacionados à mitose (Aurora A, Aurora B, Ciclina B, Ciclina E) revelou que as células RPE tratadas com vincristina por 24 h apresentam grande redução da expressão destes genes, chegando a ser até dez vezes menor do que a observada nas células controle. Após 48 h de recuperação a expressão destes genes ainda se manteve bastante reduzida. Os genes relacionados ao citoesqueleto também apresentaram expressão reduzida após 24 h de tratamento. A expressão de β -tubulina e actina se restabeleceu após 48 h de recuperação, porém os níveis de expressão de γ -tubulina ainda se mantiveram reduzidos (Fig. 26 A e C).

Células HK2 mostraram respostas diferentes quando comparadas as células RPE. Após o tratamento com vincristina e após o tratamento seguido de recuperação ocorreu grande aumento da expressão de Aurora A, sendo que após o 24 h de tratamento a expressão chegou a ser cinco vezes maior que o controle, e após 48 h de recuperação a expressão chegou a ser até três vezes maior do que a observada no controle. A expressão de Aurora B não sofreu alteração após o tratamento, e a expressão de Ciclina B mostrou-se aumentada após 24 h de tratamento, chegando a 1,6, mas após 48 h de recuperação os experimentos não se

mostraram conclusivos em relação à expressão deste gene. A expressão de Ciclina E não apresentou nenhum padrão de resposta nos experimentos tanto após 24 h de tratamento quanto após o tratamento seguido de recuperação (dados não mostrados) (Fig. 26 B).

Após 24 h de tratamento com vincristina ocorreu também redução da expressão de β -tubulina e γ -tubulina, sendo que a expressão de β -tubulina chegou a 0,3 e a de γ -tubulina chegou a 0,7. Após o 48 h de recuperação a expressão de β -tubulina se reestabeleceu a 0,8, enquanto que a de γ -tubulina continuou reduzida, ficando ao redor de 0,6 (Fig. 26 D).

Estes dados mostram que as células HK2 e RPE responderam de forma diferente ao tratamento com vincristina em relação à expressão de genes relacionados à mitose, ciclo celular e citoesqueleto. De forma geral as células RPE tratadas com vincristina apresentaram redução drástica de Ciclinas B e E e de Aurora A e B, e os níveis mantiveram-se reduzidos mesmo após 48 h de recuperação. Já os níveis de expressão de genes relacionados ao citoesqueleto foram reduzidos após o tratamento, mas após 48 h de recuperação os níveis de expressão de actina e α -tubulina se reestabeleceram. Células HK2 mostraram grande aumento de expressão de Aurora A após o tratamento com vincristina, variação da expressão de Ciclina B e E, e redução da expressão de α e γ -tubulina.

Os níveis proteicos de Aurora A e Aurora B em células HK2 foram verificados por Western Blotting. Também foram coletadas populações enriquecidas em células interfásicas para a extração das proteínas. Após 24 h de tratamento não foram observadas alterações nos níveis de Aurora A e Aurora B; após 24 h de recuperação foi detectado aumento de expressão de Aurora A, que também foi detectado após 48 h de recuperação. Esse resultado está em concordância com os níveis da expressão de Aurora A detectados por PCR. Já os níveis proteicos de Aurora B nos períodos de recuperação parecem ter sido reduzidos, o que não ocorreu com os níveis de RNAm (Fig. 26 E).

Figura 26. Expressão gênica e níveis proteicos após tratamento com vincristina. Foram realizadas reações de PCR quantitativo para análise da expressão de genes relacionados ao ciclo celular, mitose e citoesqueleto utilizando RNA de células RPE e HK2 interfásicas controle, tratadas com vincristina (VCR) por 24 h e tratadas e recuperadas por 48 h. **A)** Expressão de genes relacionados ao ciclo celular e mitose em células RPE. Em células após o tratamento ocorreu redução da expressão dos genes Aurora A e B, e Ciclina B e E. A redução de expressão também foi detectada após o tratamento seguido de 48 h de recuperação; **B)** Em células HK2 ocorreu aumento da expressão de Aurora A, enquanto os níveis de Aurora B se mantiveram semelhantes aos níveis detectados nas células controle; **C)** Expressão de genes relacionados ao citoesqueleto. Em células RPE ocorreu a redução da expressão de β -tubulina, actina e γ -tubulina após 24 h de tratamento com VCR. Após 48 h de recuperação apenas os níveis de γ -tubulina se mantiveram menores do que o controle; **D)** Em células HK2 após 24 h de tratamento ocorreu a redução da expressão de β -tubulina e γ -tubulina, e após 48 h de recuperação ocorreu redução da expressão de actina e γ -tubulina em relação ao controle; **E)** Os níveis proteicos de Aurora B e Aurora A fosforilada em células HK2 ainda foram verificados por Western Blotting. Após 24 h de tratamento não foram detectadas alterações. Após 24 h e 48 h de recuperação ocorreu aumento de Aurora A fosforilada e redução de Aurora B.

Tratamento de esferoides de células HK2 com vincristina

Foi realizada cultura 3D de células HK2, que após sete dias gerou esferoides de 30 a 150 µm de diâmetro com mais de cinco camadas de células. Esses esferoides foram tratados com vincristina para observação dos efeitos da droga na cultura 3D e comparação com os efeitos na cultura 2D.

O tratamento dos esferoides com a mesma concentração de vincristina utilizada nas células cultivadas em 2D levou a poucas alterações em sua morfologia. Dessa forma foi utilizada o dobro da concentração usada na cultura 2D (0,025 µg/mL), possibilitando assim a detecção de alterações celulares.

Quando observados ao microscópio de luz, a maior parte dos esferoides controle apresentou contorno regular, com apenas algumas células esféricas formando protuberâncias na superfície. Estas células apresentaram morfologia compatível com células em divisão (Fig. 27 A). Após o tratamento dos esferoides com vincristina por 24 h ocorreu a formação de muitas células soltas além de esferoides fragmentados. Foi possível observar principalmente no contorno dos esferoides células grandes e esféricas, semelhantes a células em processo de morte celular ou em retenção em metáfase (Fig. 27 B). Após 48 h de recuperação ainda foram observadas células soltas no meio, e também esferoides menores do que os observados no controle. A maioria dos esferoides ainda apresentou contorno irregular, embora alguns tenham apresentado morfologia muito semelhante ao controle (Fig. 27 C).

A detecção de células multinucleadas e também de amplificação centrossômica foi observada a partir de dois métodos: a fixação dos esferoides inteiros e submissão à imunofluorescência com anticorpos anti- α -tubulina e anti-pericentrina, e a dissociação enzimática dos esferoides para que as células fossem então coletadas e fixadas para imunofluorescência. A análise dos esferoides inteiros revelou que o tratamento com vincristina por 24 h levou à fragmentação dos microtúbulos, sendo identificada apenas uma rede difusa de microtúbulos. Foi observado aumento do número de células em mitose principalmente nas camadas mais superficiais dos esferoides, e algumas destas células em metáfase apresentaram fusos multipolares e fragmentação da matriz pericentriolar. Células com cromatina muito condensada, provavelmente em processo de morte celular, também foram observadas na periferia dos esferoides (Fig. 28 B).

