Beatriz Brandão Vaz de Lima

**ORGANIZAÇÃO DO FUSO MITÓTICO EM CÉLULAS
NORMAIS E TUMORAIS: ASSOCIAÇÃO DE DROGAS
QUE ATUAM SOBRE OS MICROTÚBULOS E A
AGRESSIVIDADE TUMORAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2008

Beatriz Brandão Vaz de Lima

ORGANIZAÇÃO DO FUSO MITÓTICO EM CÉLULAS
NORMAIS E TUMORAIS: ASSOCIAÇÃO DE DROGAS
QUE ATUAM SOBRE OS MICROTÚBULOS E A
AGRESSIVIDADE TUMORAL

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular
e Tecidual

Orientador: Profa. Dra. Gláucia Maria
Machado Santelli

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vaz de Lima, Beatriz Brandão.

Organização do fuso mitótico em células normais e tumorais: associação entre a ação de drogas que atuam sobre os microtúbulos e a agressividade tumoral / Beatriz Brandão Vaz de Lima. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Gláucia Maria Machado Santelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da Célula Tumoral.

Versão do título para o inglês: Mitotic spindle organization in normal and tumoral cells: interaction of drug effects on microtubules and tumoral aggressiveness.

Descritores: 1. Citoesqueleto 2. Microtúbulos 3. Aneuploidia 4. Citometria de fluxo 5. Neoplasias mamárias 6. Cultura de células animais I. Santelli, Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB169/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Beatriz Brandão Vaz de Lima.

Título da Dissertação: Organização do fuso mitótico em células normais e
 tumorais: associação entre a ação de drogas que atuam
 sobre os microtúbulos e a agressividade tumoral.

Orientador(a): Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Dedico este trabalho para a minha querida
avó Nelsy Brandão. E para meus
amados avôs que já se foram, mas
continuam em meu coração: Adelino
Brandão, Maria e João Vaz de Lima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Gláucia Santelli pela orientação durante esses anos de trabalho,

A Roberto Cabado pelo trabalho gráfico,

Ao Prof. Robert Ivan pelas leituras e orientações no citômetro de fluxo,

Ao Bruno dos Santos, William Custódio e Profa. Dra. Júlia Maria Pavan pelo trabalho estatístico realizado e pelas orientações,

A Celiana pela assistência e atenção dispensada em momentos conturbados,

Aos funcionários da biblioteca do ICB I por serem tão eficientes e compreensivos em momentos de correria,

Aos colegas de laboratório: Amanda, André, Beatriz Cortez, Evandro, Jônatas, Marcel, Paula, Stefânia, Marisa Rangel, Marisa Paula, Marisa Ionta, Raquel.

À técnica Dona Nancy, pelo trabalho importante de manter o laboratório em ordem,

E aos meus pais, que tanto me ensinaram.

RESUMO

VAZ-DE-LIMA, B. B.; **Organização do fuso mitótico em células normais e tumorais: associação entre a ação de drogas que atuam sobre os microtúbulos e a agressividade tumoral.** 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Muitas evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo com várias etapas. A progressão de um tumor em direção a malignidade ocorre de maneiras muito distintas entre os diferentes tipos de câncer. Entender os processos celulares que levam a tumorigênese é importante para se delinear tratamentos mais adequados contra os diversos tipos de câncer. Drogas antimitóticas (ou venenos de fuso) são utilizadas no tratamento de alguns cânceres, e entre eles está o câncer de mama. A ação dessas drogas reside sobre a mitose, e têm como alvo os fusos mitóticos, estruturas essenciais que dirigem o ciclo celular na divisão das células. Recentemente, pesquisadores têm delineado possíveis respostas da célula aos venenos de fuso, e essas respostas são dependentes da concentração da droga. Baixas concentrações de venenos de fuso provocam o aparecimento de populações celulares aneuplóides, que ocorrem quando a célula sai do bloqueio mitótico. O presente trabalho utilizou as drogas vincristina e paclitaxel sobre linhagens celulares de mama humana (células normais e tumorais) para pesquisar se as drogas são capazes de induzir células aneuplóides. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que baixa concentração de vincristina e paclitaxel pode induzir o aparecimento de população aneuplóide através de mitoses aberrantes. Os venenos de fuso induzem a formação de mitoses contendo múltiplos fusos mitóticos, e essas mitoses não ficam bloqueadas, dando origem a células aneuplóides. O papel da aneuploidia na tumorigênese não foi ainda estabelecido, mas indiferente da sua importância no desenvolvimento do tumor, encontrar maneiras de inibir sua formação ou de super induzir seu aparecimento podem ter implicações significativas para as terapias contra o câncer.

Palavras-chave: Aneuploidia. Vincristina. Paclitaxel. Microtúbulos. Alterações nucleares.

ABSTRACT

VAZ-DE-LIMA, B. B.; **Spindle pole organizations in normal and tumoral cells: association of...**2008. 95 f. Master thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Several lines of evidence indicate that tumorigenesis in humans is a multistep process and that these steps reflect genetic alterations that drive the progressive transformation of normal cells into highly malignant derivatives. Understanding the cellular processes that lead to tumorigenesis is important to devise more appropriate treatments against various types of cancer. Antimitotic drugs are used in the treatment of some cancers, and among them is breast cancer. The action of these drugs lies on the mitotic spindles, essential structures that drive the cell cycle in the division of cells. Recently, researchers have outlined possible responses to the antimitotic drugs on cells, and these responses are dependent on the concentration of the drug. Low concentrations of drugs can cause the appearance of aneuploid population, which occur when a cell leaves the mitotic block. This study used the drug vincristine and paclitaxel on human breast cancer cell lines (normal and tumoral cells) to find if the drugs are capable of inducing cell aneuploidy. The results of this study indicate that low concentration of vincristine and paclitaxel can induce the emergence of aneuploidy population through aberrant mitosis. The drugs induce the formation of mitosis containing multiple mitotic spindles, resulting in aneuploidy population of cells. The role of aneuploidy in tumorigenesis has not yet been established, but indifferent to this is important find ways to inhibit its formation or the super-induce their appearance. These questions may have significant implications for therapies against cancer.