A análise após dissociação dos esferoides controle revelou presença de células mononucleadas com um ou raramente dois centrossomos. Poucas células binucleadas foram observadas, e geralmente estas apresentaram um centrossomo. Essas características se

assemelham a cultura de células HK2 em monocamada (Fig. 28 A). O tratamento com vincristina por 24 h levou ao aumento do número de células metáfase, que também apresentaram fragmentação da matriz pericentriolar. Em relação às células interfásicas, estas apresentaram em sua maioria um núcleo, além de um ou dois centrossomos íntegros (Fig. 28 C). Após 48 h de recuperação foram observadas células bi e multinucleadas acompanhadas de amplificação centrossômica, e poucas células em mitose (Fig. 28 D). Após 72 h de recuperação ainda foram observadas células com mais de um núcleo e amplificação centrossômica, embora a maior parte das células tenha apresentado apenas um núcleo (Fig. 28 E).

Estes resultados indicam que o tratamento de esferoides de células HK2 com vincristina leva a alterações semelhantes às encontradas na cultura em monocamada, como a retenção de células em metáfase com fragmentação da matriz pericentriolar, e formação de células bi e multinucleadas. Porém, as células quando cultivadas em esferoides parecem ser mais resistentes ao tratamento, já que foi utilizado o dobro da concentração da droga e o número de células retidas em metáfase foi menor do que o observado na cultura em monocamada. Isso indica que as células quando em esferoides apresentam algum tipo de resistência, seja pela presença da barreira representada pelas várias camadas de células, ou por mecanismos moleculares.

Figura 27. Tratamento de esferoides de células HK2 com vincristina. Células HK2 foram cultivadas em placas de Petri sem tratamento para adesão. As células se agregaram e passaram a se proliferar nesta condição. **A)** Após 8 dias em cultura as células formaram estruturas esféricas compactas, de 30 a 100 µm de diâmetro, chamadas de esferoides; **B)** Os esferoides, quando tratados com vincristina (VCR) por 24 h, apresentaram alteração da sua morfologia, com contorno irregular e células se soltando dos esferoides; **C)** Após 48 h de recuperação os esferoides apresentaram morfologia semelhante ao controle, porém alguns esferoides ainda mostraram contorno irregular (seta).

A legenda desta figura encontra-se no verso da página anterior.

DISCUSSÃO

A vincristina é uma droga antimicrotúbulos que vem sendo utilizada como quimioterápico há muito anos devido à sua ação citotóxica. A indução de instabilidade cromossômica e aneuploidia vêm sendo relacionados ao tratamento com venenos dos fusos, e podem ter grande influência na morte celular induzida por estas drogas, como podem também levar à formação de células tumorais mais agressivas.

Alterações no ciclo e morfologia celular e formação de células aneuploides

Células RPE e HK2 foram tratadas com concentrações de vincristina suficientes para induzir a retenção de cerca de 50% das células em metáfase após 24 h de tratamento. Após esse tratamento as células foram incubadas em meio livre de droga por períodos de 24 a 96 horas. Nesses períodos foram observadas células micronucleadas, bi e multinucleadas nas duas linhagens estudadas, e ocorreu a formação de população hipertetraploide verificada por meio de citometria de fluxo após marcação da cromatina, indicando que o tratamento levou a alterações celulares semelhantes na linhagem normal e tumoral. Essas alterações também foram reportadas por outros trabalhos que estudam os mecanismos de ação de drogas antimicrotúbulos, revelando assim respostas comuns em diferentes tipos celulares (Jordan *et al.*, 1996; Blajeski *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005; Nakagawa, 2006).

De forma geral as células normais RPE se mostraram mais resistentes ao tratamento, já que a concentração da droga utilizada para que ocorresse a retenção em mitose nesta linhagem foi quatro vezes maior do que a concentração utilizada nas células tumorais HK2. As células RPE em cultura também apresentaram morfologia semelhante às células controle mais rapidamente durante o período de recuperação do que células HK2. Os níveis de morte celular foram similares nas duas linhagens após o tratamento e 24 h de recuperação, mas essas taxas foram reduzidas mais rapidamente em células RPE: após 48 h de recuperação a porcentagem de células RPE em morte foi similar às porcentagens em células HK2 após 96 h de recuperação. Brito e Rieder (2006) também mostraram que células RPE ao serem tratadas com nocodazol e taxol exibem taxas menores de morte celular que células HeLa, que são cancerosas. A morte das células RPE e HeLa após o tratamento ocorreu em células que estavam em retidas em metáfase, ocorrendo então diretamente da fase M, ou ocorreu na intérfase seguinte após a célula escapar da retenção. Nos dois casos as células RPE mostram taxas de morte celular menores que das células HeLa. Essa diferença entre o comportamento das células da linhagem normal e tumoral se manteve mesmo após o uso de concentrações baixas de taxol, consideradas clinicamente relevantes (Brito & Rieder, 2010). Esses dados evidenciam que

tratamentos com venenos dos fusos mostram-se mais eficazes contra as células tumorais, e esse efeito parece não depender da taxa de proliferação, uma vez que a taxa de proliferação das células RPE é semelhante à de células HeLa e mais alta que de células HK2.

Porém, quando células normais sobrevivem ao tratamento com venenos dos fusos, elas geralmente realizam a saída da mitose, gerando células tetraploides. Investigar os destinos dessas células é importante, uma vez que células tetraploides podem representar um estágio intermediário entre o diploide e o aneuploide, e assim contribuir para a tumorigênese (Ganem *et al.*, 2007; Storchova & Kuffer, 2008).

Nossos dados indicam que as células normais RPE, embora tenham se mostrado mais resistentes ao tratamento, sofreram grande redução de proliferação durante os períodos de recuperação, conforme demonstrado pelos índices de incorporação de BrdU e pelos níveis de expressão de genes relacionados ao ciclo celular e mitose. O tratamento pode ter induzido a senescência dessas células, que por sua vez pode ser decorrente da catástrofe mitótica. Alguns trabalhos sugerem que a morte por este mecanismo, que pode ser induzida principalmente após o uso de venenos dos fusos, provoca morte celular ainda em metáfase ou a célula pode escapar da mitose e formar uma célula interfásica que entrará em senescência (Huang *et al.*, 2010; Galán-Malo *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2012). Após o tratamento de células RPE e 48 h de recuperação, cerca de 45% das células mostraram-se bi ou multinucleadas, provavelmente formadas pela saída da mitose. Essas células devem estar senescentes, o que justifica a redução na taxa de incorporação de BrdU para cerca de 50% quando comparada ao controle. Dessa forma, quando analisadas as taxas de morte celular, o tratamento pareceu ser mais eficiente contra células tumorais, mas também pode levar a redução de células RPE viáveis, sugerindo que o tratamento pode também interferir na homeostase de tecidos normais.

Uma maneira de aumentar a sobrevivência das células após o tratamento com venenos dos fusos é via indução da expressão de p53 antes do tratamento com a droga antimitótica. O aumento dos níveis de p53 causa retenção reversível das células em G1 ou G2, e assim estas não sofrem retenção em metáfase durante o tratamento com a droga antimicrotúbulo. Esse tratamento ainda favorece apenas as células que possuem p53 normal, excluindo grande parte das células tumorais (Apontes *et al.*, 2011).

Outras funções de p53 diferentes da sua atuação clássica nos pontos de checagem após dano ao DNA foram descritas em células tratadas com drogas que atuam na mitose. p53 foi descrita por se ligar a BubR1, quinase que atua no ponto de checagem mitótico, principalmente durante a mitose, ocasionando o aumento dos níveis de ativação de p53 após os danos aos fusos causados pelas drogas antimicrotúbulos (Ha *et al.*, 2007). Células que

realizam a saída da mitose durante o tratamento ainda apresentam altos níveis de p53, que inibem sua entrada no ciclo novamente (Lanni & Jacks, 1998). Esses dados mostram que as diferenças encontradas entre as células RPE e HK2 podem ser reflexos da atividade de p53. Experimentos sobre a presença de mutações neste gene poderiam confirmar essa hipótese.

O comportamento de células HK2 após o tratamento foi diferente do observado em células RPE. Células HK2 também mostraram redução de quase 40% na frequência de células em fase S do ciclo após 48 h de recuperação, observada pela incorporação de BrdU. Porém, após 72 h de recuperação a redução foi de cerca de 20%, evidenciando que as células não tiveram sua proliferação tão comprometida quanto as células RPE. A incorporação de BrdU foi detectada em células tetraploides e também hipertetraploides, indicando que células HK2 foram capazes de sintetizar DNA mesmo após ganho de cromossomos.

Os dados de citometria de fluxo mostraram a formação de células hipertetraploides após o tratamento com vincristina seguidos de períodos de recuperação nas duas linhagens estudadas. Porém, a análise das preparações metafásicas de células controle e tratadas revelou alteração no número de cromossomos apenas nas células HK2. A ausência de detecção de alterações no número de cromossomos em células RPE tratadas com vincristina aponta para duas possibilidades: células aneuploides foram formadas em frequência muito baixa na cultura desta linhagem, sendo assim dificilmente detectadas nas preparações metafásicas, ou células aneuploides formadas não foram capazes de proliferar, impossibilitando a detecção destas células nas preparações metafásicas. A primeira possibilidade é improvável, uma vez que após o tratamento ocorreu a formação de células bi e multinucleadas, chegando a cerca de 45% da população, e diversos estudos mostram que células com essa morfologia após o tratamento são formadas principalmente após saída da mitose, sem a ocorrência de divisão celular (Brito & Rieder, 2010; Lee *et al.*, 2011; Schnerch *et al.*, 2013). Outras observações ainda apontam para a segunda possibilidade apresentada, corroborando a hipótese de que as células RPE tetraploides formadas não foram capazes de proliferar: os dados de BrdU apontam para redução da proliferação e a frequência da população em mitose foi bastante reduzida. Com a redução da proliferação observada por esses dois métodos, o aumento da população em G2/M observada por citometria de fluxo pode ser decorrente da presença de células tetraploides na cultura. Logo, os dados indicam que as células RPE tetraploides geradas após o tratamento com vincristina não foram capazes de proliferar e por isso não foram detectadas nas preparações metafásicas. Já células HK2 com conteúdo aumentado de cromossomos mostraram-se capazes de proliferar e foram detectadas nas preparações metafásicas.

Nas preparações metafásicas de células HK2 foram observadas células com números muito variados de cromossomos mesmo após 48 h de recuperação após o tratamento, quando as células ainda apresentaram perfil do ciclo e morfologia celular alterados. Isto mostra que células HK2 aneuploides geradas pelo tratamento com vincristina foram capazes de progredir no ciclo celular e de chegar à mitose.

Esses resultados indicam que o tratamento com vincristina levou a algumas alterações celulares similares nas duas linhagens, como a formação de células bi e multinucleadas e micronucleadas, mas as consequências dessas alterações só foram observadas em células HK2, uma vez que a proliferação das células que carregaram essas alterações só ocorreu nesta linhagem. O estudo das células HK2 permitiu a análise das consequências da amplificação centrossômica observada após o tratamento com vincristina, e também evidenciou que alterações de plodia são muito frequentes em células tumorais tratadas com essa droga. Levando-se em consideração que a linhagem HK2 já possui um número de cromossomos bastante aumentado, ela deve suportar maiores variações de ploidia em relação às células normais, como as da linhagem RPE. Essas alterações de ploidia podem induzir a morte celular, mas também a formação de células mais agressivas, conforme discutido no Capítulo 1.

A formação de células aneuploides pode ser explicada a partir dos dados obtidos por observação das células HK2 por *time-lapse*. Nas primeiras horas de recuperação após o tratamento com vincristina, células retidas em metáfase foram encaminhadas para a morte celular ou foi observada a saída da mitose sem a divisão celular, chamada *mitotic slippage*. A célula-filha resultante deste processo apresentou conteúdo de DNA e de centrossomos duplicado, podendo formar mitoses multipolares e células aneuploides no próximo ciclo celular. A formação de mitoses multipolares foi observada em células fixadas, e também por *time-lapse*, quando células mononucleadas e multinucleadas deram origem a mitoses multipolares que, por sua vez, formaram também células com um ou mais núcleos. Dessa forma o processo de saída da mitose poderia ter levado à formação de células tetraploides que, ao entrarem no ciclo celular novamente, contribuiriam para a formação de células aneuploides.

Porém, alguns resultados não mostraram esse processo de forma clara. As metáfases apresentaram números muito variados de cromossomos após 48 h de recuperação. Além disso, não foi observada a formação de uma população tetraploide e posterior formação de células aneuploides, como seria esperado caso o primeiro passo para a formação de células aneuploides fosse a saída de mitose sem a divisão celular. Isso nos leva a inferir que outros

mecanismos estejam associados à indução de aneuploidia em células HK2 tratadas com vincristina.

Alguns estudos mostram que células quando tratadas por longos períodos com venenos dos fusos em concentrações baixas, que não impedem totalmente a formação dos fusos, ficam retidas em metáfase, mas podem se dividir ainda durante o tratamento, formando duas, três ou até quatro células-filhas. Nestes últimos casos, as células certamente serão aneuploides. A concentração de vincristina utilizada no presente estudo impediu totalmente a formação dos fusos, evidenciando que as células não seriam capazes de realizar a divisão celular. Também, nas células submetidas à imunofluorescência não foram observadas figuras que sugerem algum tipo de divisão celular. Os experimentos de *time-lapse* não foram realizados durante as 24 h de tratamento, e assim não pudemos constatar se algumas células retidas em metáfase concluíram a divisão celular. Contudo, nas primeiras 24 h de recuperação foram observadas células saindo da mitose sem fazer a divisão celular. Durante o processo de saída da mitose muitas células formaram diversas protrusões na membrana, formando estruturas com aspecto de bolhas e dividindo seu citoplasma. Em alguns desses casos foram observados fragmentos de cromatina nessas “bolhas”. Talvez o processo de saída da mitose, causando essas alterações na morfologia celular, propicie a perda de cromossomos. Estudos direcionados a essa possibilidade podem ser realizados, como a análise do número de cromossomos em células submetidas a períodos curtos de recuperação. A análise ainda poderia ser feita em células interfásicas por meio de imunofluorescência para detecção dos centrômeros.

As principais alterações na morfologia das células HK2 também foram observadas em células cultivadas em 3D, como a formação de células bi e multinucleadas e formação de múltiplos focos de Pericentrina durante a retenção em metáfase. Porém, foi necessário o dobro da concentração de droga para que ocorresse a retenção em metáfase, indicando que as células quando em esferoides apresentam algum mecanismos de resistência. As camadas de células podem representar uma barreira física à penetração da droga, dificultando sua passagem até células do interior do esferoide. Também, as células quando cultivadas em 3D podem apresentar outros tipos de resistência, como a mediada pelo aumento da adesão célula-célula, ou pelo aumento da expressão de genes cujas proteínas executam o efluxo de drogas (Niero *et al.*, 2014). Os resultados aqui apresentados mostram que todos esses aspectos podem ser estudados neste modelo de cultura 3D submetido ao tratamento com vincristina, podendo assim levar a dados mais precisos e similares ao que ocorre *in vivo*.