Key words: Aneuploidy. Vincristine. Paclitaxel. Microtubules. Nuclear alterations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1: Tratamentos 24 horas e 48 horas.	29
Gráfico 1: Curva de crescimento da linhagem MCF 10A.	34
Gráfico 2: Curva de crescimento da linhagem T-47D.....	34
Gráfico 3: Curva de crescimento da linhagem MCF7.....	35
Figura 1: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre as células MCF 10A.....	37
Figura 2: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A), e os tratamentos 48 horas com drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre as células MCF 10A.....	38
Figura 3: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem MCF7.....	40
Figura 4: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A) e os tratamentos 48 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem MCF7. Setas em B indicam células gigantes.....	41
Figura 5: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem T-47D.	43
Figura 6: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A) e os tratamentos 48 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem T-47D.	44
Figura 7: Imagem obtida ao MCVL de células MCF 10A controle 24 horas. As seguintes estruturas estão evidenciadas: A: núcleos; B: filamentos de actina; C: microtúbulos. D: todos os canais em conjunto. A seta em B mostra projeções citoplasmáticas (filopódios) de uma célula.	47
Figura 8: Imagem obtida ao MCVL de células MCF 10A tratamento 24 horas com vincristina. As seguintes estruturas estão evidenciadas: A: núcleos; B: filamentos de actina; C microtúbulos. D: todos os canais em conjunto.....	48
Figura 9: Imagem obtida ao MCVL de uma célula mitótica da linhagem MCF10A controle 24 horas. Em vermelho estão evidenciados os cromossomos, em azul estão evidenciados os microtúbulos e em verde há marcação dos filamentos de actina. A seta branca aponta microtúbulos polares, e a seta rosa microtúbulos astrais.	48

Figura 10: Imagem obtida ao MCVL de células da linhagem MCF10A após tratamento 24 horas com vincristina. A: núcleos, B: filamentos de actina, C: microtúbulos. D: todos os canais juntos. A seta branca em C aponta marcação anormal de tubulina.	50
Figura 11: Imagem obtida ao MCVL de célula mitótica da linhagem MCF10A. Em vermelho os cromossomos estão evidenciados, e em azul os microtúbulos. Nota-se que os três fusos mitóticos estão ligados aos cromossomos, e que esses não se distribuem corretamente na placa metafásica.	50
Figura 12: Imagem obtida ao MCVL mostrando núcleos de células da linhagem MCF10A após tratamento 48 horas com vincristina. As setas mostram células multinucleadas.	52
Figura 13: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 controle 24 horas. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais juntos.	53
Figura 14: Imagem obtida ao MCVL de célula da linhagem MCF7 após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais junto.	54
Figura 15: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 evidenciando em vermelho os cromossomos e em azul os microtúbulos. As setas mostram cromossomos não alinhados à placa metafásica.	55
Figura 16: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais junto.	56
Figura 17: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 após tratamento 48 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais em conjunto.	57
Figura 18: Imagem ao MCVL de células T-47D controle 24 horas. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais em conjunto.	59
Figura 19: Imagem obtida ao MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C núcleo; D todos os canais em conjunto. A seta em A mostra distribuição alterada de microtúbulos pelo citoplasma.	60
Figura 20: Imagens seqüenciais obtidas por MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciados em vermelho os microtúbulos e em verde os filamentos de actina. As setas brancas mostram uma célula contendo duas mitoses.	61

Figura 21: Imagem obtida ao MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais em conjunto.....	62
Figura 22: Projeção ortogonal de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. A imagem mostra mitose contendo múltiplos fusos mitóticos numa determinada secção ótica.	63
Gráfico 4: Quantificação de DNA das células MCF 10A por análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.	66
Gráfico 5: Quantificação de DNA das células MCF7 através de análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.	68
Gráfico 6: Quantificação de DNA das células T-47D através de análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.	70
Gráfico 7: Distribuição de DNA das células MCF 10A controle 24 horas.	71
Gráfico 8: Distribuição de DNA das células MCF 10A do tratamento 24 horas com vincristina.....	72
Gráfico 9: Distribuição de DNA das células MCF 10A do tratamento 24 horas com paclitaxel.....	72
Gráfico10: Distribuição de DNA das células MCF 10A controle 48 horas.	73
Gráfico 11: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 48 horas com vincristina.	73
Gráfico12: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 48 horas com paclitaxel.	74
Gráfico 13: Distribuição de DNA das células MCF7 controle 24 horas	75
Gráfico 14: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 24 horas com vincristina.	75
Gráfico 15: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 24 horas com paclitaxel.	76
Gráfico 16: Distribuição de DNA de células MCF7 controle 48 horas.	76
Gráfico 17: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 48 horas com vincristina.	77

Gráfico 18: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 48 horas com paclitaxel.	77
Gráfico 19: Distribuição de DNA das células T-47D controle 24 horas.	79
Gráfico 20: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 24 horas com vincristina.	79
Gráfico 21: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 24 horas com paclitaxel.	79
Gráfico 22: Distribuição de DNA das células T-47D controle 48 horas.	80
Gráfico 23: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 48 horas com vincristina.	81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1: Tratamentos 24 horas e 48 horas.	29
Gráfico 1: Curva de crescimento da linhagem MCF 10A.	34
Gráfico 2: Curva de crescimento da linhagem T-47D.....	34
Gráfico 3: Curva de crescimento da linhagem MCF7.....	35
Figura 1: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre as células MCF 10A.....	37
Figura 2: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A), e os tratamentos 48 horas com drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre as células MCF 10A.....	38
Figura 3: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem MCF7.....	40
Figura 4: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A) e os tratamentos 48 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem MCF7. Setas em B indicam células gigantes.....	41
Figura 5: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem T-47D.	43
Figura 6: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A) e os tratamentos 48 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem T-47D.	44
Figura 7: Imagem obtida ao MCVL de células MCF 10A controle 24 horas. As seguintes estruturas estão evidenciadas: A: núcleos; B: filamentos de actina; C: microtúbulos. D: todos os canais em conjunto. A seta em B mostra projeções citoplasmáticas (filopódios) de uma célula.	47
Figura 8: Imagem obtida ao MCVL de células MCF 10A tratamento 24 horas com vincristina. As seguintes estruturas estão evidenciadas: A: núcleos; B: filamentos de actina; C microtúbulos. D: todos os canais em conjunto.....	48
Figura 9: Imagem obtida ao MCVL de uma célula mitótica da linhagem MCF10A controle 24 horas. Em vermelho estão evidenciados os cromossomos, em azul estão evidenciados os microtúbulos e em verde há marcação dos filamentos de actina. A seta branca aponta microtúbulos polares, e a seta rosa microtúbulos astrais.	48

Figura 10: Imagem obtida ao MCVL de células da linhagem MCF10A após tratamento 24 horas com vincristina. A: núcleos, B: filamentos de actina, C: microtúbulos. D: todos os canais juntos. A seta branca em C aponta marcação anormal de tubulina.	50
Figura 11: Imagem obtida ao MCVL de célula mitótica da linhagem MCF10A. Em vermelho os cromossomos estão evidenciados, e em azul os microtúbulos. Nota-se que os três fusos mitóticos estão ligados aos cromossomos, e que esses não se distribuem corretamente na placa metafásica.	50
Figura 12: Imagem obtida ao MCVL mostrando núcleos de células da linhagem MCF10A após tratamento 48 horas com vincristina. As setas mostram células multinucleadas.	52
Figura 13: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 controle 24 horas. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais juntos.	53
Figura 14: Imagem obtida ao MCVL de célula da linhagem MCF7 após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais junto.	54
Figura 15: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 evidenciando em vermelho os cromossomos e em azul os microtúbulos. As setas mostram cromossomos não alinhados à placa metafásica.	55
Figura 16: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais junto.	56
Figura 17: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 após tratamento 48 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais em conjunto.	57
Figura 18: Imagem ao MCVL de células T-47D controle 24 horas. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais em conjunto.	59
Figura 19: Imagem obtida ao MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C núcleo; D todos os canais em conjunto. A seta em A mostra distribuição alterada de microtúbulos pelo citoplasma.	60
Figura 20: Imagens seqüenciais obtidas por MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciados em vermelho os microtúbulos e em verde os filamentos de actina. As setas brancas mostram uma célula contendo duas mitoses.	61

Figura 21: Imagem obtida ao MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais em conjunto.....	62
Figura 22: Projeção ortogonal de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. A imagem mostra mitose contendo múltiplos fusos mitóticos numa determinada secção ótica.	63
Gráfico 4: Quantificação de DNA das células MCF 10A por análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.	66
Gráfico 5: Quantificação de DNA das células MCF7 através de análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.	68
Gráfico 6: Quantificação de DNA das células T-47D através de análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.	70
Gráfico 7: Distribuição de DNA das células MCF 10A controle 24 horas.	71
Gráfico 8: Distribuição de DNA das células MCF 10A do tratamento 24 horas com vincristina.....	72
Gráfico 9: Distribuição de DNA das células MCF 10A do tratamento 24 horas com paclitaxel.....	72
Gráfico10: Distribuição de DNA das células MCF 10A controle 48 horas.	73
Gráfico 11: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 48 horas com vincristina.	73
Gráfico12: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 48 horas com paclitaxel.	74
Gráfico 13: Distribuição de DNA das células MCF7 controle 24 horas	75
Gráfico 14: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 24 horas com vincristina.	75
Gráfico 15: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 24 horas com paclitaxel.	76
Gráfico 16: Distribuição de DNA de células MCF7 controle 48 horas.	76
Gráfico 17: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 48 horas com vincristina.	77

Gráfico 18: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 48 horas com paclitaxel.	77
Gráfico 19: Distribuição de DNA das células T-47D controle 24 horas.	79
Gráfico 20: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 24 horas com vincristina.	79
Gráfico 21: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 24 horas com paclitaxel.	79
Gráfico 22: Distribuição de DNA das células T-47D controle 48 horas.	80
Gráfico 23: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 48 horas com vincristina.	81