Indução de amplificação centrossômica

Os resultados evidenciaram a ocorrência de amplificação centrossômica nas células das duas linhagens tratadas com vincristina. Nas células RPE foi possível realizar o estudo da amplificação apenas em células interfásicas, uma vez que não foram detectadas mitoses multipolares nesta linhagem. Já na linhagem HK2 foram observadas células com anormalidades centrossômicas em alta frequência durante todos os períodos de recuperação, além de mitoses multipolares. Estes resultados, em conjunto com os dados de incorporação de BrdU e preparações metafásicas, indicam que células HK2 com conteúdo aneuploide e também com conteúdo anormal de centrossomos progrediram no ciclo celular, enquanto que células RPE com conteúdo anormal de cromossomos e centrossomos não foram detectadas em mitose. Dessa forma, o tratamento provocou diversas alterações celulares que foram eliminadas na cultura de células RPE uma vez que sua proliferação foi reduzida. Já as alterações causadas pelo tratamento em células HK2 permaneceram na cultura e puderam ser observadas mesmo após longos períodos de recuperação.

A amplificação centrossômica pode ser fruto de erros na duplicação dos centrossomos, formação de centrossomos *de novo*, fragmentação da matriz pericentriolar, e falhas na divisão celular. Um dos destinos de células tratadas com vincristina observado por *time-lapse* foi a saída da mitose e formação de apenas uma célula-filha. Este processo contribui tanto para a formação de células tetraploides quanto células com amplificação centrossômica, sendo assim uma possível causa do aumento do número de centrossomos observado em células tratadas. Corroborar esta hipótese o fato da amplificação centrossômica após tratamento de 24 h com vincristina ter sido mais evidente em células multinucleadas, que provavelmente foram formadas após a saída da mitose. Porém, a análise dos centríolos indicou que a amplificação observada não apresentou na maior parte dos casos o padrão esperado para células que sofreram apenas saída da mitose. Os dados de *time-lapse* mostraram que durante os períodos de recuperação muitas anormalidades ocorreram durante a mitose, como divisões multipolares, fusão de células após a divisão celular e saída da mitose. Todas essas alterações podem contribuir para a formação de células com número muito alterado de cromossomos e centrossomos.

A análise do número de cinetócoros em mitoses após o tratamento com vincristina e 48 h de recuperação também não revelou a relação esperada entre o número de cromossomos e de centrossomos para células que sofreram saída da mitose. Foram observadas mitoses com quatro e até dez polos dos fusos, chamadas de quadripolares e multipolares, respectivamente. O número de cinetócoros nas mitoses quadripolares foi muito

similar ao observado nas mitoses controle bipolares. Isso indica que a amplificação centrossômica observada não foi acompanhada do aumento do número de cromossomos, e assim essas células não seriam resultado de saída da mitose. Em mitoses multipolares ocorreu uma alta variação do número de cinetócoros, e assim a média não tornou-se representativa. Analisando o número de cinetócoros nas mitoses multipolares, dois conjuntos foram observados: um conjunto com o número de cinetócoros similar ao de mitoses bipolares controle, e outro com número aumentado de cinetócoros, similar ou maior que o dobro do número observado nas células controle. A existência desse conjunto de mitoses multipolares com número de cinetócoros próximo ao número encontrado em mitoses bipolares sugere que a amplificação centrossômica pode ter ocorrido em células que não sofreram alteração no seu conteúdo de cromossomos, corroborando a ideia que a amplificação ocorreu em células que não passaram pela saída da mitose. Dessa forma, outros mecanismos de amplificação centrossômica, além da saída da mitose seguida de mitoses multipolares, devem ocorrer em células tratadas com vincristina.

Pelas metodologias abordadas no presente estudo foi possível obter indícios sobre os mecanismos de amplificação centrossômica que podem ter ocorrido após o tratamento com vincristina. Foram observadas células mononucleadas com mais que quatro centríolos unidos em um mesmo centrossomo, indicando a ocorrência de reduplicação dos centríolos. A reduplicação dos centríolos pode ocorrer após falhas no processo de duplicação devido, por exemplo, ao aumento da expressão de Plk4, Sas-6, ou redução dos níveis de Cullin-1 ou da atividade do proteassoma (Zou *et al.*, 2005; Bettencourt-Dias & Glover, 2007; Nigg & Stearns, 2011; Brownlee & Rogers, 2013). O estudo desses eventos após o tratamento com vincristina pode trazer informações importantes sobre a amplificação centrossômica neste sistema.

A formação de centríolos *de novo* pode ser distinguida da reduplicação dos centríolos pela presença de dois centríolos-filhos distantes de um centríolo-mãe (Pannu *et al.*, 2012). Essa situação foi observada em algumas células multinucleadas, porém em menor frequência do que a presença de um centrossomo com múltiplos centríolos-filhos próximos. Dessa forma, a reduplicação dos centríolos parece ser um processo mais plausível para ocorrer neste sistema do que a ocorrência de centríolos *de novo*.

Os resultados também mostraram anormalidades na matriz pericentriolar. Durante o tratamento com vincristina as células retidas em metáfase apresentaram fragmentação da matriz pericentriolar – visualizada principalmente pela marcação com Pericentrina – mas não apresentaram aumento do número de centríolos. Em células interfásicas multinucleadas foi observado o aumento do número de centríolos e também a formação de mais que dois

centrossomos evidenciados pela presença de matriz pericentriolar. Também ocorreu a formação de um centrossomo maior que do que o observado nas células controle, com abundante matriz pericentriolar. Zhu e colaboradores (2005) mostram a presença de centrossomos extras em células retidas em metáfase após tratamento com taxol. Esses centrossomos mostram-se positivos para Pericentrina, mas negativos para γ -tubulina. Dados semelhantes foram observados por Hornick e colaboradores (2008), que evidenciam a formação de múltiplas regiões nucleadoras de microtúbulos em células tratadas com taxol. Essas regiões nucleadoras mostram-se positivas para NuMA e HSET, mas não para γ -tubulina. Nossos resultados também mostraram que γ -tubulina se manteve associada apenas aos centríolos e evidenciou a fragmentação da matriz pericentriolar.

Loncarek e colaboradores (2008) mostram que o aumento da expressão de Pericentrina em células retidas em fase S do ciclo celular leva à formação de múltiplos centríolos-filhos (Loncarek *et al.*, 2008). Assim, a fragmentação da matriz pericentriolar observada durante a retenção em mitose e a formação de centrossomos com matriz mais abundante após o tratamento podem também ser eventos que levam ao aumento do número de centríolos nas células HK2 e RPE.

O tratamento com vincristina também levou ao aumento dos níveis de expressão de Aurora A apenas em células HK2. Embora para a extração de RNA a população coletada tenha sido enriquecida com célula interfásicas, o aumento da expressão de Aurora A após as 24 h de recuperação pode estar associado à maior presença de células em G2, já que Aurora A é ativada no início de M, mas em G2 já podem ser detectados altos níveis do RNAm e da proteína fosforilada (Nikonova *et al.*, 2013). Porém, esse aumento não foi observado em células RPE, sugerindo que a retenção em G2 pode não ser suficiente para causar os elevados níveis da expressão de Aurora A. O aumento dos níveis de RNAm foi observado também após o tratamento seguido de 48 h de recuperação, quando o acúmulo em das células interfásicas em G2 já mostrou-se reduzido. O aumento dos níveis proteicos de Aurora A ocorreram após 24 h e 48 h de recuperação, evidenciando que o aumento do nível de RNAm se correlacionou com o aumento do nível da proteína. A superexpressão de Aurora A induz a amplificação centrossômica, e parece estar associada a este processo em tumores, sendo hoje alvo de terapias (Carvajal *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Aurora A também atua na estabilidade de Centrina, através de sua fosforilação. Desta forma, o aumento da expressão de Aurora A leva a reduplicação dos centríolos devido ao aumento da fosforilação de Centrina (Lukasiewicz *et al.*, 2011). Dentro deste contexto, a amplificação centrossômica observada em células HK2 pode também ter sido provocada pelo aumento da expressão de Aurora A.