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28

3.1 Cultura celular e condições de cultivo	28
3.2 Curva de crescimento	28
3.3 Esquema de tratamentos	29
3.4 Imunofluorescência	29
3.5 Quantificação do DNA nuclear	31
3.5.1 Análise de imagem (CIRES)	31
3.5.2 Citometria de Fluxo	30
3.5.2.1 Marcação do núcleo por iodeto de propídeo	30
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Curva de crescimento	33
4.2 Análise da morfologia celular	35
4.3 Análise do citoesqueleto	43
4.4 Quantificação do DNA nuclear	70
4.5 Citometria de fluxo	70
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

A correta segregação dos cromossomos para as células filhas durante a mitose desempenha um papel essencial na manutenção da normalidade celular. A conservação do estado diplóide pelas células garante a homeostase

do organismo, prevenindo a formação de células com ploidia anormal. A formação de células com desvio de ploidia pode resultar em alterações genéticas capazes de dirigir a transformação maligna que ocorre na tumorigênese. A constatação de que a quantidade de DNA nas células tumorais é diferente das células normais indica que a carcinogênese envolve erros na replicação, reparo e segregação do genoma (LOEB, 2001).

Muitas evidências indicam que a tumorigênese em humanos é um processo com várias etapas. A progressão de um tumor em direção a malignidade ocorre de maneiras muito distintas entre os diferentes tipos de câncer. Mutações em certos oncogenes e genes supressores de tumor podem ocorrer cedo em alguns tumores, ou podem aparecer num estado avançado em outros. Como consequência, a habilidade de adquirir capacidades biológicas tais como resistência à apoptose, angiogênese e potencial replicativo ilimitado aparecem em tempos diferentes durante a progressão para o câncer. Independentemente de como essas etapas são alcançadas, o resultado final que é obtido – defeito na regulação que governa a proliferação normal e homeostase – será comum para todos os tipos de tumores (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000).

A perda de função dos genes que regulam a homeostase permite a instabilidade genética e a variabilidade dentro uma população de células. Segundo um influente artigo publicado na década de 1976 por Peter Nowell, a progressão do tumor está representada pela capacidade das células de adquirir instabilidade genética, e pela consequente seleção de subpopulações celulares com capacidades proliferativas maiores. Características biológicas da progressão do tumor refletem os estágios da instabilidade genética. Segundo Nowell, tumores com pequenas variações no número de cromossomos são considerados tumores no início da progressão tumoral; já tumores sólidos, tipicamente aneuplóides, são considerados em estágios tardios da progressão das células em direção ao câncer (NOWELL, 1976). Essa hipótese de Nowell sobre o papel da aneuploidia na fase tardia da tumorigênese causa divergência entre os pesquisadores. Não se sabe ao certo qual é a ação da aneuploidia na formação do tumor; ou seja, se aneuploidia é causa ou consequência da tumorigênese. Evidências indicam que ambos os casos podem ocorrer.

A teoria da mutação genética para explicar a tumorigênese não é compartilhada por todos os pesquisadores da área. Duesberg *et al.* (2005) propõem que o problema do câncer não está resolvido porque o debate quanto a tumorigênese tem sido monopolizado por teorias convencionais em favor da mutação genética. Esses autores, então, postulam a teoria cromossômica do câncer, na qual a aneuploidia se torna a causa da tumorigênese. A iniciação da tumorigênese se dá através da indução de aneuploidia por não disjunção ou quebra e rearranjo de cromossomos, induzindo uma condição de célula pré neoplásica. O desequilíbrio causado pela aneuploidia em milhares de genes pode corromper proteínas que segregam, sintetizam e reparam os cromossomos. Como células pré neoplásicas não crescem mais rapidamente do que células normais, sua evolução é lenta, o que explicaria o desenvolvimento lento de um tumor. Muitas células aneuplóides morrem devido a combinações não viáveis de cromossomos. Mas se uma célula sobrevive, passa a acumular muitas variações no cariótipo tornando-se mais aneuplóide e, conseqüentemente, mais adaptável. Assim células neoplásicas se desenvolvem dentro do tumor formando fenótipos mais heterogêneos e malignos, com capacidades proliferativas, de formar metástases e resistência a drogas maiores. Dessa maneira a aneuploidia é fonte de variações cromossômicas que podem originar cariótipos neoplásicos (DUESBERG *et al.*, 2005).

A aneuploidia está presente em muitos cânceres humanos, e se caracteriza pela perda ou ganho de cromossomos pelas células. Ou seja, células cujo número de cromossomos não é múltiplo do número haplóide da espécie. Por ser uma característica tão comum em tumores, muitos pesquisadores estão sugerindo que a aneuploidia pode ser essencial para a tumorigênese. Alternativamente, pode ser simplesmente uma conseqüência do crescimento desregulado das células tumorais. A questão é saber qual a relevância da aneuploidia na tumorigênese, e quais são as bases moleculares que governam tal fenômeno (RAJAGOPALAN e LENGAUER, 2004).

A aneuploidia é um processo conhecido desde o início do século XX, quando Theodor Boveri, em 1902, foi o primeiro cientista a correlacionar aneuploidia com formação de tumores. Mitoses contendo mais de dois pólos de fuso mitóticos davam origem a células contendo número anormal de

cromossomos, e Boveri especulou que algumas dessas células poderiam se proliferar mais do que as células diplóides (apud WEAVER e CLEVELAND, 2005; apud TORRES *et al.*, 2008). Atualmente a comunidade científica sabe que a aneuploidia interfere no crescimento e desenvolvimento dos organismos, além de ser característica presente na maioria dos tumores sólidos (TORRES *et al.*, 2008). O desafio é entender porque tumores sólidos são aneuplóides, uma vez que aneuploidia é um fenômeno tão deletério. Uma vez que cada cromossomo contém milhares de genes, é impressionante que perda ou ganho de DNA seja compatível com a viabilidade celular. A hipótese de Boveri ainda não foi comprovada, mas admite-se uma relação entre mitose, aneuploidia e câncer para tentar elucidar porque a aneuploidia é um fenômeno tão controverso.

Muitos tumores sólidos são aneuplóides e possuem instabilidade cromossômica (CIN, “chromosomal instability”) o que permite a perda ou ganho freqüente de cromossomos durante a divisão celular (LENGAUER *et al.*, 1997). As causas desse desequilíbrio não são conhecidas, mas provavelmente será encontrada nos processos que controlam a segregação dos cromossomos durante a mitose. Um desses processos é conhecido como “checkpoint” mitótico, uma complexa cascata de sinalização essencial para a sobrevivência das células humanas (KOPS *et al.*, 2004). Evidências indicam que defeitos no “checkpoint” mitótico contribuem para a tumorigênese. Como a maquinaria da segregação dos cromossomos é um importante alvo para a quimioterapia, entender melhor seu funcionamento (como a mitose começa, sua progressão e saída) é essencial não só para descobrir as causas da instabilidade cromossômica, mas também para desenvolver drogas mais efetivas contra as células tumorais (KOPS *et al.*, 2005).

A mitose é governada por um mecanismo de controle do ciclo celular denominado “checkpoint” mitótico. Sua função é garantir que os cromossomos sejam segregados corretamente para as células filhas, indo uma cromátide irmã de cada cromossomo para uma célula. A separação das cromátides é possível através da organização dos cromossomos na placa metafásica. Os cinetócoros, estruturas ricas em proteínas que se formam a cada mitose no DNA centromérico, se ligam aos filamentos de tubulina dos fusos mitóticos a fim de sofrerem a segregação para pólos opostos. Cinetócoros que não estão

conectados aos fusos mitóticos geram um sinal de espera capaz de atrasar a progressão da metáfase para a anáfase, impedindo o processo irreversível da separação das cromátides irmãs. Isso assegura a segregação exata prevenindo a aneuploidia (MUSACCHIO e SALMON, 2007; ALBERTS *et al.*, 1997).

O “checkpoint” mitótico foi inicialmente descoberto em experimentos que utilizavam drogas antimitóticas que despolimerizavam os microtúbulos (HOYT *et al.*, 1991; LI e MURRAY, 1991). Seu papel principal está em impedir a passagem da célula para a anáfase mesmo quando poucos cromossomos não se ligaram ao fuso mitótico. Cinetócoros não pareados ativam proteínas como Bub1, BubR1, Mad1 e Mad2 que bloqueiam a ativação do complexo Cdc20-APC (complexo promotor da anáfase), necessário para a continuação do ciclo celular (CIMINI e DEGRASSI, 2005). O complexo Cdc20-APC é uma E3 ubiquitina - ligase responsável por catalizar a ubiquinização de uma variedade de alvos celulares, incluindo a securina e a ciclina B. A securina, após degradação pelo proteassomo, libera a separase, proteína responsável pela separação das cromátides irmãs através da quebra das coesinas. E a degradação da ciclina B inativa Cdk1 (quinase dependente de ciclina 1) permitindo a saída da mitose. O resultado é a progressão da metáfase para a anáfase dando continuidade pelo ciclo celular (KOPS *et al.*, 2005).

Muitas evidências obtidas até o presente momento fazem um paralelo entre tumorigênese e “checkpoint” mitótico enfraquecido. Células normais têm um “checkpoint” mitótico onde cada cinetócoro não ligado ao fuso mitótico produz um sinal inibitório forte suficiente para impedir a passagem para a anáfase. Mas esse sinal não é suficientemente forte quando os componentes do “checkpoint” estão mutados ou com concentração reduzida de proteínas, caracterizando um “checkpoint” enfraquecido. Por exemplo, em células de camundongo com deficiência em CENPE os cinetócoros não conseguem recrutar níveis normais de Mad1, Mad2 e BubR1, resultando em alta frequência de cromossomos não segregados (WEAVER *et al.*, 2003). Camundongos com “checkpoint” mitótico enfraquecido devido à perda de uma cópia do gene Mad2 desenvolvem tumores espontâneos com frequência aumentada em 27% (MICHEL *et al.*, 2001). Camundongos com perda de uma cópia dos genes Bub3 (BABU *et al.*, 2003) ou BubR1 (DAI *et al.*, 2004) exibem taxas elevadas

de tumorigênese quando tratados com carcinogênicos (aumento de 70% e 11% respectivamente).

O que se tem encontrado como um aspecto freqüente nos tumores humanos e linhagens celulares é a inabilidade das células de sustentar o “checkpoint” mitótico após uma ruptura dos fusos mitóticos por tratamentos a longo prazo com drogas que atuam sobre os microtúbulos. A hipótese corrente sustenta que o enfraquecimento do “checkpoint” não é suficiente para bloquear o ciclo celular em metáfase, permitindo que poucos cromossomos sejam incorretamente segregados corretamente resultando em aneuploidia e instabilidade genética (WEAVER e CLEVELAND, 2005).

A mitose tem servido durante muito tempo como um excelente alvo contra células tumorais. Drogas que atuam sobre a mitose são comumente utilizadas no tratamento de vários tipos de cânceres, como câncer de mama, ovário, células não pequenas de pulmão, linfomas, leucemias e próstata, entre outros (MOLLINEDO e GAJATE, 2003).