Estudos recentes também mostram que a redução dos níveis de Aurora A pode aumentar os níveis de morte celular após o tratamento de células com drogas antimitóticas. Com isso, hoje são testadas combinações entre essas drogas e inibidores de Aurora A para aumentar a eficiência das quimioterapias (Anand *et al.*, 2003; Lentini *et al.*, 2008; Mahadevan *et al.*, 2012; Isham *et al.*, 2013). No presente estudo células HK2 apresentaram maiores níveis de morte celular quando comparadas a células RPE após o tratamento com vincristina. Porém, células HK2 apresentaram menores efeitos sobre a proliferação do que células RPE. O aumento da expressão de Aurora A, observado somente em células HK2, pode também estar relacionado com a manutenção da proliferação das células tratadas. Assim, o aumento da expressão de Aurora A pode ter grande importância após o tratamento de células tumorais com venenos dos fusos, pois pode atuar tanto na indução de amplificação centrossômica e instabilidade cromossômica como no aumento das taxas de sobrevivência e proliferação.

A presença de células com amplificação centrossômica levou à formação de células multipolares na linhagem HK2. Mitoses multipolares são frequentes em células tumorais e estão amplamente relacionadas à formação de células aneuploides (Nigg, 2002). Diversas mitoses multipolares que se dividiram em mais que duas células-filhas foram observadas por *time-lapse*, gerando células com um ou mais núcleos. Desta forma, a formação de mitoses multipolares pode ser o mecanismo responsável pela formação de células aneuploides com conteúdo de cromossomos tão variados como os observado nas preparações metafásicas durante os períodos de recuperação.

CONCLUSÃO

O tratamento com vincristina levou à formação de células multinucleadas, micronucleadas e com amplificação centrossômica nas duas linhagens estudadas. Apenas a linhagem tumoral mostrou-se capaz de proliferar na presença de alterações centrossômicas, gerando diversas anormalidades mitóticas que culminaram na formação de células com diferentes graus de aneuploidia.

A formação de células multinucleadas foi decorrente de saída da mitose após retenção em metáfase, e nas células HK2 também foi decorrente de divisões celulares anormais nos períodos de recuperação. Células multinucleadas desta linhagem foram capazes de proliferar.

A amplificação centrossômica foi originada a partir da saída da mitose, mas os dados indicam que outros processos também ocorreram durante o tratamento. Os dados são compatíveis com a ocorrência de reduplicação dos centríolos. Foi observada a presença de fragmentação da matriz pericentriolar e formação de centrossomos com matriz abundante,

que podem desencadear o aumento do número de centríolos. Nas células HK2 o tratamento levou ao aumento da expressão de Aurora A, fato que pode contribuir para a sua sobrevivência e proliferação. Além disso, o aumento da expressão de Aurora A pode promover a amplificação centrossômica, sendo um mecanismo também relacionado à formação de mitoses multipolares.

O tratamento do modelo de cultura 3D de células HK2 evidenciou alterações celulares semelhantes entre a cultura 2D e 3D, sugerindo que ambos modelos podem ser utilizados para o estudo dos mecanismos de ação da vincristina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abal, M., Andreu, J. M., and Barasoain, I. (2003). Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr. Cancer Drug Targets* 3, 193–203.

Do Amaral, J. B., Rezende-Teixeira, P., Freitas, V. M., and Machado-Santelli, G. M. (2011). MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue Eng. Part C. Methods* 17, 1097–1107.

Do Amaral, J. B., Urabayashi, M. S., and Machado-Santelli, G. M. (2010). Cell death and lumen formation in spheroids of MCF-7 cells. *Cell Biol. Int.* 34, 267–274.

Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A. R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3, 51–62.

Andreassen, P. R., Martineau, S. N., and Margolis, R. L. (1996). Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. *Mutat. Res.* 372, 181–194.

Apontes, P., Leontieva, O. V, Demidenko, Z. N., Li, F., and Mikhail, V. (2011). Exploring long-term protection of normal human fibroblasts and epithelial cells from chemotherapy in cell culture Abstract : 2, 222–233.

Bennouna, J., Delord, J.-P., Campone, M., and Nguyen, L. (2008). Vinflunine: a new microtubule inhibitor agent. *Clin. Cancer Res.* 14, 1625–1632.

Bettencourt-Dias, M., and Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 451–463.

Bian, M., Fu, J., Yan, Y., Chen, Q., Yang, C., Shi, Q., Jiang, Q., and Zhang, C. (2010). Short exposure to paclitaxel induces multipolar spindle formation and aneuploidy through promotion of acentrosomal pole assembly. *Sci. China. Life Sci.* 53, 1322–1329.

Blajeski, a L., Kottke, T. J., and Kaufmann, S. H. (2001). A multistep model for paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* 270, 277–288.

- Bokhari, M., Carnachan, R. J., Cameron, N. R., and Przyborski, S. a (2007). Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *J. Anat.* *211*, 567–576.
- Brito, D. a, and Rieder, C. L. (2006). Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr. Biol.* *16*, 1194–1200.
- Brito, D. A., and Rieder, C. L. (2010). The ability to survive mitosis in the presence of microtubule poisons differs significantly between human nontransformed (RPE-1) and cancer (U2OS, HeLa) cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 437–447.
- Brownlee, C. W., and Rogers, G. C. (2013). Show me your license, please: deregulation of centriole duplication mechanisms that promote amplification. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 1021–1034.
- Carvajal, R. D., Tse, A., and Schwartz, G. K. (2006). Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* *12*, 6869–6875.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., and Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* *294*, 1708–1712.
- Friedrich, J., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L. a (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int. J. Radiat. Biol.* *83*, 849–871.
- Galán-Malo, P., Vela, L., Gonzalo, O., Calvo-Sanjuán, R., Gracia-Fleta, L., Naval, J., and Marzo, I. (2012). Cell fate after mitotic arrest in different tumor cells is determined by the balance between slippage and apoptotic threshold. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *258*, 384–393.
- Galluzzi, L. *et al.* (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* *19*, 107–120.
- Ganem, N. J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *17*, 157–162.
- Gascoigne, K. E., and Taylor, S. S. (2008). Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* *14*, 111–122.
- Gascoigne, K. E., and Taylor, S. S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* *122*, 2579–2585.
- Gurda, G. T., Zhu, Q., Bai, H., Pan, D., Schwarz, K. B., and Anders, R. a (2014). The use of Yes-associated protein expression in the diagnosis of persistent neonatal cholestatic liver disease. *Hum. Pathol.* *45*, 1057–1064.
- Ha, G.-H., Baek, K.-H., Kim, H.-S., Jeong, S.-J., Kim, C.-M., McKeon, F., and Lee, C.-W. (2007). p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation. *Cancer Res.* *67*, 7155–7164.

Hall, H. G., Farson, D. a, and Bissell, M. J. (1982). Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 4672–4676.

Hanahan, D., Weinberg, R. A., and Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L. a (2010). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* *148*, 3–15.

Hornick, J. E., Bader, J. R., Tribble, E. K., Trimble, K., Breunig, J. S., Halpin, E. S., Vaughan, K. T., and Hinchcliffe, E. H. (2008). Live-Cell Analysis of Mitotic Spindle Formation in Taxol-Treated Cells.

Huang, H.-C., Mitchison, T. J., and Shi, J. (2010). Stochastic competition between mechanistically independent slippage and death pathways determines cell fate during mitotic arrest. *PLoS One* *5*, e15724.

Isham, C. R. *et al.* (2013). Pazopanib enhances paclitaxel-induced mitotic catastrophe in anaplastic thyroid cancer. *Sci. Transl. Med.* *5*, 166ra3.

Johnson, I. S., Armstrong, J. G., and Gorman, M. (1963). The Vinca Alkaloids : A New Class of Oncolytic Agents The Vinca Alkaloids : A New Class of Oncolytic Agents. *Cancer Res.* *23*, 1390–1427.

Jordan, M. a, Toso, R. J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9552–9556.

Jordan, M. A., Thrower, D., and Wilson, L. (1991). Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids1. *Cancer Res.* *51*, 2212–2222.

Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., and Wilson, L. (1996). Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit and Apoptotic Cell Death Mitotic Block Induced in HeLa Cells by Low Concentrations of Paclitaxel (Taxol) Results in Abnormal Mitotic Exit . 816–825.

Lanni, J. S., and Jacks, T. (1998). Characterization of the p53-Dependent Postmitotic Checkpoint following Spindle Disruption. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 1055–1064.

Lee, K., Kenny, A. E., and Rieder, C. L. (2011). Caspase activity is not required for the mitotic checkpoint or mitotic slippage in human cells. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2470–2479.

Lentini, L., Amato, A., Schillaci, T., Insalaco, L., and Di Leonardo, A. (2008). Aurora-A transcriptional silencing and vincristine treatment show a synergistic effect in human tumor cells. *Oncol. Res.* *17*, 115–125.

- Loncarek, J., Hergert, P., Magidson, V., and Khodjakov, A. (2008). Control of daughter centriole formation by the pericentriolar material. *Nat. Cell Biol.* 10, 322–328.
- Lotfi, C. F., and Machado-Santelli, G. M. (1996). Comparative analysis of colchicine induced micronuclei in different cell types in vitro. *Mutat. Res.* 349, 77–83.
- Luca, A. C. *et al.* (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 8, e59689.
- Lukasiewicz, K. B., Greenwood, T. M., Negron, V. C., Bruzek, A. K., Salisbury, J. L., and Lingle, W. L. (2011). Control of centrin stability by Aurora A. *PLoS One* 6, e21291.
- Mahadevan, D., Stejskal, A., Cooke, L. S., Manziello, A., Morales, C., Persky, D. O., Fisher, R. I., Miller, T. P., and Qi, W. (2012). Aurora A inhibitor (MLN8237) plus vincristine plus rituximab is synthetic lethal and a potential curative therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res.* 18, 2210–2219.
- Manchado, E., Guillaumot, M., and Malumbres, M. (2012). Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ.* 19, 369–377.
- Marzo, I., and Naval, J. (2013). Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. *Biochem. Pharmacol.* 86, 703–710.
- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8, 413–450.
- Nakagawa, E. (2006). Estudo do significado biológico da multinucleação induzida por vincristina em células em cultura. In: Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo., 165.
- Niero, E. L., Rocha-Sales, B., Lauand, C., Cortez, B. A., de Souza, M. M., Rezende-Teixeira, P., Urabayashi, M. S., Martens, A. A., Neves, J. H., and Machado-Santelli, G. M. (2014). The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 33, 37.
- Nigg, E. a, and Stearns, T. (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat. Cell Biol.* 13, 1154–1160.
- Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer pregression? *Nat. Rev. Genet.* 3, 815–815.
- Nikonova, A. S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I. G., Dunbrack, R. L., and Golemis, E. a (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 661–687.
- Nitta, M., Tsuiki, H., Arima, Y., Harada, K., Nishizaki, T., Sasaki, K., Mimori, T., Ushio, Y., and Saya, H. (2002). Hyperploidy induced by drugs that inhibit formation of microtubule promotes chromosome instability. *Genes Cells* 7, 151–162.

Page, H., Flood, P., and Reynaud, E. G. (2013). Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res.* 352, 123–131.

Pannu, V., Rida, P. C. G., Ogden, a, Clewley, R., Cheng, a, Karna, P., Lopus, M., Mishra, R. C., Zhou, J., and Aneja, R. (2012). Induction of robust de novo centrosome amplification, high-grade spindle multipolarity and metaphase catastrophe: a novel chemotherapeutic approach. *Cell Death Dis.* 3, e346.

Prestwich, G. D. (2008). Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. *Acc. Chem. Res.* 41, 139–148.

Rai, S. S., and Wolff, J. (1996). Localization of the Vinblastine-binding Site on beta -Tubulin. *J Biol Chem* 271, 14707–14711.

Santini, M. T., Rainaldi, G., and Indovina, P. L. (2000). Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36, 75–87.

Schnerch, D., Follo, M., Felthaus, J., Engelhardt, M., and Wäsch, R. (2013). The 3' untranslated region of the cyclin B mRNA is not sufficient to enhance the synthesis of cyclin B during a mitotic block in human cells. *PLoS One* 8, e74379.

Sheltzer, J. M., and Amon, A. (2011). The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. *Trends Genet.* 27, 446–453.

Spencer, V. a, Xu, R., and Bissell, M. J. (2010). Gene expression in the third dimension: the ECM-nucleus connection. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15, 65–71.

Storchova, Z., and Kuffer, C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J. Cell Sci.* 121, 3859–3866.

Wang, X., Zhou, Y.-X., Qiao, W., Tominaga, Y., Ouchi, M., Ouchi, T., and Deng, C.-X. (2006). Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene* 25, 7148–7158.

Weaver, B. a, and Cleveland, D. W. (2008). The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 14, 431–433.

Wendell, K. L., Wilson, L., and Jordan, M. a (1993). Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 2, 261–274.

William, O. L. E., Rnnov-jessen, L., Howlett, A. R., and Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells.

Yang, Z., Kenny, A. E., Brito, D. a, and Rieder, C. L. (2009). Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. *J. Cell Biol.* 186, 675–684.

Zasadil, L. M., Andersen, K. a, Yeum, D., Rocque, G. B., Wilke, L. G., Tevaarwerk, A. J., Raines, R. T., Burkard, M. E., and Weaver, B. a (2014). Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci. Transl. Med.* 6, 229ra43.

Zhu, J., Beattie, E. C., Yang, Y., Wang, H.-J., Seo, J.-Y., and Yang, L.-X. (2005). Centrosome impairments and consequent cytokinesis defects are possible mechanisms of taxane drugs. *Anticancer Res.* 25, 1919–1925.

Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W. T., Wazer, D. E., Band, V., and Gao, Q. (2005). Centrobin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *J. Cell Biol.* 171, 437–445.

Capítulo 4: Considerações Finais

O presente estudo teve como objetivo avaliar alterações de ploidia causadas por dois diferentes agentes, a crisotila e a vincristina, e investigar como essas alterações são provocadas. Embora os dois agentes estudados sejam de naturezas completamente distintas – uma fibra de amianto com possível ação carcinogênica e um quimioterápico que atua nos microtúbulos – ambos já foram reportados por induzir erros durante a mitose relacionados à formação de células aneuploides (MacCorkle *et al.*, 2006; Nakagawa, 2006; Cortez & Machado-Santelli, 2008; Cortez *et al.*, 2011). No presente estudo os mecanismos relacionados à formação destas células foram elucidados.