A ativação crônica das proteínas de regulação da mitose é uma estratégia recentemente utilizada na quimioterapia contra o câncer. Diferentes tipos de drogas antimitóticas provocam diferentes tipos de estresse nos cinetócoros, considerado a origem da geração da cascata de sinalização denominada “checkpoint” mitótico (HIROSHI *et al.*, 2006). Algumas proteínas conhecidas têm sido usadas como alvos de drogas e incluem a família das Auroras quinase, a cinesina mitótica KSP (“kinesin spindle protein”, ou Eg5) e a proteína centromérica CENPE. As Auroras têm recebido significativa atenção por parte da comunidade científica e farmacêutica por atuarem na fase G2/M do ciclo celular, onde agem na maturação e separação do centrossomo durante a prófase (Aurora A), bem como na condensação cromossômica, alinhamento dos cromossomos na placa metafásica e citocinese (Aurora B) (KEEN e TAYLOR, 1996). A KSP, que funciona exclusivamente na mitose, dirige a separação dos centrossomos e estabiliza o fuso bipolar. Sua inibição em células em proliferação causa bloqueio mitótico e a orientação monopolar do fuso. Os centrossomos não separam e os microtúbulos se organizam a partir de um único ponto, levando a morte celular embora por mecanismos ainda não muito bem elucidados (TAO *et al.*, 2005). CENPE é a proteína responsável por unir os microtúbulos aos cinetócoros, permitindo a progressão para a

anáfase. Células cuja proteína CENPE foi inibida ou deletada perdem a conformação bipolar do fuso e do alinhamento dos cromossomos (ABRIEU *et al.*, 2000; JACKSON *et al.*, 2007).

Drogas antimitóticas (ou venenos de fuso) atuam sobre a mitose e têm como alvo os microtúbulos, estruturas essenciais que dirigem o ciclo celular na divisão das células. Os microtúbulos são estruturas compostas por filamentos de tubulina, heterodímero composto de duas subunidades de polipeptídeos: tubulina alfa e tubulina beta. Muitos dos microtúbulos presentes nas células são estruturas lábeis cuja função é proveniente principalmente da habilidade de polimerização e despolimerização. A polimerização e despolimerização dos filamentos de tubulinas é um processo complexo envolvido em funções biológicas importantes. Essa instabilidade dinâmica dos microtúbulos (ou seja, o crescimento e retração dos filamentos) é requerida na mitose a fim de perscrutar a célula permitindo o encontro dos fusos mitóticos com os cinetócoros dos cromossomos (ALBERTS *et al.*, 1997).

Drogas antimitóticas atuam sobre a dinâmica dos microtúbulos. Embora os aspectos da sinalização variem entre as classes de drogas antimitóticas, essas drogas eventualmente bloqueiam temporariamente ou permanentemente as células em mitose devido a inibição do fuso mitótico ou das proteínas que o regulam (YAMADA e GORBSKY, 2006). Plantas desempenham um importante papel como fonte de agentes efetivos contra o câncer, e uma parcela significativa dos fármacos quimioterápicos atualmente empregados (cerca de 60%) é derivada de produtos naturais que incluem plantas, organismos marinhos e microrganismos. Substâncias derivadas de plantas por muito tempo foram e são utilizadas no tratamento de diversas doenças, e a procura por agentes anti-tumorais a partir de extratos de plantas começou na década de 1950 com o descobrimento e desenvolvimento dos vinca alcalóides: vinblastina e vincristina (ROCHA *et al.*, 2001; CRAGG e NEWMAN, 2005).

A vincristina foi isolada da planta *Catharanthus roseus*, proveniente de Madagascar, e por muito tempo muitas culturas a utilizava no tratamento de diabetes (GUERITTE e FAHY, 2005). Foi através de investigações como uma fonte de agente hipoglicêmico que se notou que o extrato da planta *C. roseus* reduzia contagens de células brancas e causava depressão sobre a medula óssea em ratos. Subseqüentemente se encontrou que esse extrato era ativo

contra leucemia em camundongos, levando assim ao isolamento da molécula ativa denominada vincristina (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Em baixas concentrações a vincristina se liga com alta afinidade em sítios localizados na extremidade *mais* dos microtúbulos, estabilizando os filamentos. Dessa maneira, a dinâmica dos microtúbulos é modificada, especialmente daqueles envolvidos no fuso mitótico, diminuindo a adição e perda de subunidades de tubulinas (JORDAN *et al.*, 1992). Em altas concentrações, a vincristina se liga preferencialmente aos dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, bem como em sítios de baixa afinidade ao longo da parede do microtúbulo, resultando na despolimerização dos filamentos (MOLLINEDO e GAJATE, 2003).

A descoberta do taxol, em 1963, como agente efetivo contra o câncer foi recebida com muito entusiasmo, porém havia um problema. Retirada da casca do teixo *Taxus brevifolia*, a droga era muito difícil de extrair, e sua extração inevitavelmente matava a árvore. O problema foi resolvido com a fabricação da droga semi sintética, quando foi aprovada em 1994 pela “Food and Drug Administration”. Paclitaxel é atualmente utilizado em tratamentos de câncer de mama, ovário, pulmão, e cabeça e pescoço. Tem como alvo de atuação a β -tubulina, e se liga na porção N terminal da proteína, preferencialmente ao filamento do que aos dímeros distribuídos pelo citoplasma. Paclitaxel atua inibindo a despolimerização dos filamentos de tubulinas promovendo a formação de microtúbulos estáveis, bloqueando as células em metáfase (MOLLINEDO e GAJATE, 2001). Baixas concentrações de paclitaxel atuam impedindo a instabilidade dos filamentos, tal qual a vincristina (JORDAN *et al.*, 1993). Apesar de ser conhecido o alvo de atuação, o mecanismo pelo qual as células tumorais morrem após administração de paclitaxel ainda não é conhecido.