Alterações celulares específicas após cada tratamento foram descritas, como a amplificação centrossômica em células tratadas com vincristina, e a relação entre vesículas autofágicas e fibras de crisotila internalizadas. Porém, uma característica em comum aos dois tratamentos foi a formação de células tetraploides. A tetraploidia foi gerada por mecanismos distintos nos dois tratamentos: regressão da citocinese no caso da crisotila e saída da divisão celular no caso da vincristina.

O comportamento das células tetraploides também foi diferente após os tratamentos. Células tumorais HK2 com o dobro do conteúdo cromossômico foram capazes de proliferar, gerando mitoses multipolares tanto após a exposição a fibras quanto após o tratamento com vincristina. Os resultados mostraram um comportamento diferente das células normais RPE: foram observadas células tetraploides em proliferação somente após o tratamento com crisotila.

A existência de um ponto de checagem tetraploide já foi alvo de discussão. Resultados contraditórios foram gerados em estudos sobre a capacidade de proliferação de células tetraploides formadas após o uso de drogas que inibem a divisão celular. Quando reunidos, os resultados sugerem que as células não são capazes de verificar a quantidade de cromossomos, mas que a presença do cariótipo aumentado pode favorecer a retenção da célula em G1 dependendo do seu contexto genético e da presença de outras alterações celulares. A retenção de células tetraploides em G1, por exemplo, depende de p53, de maneira que a redução dos seus níveis pode levar à proliferação de células tetraploides mesmo após tratamentos que costumam levar à senescência em células com níveis normais desta proteína (Andreassen *et al.*, 2001; Margolis *et al.*, 2003; Uetake & Sluder, 2004; Wong & Stearns, 2005).

Dentro desse contexto, células HK2, por serem de origem tumoral e já na condição controle serem aneuploides, não devem possuir os mecanismos de checagem presentes numa célula normal. Assim, essas células devem ser capazes de proliferar mesmo com alterações cromossômicas. Já células RPE devem possuir mecanismos de checagem funcionais, assim

como níveis normais de p53, que impedem a proliferação de células com alterações no seu DNA. Porém, a tetraploidia causada pelo tratamento com crisotila não foi detectada pelos mecanismos de checagem das células RPE, já que as células tetraploides entraram novamente em fase M, gerando inclusive mais que duas células-filhas. Essas células-filhas devem carregar conteúdo cromossômico aneuploide e não foram observadas em proliferação, sugerindo que conteúdo cromossômico aneuploide (característica abordada aqui como distinta da tetraploidia) inibe a proliferação das células RPE.

Células poliploides em cultura apresentam desvantagens de crescimento e proliferação quando comparadas às células diploides, e geralmente são eliminadas das culturas. Essas células também entram em apoptose mais frequentemente, o que contribui para a sua eliminação (Castedo *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2007; Sheltzer & Amon, 2011; Holland & Cleveland, 2012). Nos tumores, entretanto, a presença de células aneuploides é muito comum. Visto que altos níveis de aneuploidia podem ser encontrados em tumores agressivos, torna-se possível que no ambiente tumoral a aneuploidia possa conferir vantagens proliferativas ou de resistência às pressões do ambiente (Storchova & Pellman, 2004; Weaver & Cleveland, 2008). Como o presente estudo foi realizado com células em cultura, torna-se difícil determinar se as células RPE aneuploides são incapazes de permanecer no ciclo celular e tornam-se senescentes ou são encaminhas à morte celular, ou ainda se a sua proliferação fica mais lenta que as células diploides, diminuindo a frequência das células aneuploides na cultura e dificultando sua detecção.

A formação de células tetraploides ocorre concomitante à formação de células com amplificação centrossômica, que pode ser um fator limitante à própria proliferação das células tetraploides. Anormalidades dos centrossomos, como a redução dos níveis de Pericentrina e/ou de outros componentes, levam à parada das células em G1. Essa retenção ocorre via ativação de p38, que desencadeia a fosforilação de p53 e seu acúmulo nos centrossomos e núcleo, bloqueando assim a entrada em fase S. A redução de p38 inibe a retenção em G1. Esses resultados levaram alguns autores a sugerir a existência de um ponto de checagem de dano aos centrossomos (Srsen *et al.*, 2006; Ganem & Pellman, 2007; Mikule *et al.*, 2007). A inibição da proliferação de células RPE tetraploides após o tratamento com vincristina pode ser uma resposta às alterações no número e estrutura dos centrossomos. O tratamento com essa droga do fuso ocasionou a fragmentação da matriz pericentriolar em células retidas em fase M e a reduplicação dos centríolos detectada em células interfásicas. O tratamento com crisotila também levou ao aumento do número de centrossomos, mas os dados indicam que este aumento foi consequência apenas da regressão da citocinese, mantendo assim o balanço

entre o número de centrossomos e cromossomos. Além disso, não foram observadas alterações na matriz pericentriolar após o tratamento com crisotila. Dessa forma, células RPE podem ser incapazes de detectar a tetraploidia gerada pela regressão da citocinese após tratamento com as fibras, mas podem ser capazes de detectar alterações centrossômicas desencadeadas pelo tratamento com vincristina.

Quando analisadas células HK2, capazes de proliferar independentemente das alterações no número de cromossomos e de centrossomos, fica evidente que as alterações causadas pelo tratamento com vincristina são mais drásticas que as alterações causadas pela crisotila. Quase metade das células em cultura apresentaram alterações no número de cromossomos após o uso da vincristina, porcentagem cerca de cinco vezes maior do que o observado no tratamento com crisotila. As alterações nos centrossomos também foram mais evidentes após o tratamento com vincristina, assim como os destinos das divisões multipolares foram mais diversificados, provavelmente contribuindo para a formação de células com altos graus de aneuploidia. O uso da vincristina, embora ocasione a morte de quase metade da população de células em cultura, contribuiu de forma mais evidente para a formação de células aneuploides na linhagem tumoral. Esses resultados, quando imaginados numa situação real do tratamento de tumores com vincristina, levam à hipótese de que as células que sobrevivem ao tratamento com o quimioterápico podem apresentar vantagens e desvantagens adaptativas dependendo do novo contexto genético criado em cada célula – já que a aneuploidia pode favorecer a supressão ou progressão tumoral. Porém, as células viáveis formadas certamente conferirão uma vantagem ao tumor, pois o aumento da heterogeneidade tumoral favorece sua sobrevivência quando as pressões do ambiente são alteradas.

O tratamento com crisotila em células HK2 levou a alterações que muito se relacionam com a hipótese de que o estado tetraploide é intermediário entre o diploide e o aneuploide, e tem papel importante na formação dos tumores (Ganem *et al.*, 2007; Storchova & Kuffer, 2008). Foi observada primeiramente a formação de população com o dobro do conteúdo de cromossomos, e depois a formação de células com número de cromossomos mais variados, chamados aqui de aneuploides. A linhagem HK2, como a maioria das linhagens tumorais, já apresenta cariótipo aneuploide, mas mesmo assim o padrão esperado para a formação de tetraploidia e consequente aneuploidia foi evidente.

Diversos estudos tentam elucidar o papel da aneuploidia no desenvolvimento dos tumores. Porém, os modelos experimentais utilizados geralmente envolvem mutações em genes do ponto de checagem do fuso mitótico, e estes genes frequentemente possuem

diversas funções celulares. Assim a indução de aneuploidia nestes modelos é acompanhada por outras anomalias, como alterações no ciclo celular, que interferem na análise da contribuição da aneuploidia para o desenvolvimento dos tumores. Além disso, muitas das proteínas envolvidas no ponto de checagem mitótico ainda não possuem todas as suas funções conhecidas, dificultando ainda mais a distinção entre as alterações causadas pela aneuploidia das que são consequências diretas das mutações (Kops *et al.*, 2005; Weaver & Cleveland, 2008; Li *et al.*, 2009). Diferentemente desses modelos, o uso das fibras de crisotila promove uma interferência física durante a mitose que, possivelmente, preserva as funções das proteínas envolvidas no ciclo celular, e assim levam à formação de células aneuploides sem a necessidade da utilização adicional de mutações. Portanto, o uso das fibras pode gerar evidências que dificilmente seriam encontradas nos modelos com células mutantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreassen, P. R., Lohez, O. D., Lacroix, F. B., and Margolis, R. L. (2001). Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1. *Mol. Biol. Cell* 12, 1315–1328.

Castedo, M. *et al.* (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J.* 25, 2584–2595.

Cortez, B. a, and Machado-Santelli, G. M. (2008). Chrysotile effects on human lung cell carcinoma in culture: 3-D reconstruction and DNA quantification by image analysis. *BMC Cancer* 8, 181.

Cortez, B. D. A., Quassollo, G., Caceres, A., and Machado-Santelli, G. M. (2011). The fate of chrysotile-induced multipolar mitosis and aneuploid population in cultured lung cancer cells. *PLoS One* 6, e18600.

Ganem, N. J., and Pellman, D. (2007). Limiting the proliferation of polyploid cells. *Cell* 131, 437–440.

Ganem, N. J., Storchova, Z., and Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 157–162.

Holland, A. J., and Cleveland, D. W. (2012). Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer. *EMBO Rep.* 13, 501–514.

Kops, G. J. P. L., Weaver, B. a a, and Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer* 5, 773–785.

- Li, M., Fang, X., Wei, Z., York, J. P., and Zhang, P. (2009). Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. *J. Cell Biol.* 185, 983–994.
- MacCorkle, R. a, Slattery, S. D., Nash, D. R., and Brinkley, B. R. (2006). Intracellular protein binding to asbestos induces aneuploidy in human lung fibroblasts. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 646–657.
- Margolis, R. L., Lohez, O. D., and Andreassen, P. R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J. Cell. Biochem.* 88, 673–683.
- Mikule, K., Delaval, B., Kaldis, P., Jurczyk, A., Hergert, P., and Doxsey, S. (2007). Loss of centrosome integrity induces p38—p53—p21-dependent G1—S arrest. *Nat. Cell Biol.* 9, 160–170.
- Nakagawa, E. (2006). Estudo do significado biológico da multinucleação induzida por vincristina em células em cultura. In: Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo., 165.
- Sheltzer, J. M., and Amon, A. (2011). The aneuploidy paradox: costs and benefits of an incorrect karyotype. *Trends Genet.* 27, 446–453.
- Srsen, V., Gnadt, N., Dammermann, A., and Merdes, A. (2006). Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *J. Cell Biol.* 174, 625–630.
- Storchova, Z., and Kuffer, C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *J. Cell Sci.* 121, 3859–3866.
- Storchova, Z., and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 45–54.
- Torres, E. M., Sokolsky, T., Tucker, C. M., Chan, L. Y., Boselli, M., Dunham, M. J., and Amon, A. (2007). Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 317, 916–924.
- Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure: mammalian somatic cells do not possess a “tetraploidy checkpoint”. *J. Cell Biol.* 165, 609–615.
- Weaver, B. a, and Cleveland, D. W. (2008). The aneuploidy paradox in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* 14, 431–433.
- Wong, C., and Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biol.* 6, 6.

Resumo

A aneuploidia é uma característica dos tumores sólidos. Ela pode ser resultado de diferentes erros durante a mitose, como a amplificação centrossômica, mitoses multipolares, e anormalidades durante a citocinese. Hoje se sabe que a aneuploidia pode estar relacionada à supressão ou progressão tumoral dependendo do grau da aneuploidia e do contexto genético das células, e assim esforços vem sendo feitos a fim de elucidar quais erros durante a mitose estão relacionados à formação de células aneuploides viáveis e inviáveis. Estudos prévios do nosso grupo mostraram que tratamentos de células em cultura com fibras de crisotila e com vincristina levam a formação de células aneuploides. Agora direcionados nossos esforços para elucidar os mecanismos envolvidos na formação dessas células, investigando alterações nos centrossomos, número de cromossomos, e origens e destinos de mitoses multipolares após o tratamento com crisotila e com vincristina. As fibras de crisotila, em linhagens de células tumorais e normais, levaram a padrões de localização alterados de proteínas relacionadas à abscisão durante a citocinese, e ocorreu a regressão deste processo e consequente formação de apenas uma célula-filha com o dobro do conteúdo de cromossomos e de centrossomos. Nas duas linhagens estudadas essas células tetraploides progrediram no ciclo celular, gerando mitoses multipolares e consequente formação de células aneuploides. O tratamento com vincristina levou a respostas similares e também distintas em células normais e tumorais. Durante a retenção em metáfase ocorreu a fragmentação da matriz pericentriolar, e as células foram encaminhadas à morte celular ou à saída da mitose sem a ocorrência de divisão celular. Entretanto, células de origem normal tetraploides não progrediram no ciclo celular e não formaram mitoses multipolares, enquanto na linhagem tumoral as células apresentaram aumento da expressão de Aurora A e células com conteúdo cromossômico aumentado e aneuploide em mitoses multipolares. As mitoses multipolares formaram uma, duas ou três células e apresentaram diversas anormalidades no processo de divisão. As alterações observadas no número e composição dos centrossomos após o tratamento com as duas linhagens indicaram que processos de amplificação centrossômica ocorreram após o tratamento. Os dados foram compatíveis com a reduplicação dos centrossomos e com a formação de centríolos a partir do aumento da matriz pericentriolar. Os dados reunidos mostram que apenas células tumorais foram capazes de proliferar mesmo após diferentes erros mitóticos, enquanto células normais puderam apenas superar os erros ocasionados pelas fibras de crisotila.

Abstract

Aneuploidy is a feature of solid tumors. Aneuploid cells result from errors during mitosis, such as centrosome amplification, multipolar mitosis and cytokinesis abnormalities. The capability of aneuploidy to promote and to suppress tumorigenesis has driven the efforts to characterize mitotic errors that form viable and not viable aneuploid cells. We have previously shown that chrysotile, an asbestos fiber, and vincristine, a chemotherapeutic agent, are able to induce aneuploidy. Now we directed our focus to discover possible mechanisms involved in aneuploid cell formation. Herein we evaluated centrosome morphology, chromosome number, and origins and fates of multipolar mitosis after chrysotile and vincristine treatment. Chrysotile fibers, in normal and cancer cells, led to mislocalization of proteins involved in abscission, which resulted in cytokinesis regression and tetraploid cells. These cells were able to enter cell cycle, giving rise to multipolar mitosis and aneuploid cells. Vincristine treatment led to specific and common responses in normal and cancer cells. During metaphase arrest, pericentrosomal matrix was fragmented, and the cells could be conducted to mitotic slippage in both lineages. However, normal tetraploid cells could not progress through cell cycle and neither to form multipolar mitosis, while cancer tetraploid cells showed Aurora A overexpression, structural and numerical centrosome abnormalities, multipolar mitosis and high levels of aneuploidy. The results showed that cancer cells could proliferate even after several mitotic errors, while normal cells could only overcome errors induced by chrysotile treatment.