Células em cultura tratadas com drogas antimitóticas transitam através de G1, S e G2 e, ao entrar em mitose, bloqueiam a progressão pelo ciclo celular. Possíveis conseqüências da ativação do “checkpoint” mitótico são delineadas, e acredita-se que essas conseqüências podem ser dependentes da concentração das drogas. Alguns caminhos possíveis são: (A) bloqueio mitótico sustentado enquanto houver presença da droga. Após a retirada da droga, o bloqueio é suspenso e a célula continua pelo ciclo celular. (B) Bloqueio

mitótico e conseqüente morte celular. Os outros possíveis caminhos (C, D, E) envolvem uma condição especial, na qual as células tornam-se poliplóides porque continuam o ciclo celular, mesmo na presença da droga, sem realizarem citocinese. Essa nova condição pode ser denominada de “escape” da mitose ou adaptação celular. Uma vez poliplóides, as células podem seguir pelos seguintes caminhos: (C) as células poliplóides podem realizar morte celular; (D) as células podem ficar num estado senescente, sem realizarem divisão celular, ou (E) podem continuar a se dividirem com conteúdo anormal de DNA. Essa última possibilidade pode provocar instabilidade genética, podendo servir como fonte para produção de células aneuplóides contendo quantidades anormais de cromossomos (STORCHOVA e PELLMAN, 2004; KOPS *et al.*, 2005; WEAVER e CLEVELAND, 2005; YAMADA e GORBSKY, 2006).

A adaptação celular que ocorre em células tratadas com venenos de fuso leva à formação de células poliplóides, característica que também pode ocorrer em tumores malignos. Segundo a teoria desenvolvida por Ewers *et al.* (1984) a transformação maligna em tumores de mama começa quando uma célula diplóide se torna poliplóide e perde cromossomos devido à instabilidade genética. Essa hipótese é sustentada pela presença de uma alta ocorrência de células tetraplóides em lesões pré neoplásicas, como carcinoma *in situ* de mama.

Uma explicação plausível para o advento de células poliplóides reside nos centrossomos das células. Quando uma célula adquire o dobro do número de cromossomos também adquire o dobro do número de centrossomos. Ainda não se sabe se o aumento no número de centrossomos é um efeito da poliploidização ou se tem papel na evolução tumoral. Aproximadamente 80% dos tumores de mama invasivos possuem anormalidades na estrutura ou número de centrossomos, mostrando correlação com aneuploidia (RAJAGOPALAN e LENGAUER, 2004).

Recentemente, pesquisadores têm delineado outra possível resposta da célula aos venenos de fuso, e essa resposta é dependente da concentração da droga. Baixas concentrações de venenos de fuso podem induzir o aparecimento de população aneuplóide através de mitoses aberrantes. As drogas (tais como taxol e nocodazole) induzem a formação de mitoses

contendo múltiplos fusos mitóticos, e essas mitoses não ficam bloqueadas, dando origem a células aneuplóides (TORRES e HORWITZ, 1998; CHEN e HORWITZ, 2002).

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais freqüente no mundo que acomete as mulheres. O número de novos casos de câncer de mama esperado para o Brasil em 2008 é de 49.400 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2008). Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil. Isso se deve provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2008).

A determinação do correto prognóstico é extremamente importante para a otimização da terapia nos pacientes com câncer. O estágio da doença pode ser um reflexo não somente da taxa de crescimento e extensão da neoplasia, mas também do tipo de tumor. Segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2008) a descrição clínica precisa e a classificação histopatológica das neoplasias malignas podem informar qual tratamento melhor se aplica em cada caso (TNM, CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS, 2004). A classificação TNM, baseada no tamanho do tumor primário (T), envolvimento de nódulos linfáticos (N) e metástase a distância (M) ainda é a melhor maneira para se escolher o tratamento mais adequado.

A busca pelo tratamento mais adequado no câncer de mama tem levado muitos pesquisadores a investigar potenciais parâmetros, além da classificação TNM, que podem ser utilizados na determinação do correto prognóstico. Um dos parâmetros mais estudados é a análise do conteúdo de DNA, que tem se mostrado um fator relevante na avaliação clínica de pacientes com câncer de mama (EWERS *et al.*, 1984; MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994). Células neoplásicas com conteúdo de DNA aneuplóide exibem instabilidade cromossômica, o que pode aumentar a capacidade de invasão e conseqüente aparecimento de metástases, quando comparadas com células tumorais com conteúdo de DNA euplóide (YILDIRIM-ASSAF *et al.*, 2007). A quantidade de DNA está intimamente relacionada com a reincidência no câncer de mama, havendo uma relação entre células com conteúdo de DNA aneuplóide,

agressividade tumoral e prognóstico desfavorável (AUER *et al.*, 1984; MACHADO-SANTELLI *et al.*, 1994).

Além da análise da quantidade de DNA, anormalidades nucleares também podem ser utilizadas no diagnóstico do câncer, uma vez que muitos tumores apresentam morfologia nuclear anormal. Essas alterações nucleares incluem variações no tamanho e forma do núcleo, binucleação, multinucleação, além de estruturas anormais da cromatina como micronúcleos e “blebs” nucleares. Em alguns tipos de neoplasias, como em câncer de ovário e adenocarcinoma de mama, a presença de núcleo anormal é associada com prognóstico desfavorável (ERHARDT *et al.*, 1989; GISSELSSON *et al.*, 2001).

Uma importante questão de significado clínico é saber se células com instabilidade genética são mais ou menos sensíveis a drogas antimitóticas. Resta saber quais proteínas iniciam a cascata de sinalização que levam a apoptose, permitindo mais facilmente a morte de células tumorais. Proteínas do “checkpoint” mitótico têm participação direta com a formação da aneuploidia? Qual o tempo necessário do tratamento com drogas antimitóticas para que as células bloqueiem a mitose e sofram apoptose? O tempo do tratamento pode provocar resistência aos quimioterápicos em células com instabilidade genética?

O papel da aneuploidia na tumorigênese não foi ainda estabelecido, mas indiferente da sua importância no desenvolvimento do tumor, encontrar maneiras de inibir sua formação ou de super induzir seu aparecimento podem ter implicações significativas para as terapias contra o câncer.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo pesquisar se as drogas vincristina e paclitaxel, em baixa concentração, causam o aparecimento de populações de células aneuplóides em cultura de células de mama. Para isso foi analisada a ação das drogas sobre a ploidia celular e progressão pelo ciclo celular. Foi analisada também a morfologia celular e organização do citoesqueleto, uma vez que essas drogas atuam sobre os microtúbulos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura celular e condições de cultivo

As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho, provenientes da ATCC (American Type Culture Collection), foram:

1. MCF 10A: linhagem epitelial de mama humana, não tumorigênica (ATCC nº: CRL-10317);
2. MCF7: linhagem de adenocarcinoma mamário metastático humano (ATCC nº: HTB-22);
3. T-47D: linhagem de carcinoma ductal de mama humana (ATCC nº HTB-133).

O meio de cultura utilizado para a linhagem MCF-10A foi DMEM (Sigma-Aldrich®) complementado com 20ng/mL de EGF, 0,5µg/mL de hidrocortisona e 10µg/mL de insulina, mais adição de 5% de soro adulto bovino (Cultilab®) (DEBNATH, *et al*, 2003). O meio de cultura utilizado para as linhagens MCF7 e T-47D foi o DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®). As linhagens foram mantidas em estufa a 37 °C com alta umidade relativa (maior que 90%) e em 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias e as células foram sub-cultivadas regularmente. As sub-culturas foram obtidas por ação da tripsina com solução de tripsina a 0,05% e EDTA a 0,02%. Os estoques celulares foram mantidos em nitrogênio líquido em uma solução contendo 60% de DMEM, 20% de soro fetal bovino e 20% de DMSO.

3.2 Curva de crescimento

As células foram descoladas da garrafa pela ação da tripsina e semeadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro contendo 2mL de meio de cultura. O inóculo inicial de células foi de: 6×10^4 células para a linhagem MCF 10A, 3×10^4 células para MCF7 e 5×10^4 células para T-47D. Nos dias de interesse as células foram descoladas das placas e, após a tripsina ser inativada com meio de cultura, as células foram colocadas em uma câmara de Neubauer para contagem. As contagens foram realizadas em triplicatas.

3.3 Esquema de tratamentos

As células foram descoladas da garrafa por tripsina e semeadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro, contendo uma lamínula cada placa. Foram utilizados os mesmos inóculos de células usados na curva de crescimento.

Após quatro dias em estufa o meio de cultura das placas foi substituído por uma solução contendo meio de cultura fresco e paclitaxel (Sigma-Aldrich®) na concentração de 10 nM, e a droga foi mantida por 24 horas. Após esse período as células foram fixadas com formaldeído 3,7% em solução de PBSA por 30 minutos ou solução de etanol e ácido acético (3:1) por 30 minutos. A esse tratamento damos o nome de tratamento 24 horas (Esquema 1).

Outro grupo de células recebeu o mesmo tratamento com paclitaxel por 24 horas e, após esse tempo, o meio de cultura contendo a droga foi substituído por meio de cultura isento da droga. As células foram então submetidas a 24 horas de recuperação, e foram posteriormente fixadas com formaldeído 3,7% em PBSA por 30 minutos, ou solução de etanol e ácido acético (3:1) por 30 minutos. A esse tratamento damos o nome de tratamento 48 horas (Esquema 1).

Para se analisar o efeito da droga vincristina (Oncovin® – Gedeon Richter) nas linhagens estudadas foi utilizado o mesmo esquema de tratamentos 24 e 48 horas na mesma concentração da droga (10 nM).

As imagens das células foram obtidas em microscópio de fase invertido Nikon® TMS e adquiridas por meio de uma máquina fotográfica acoplada.

Esquema 1: Tratamentos 24 horas e 48 horas.

3.4 Imunofluorescência

As células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro que continham uma lamínula. Após quatro dias foram realizados os tratamentos 24 horas e 48 horas com as drogas vincristina e paclitaxel. As células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 30 minutos e, após lavagem com PBSA, a membrana plasmática das células foi permeabilizada com 0,5% de Triton X-100 por 15 minutos. Após lavagem com PBSA foram adicionados às células anticorpos primários monoclonais (Sigma-Aldrich®) anti α -tubulina e anti β -tubulina nas concentrações 1:200 e 1:100, respectivamente. As placas foram deixadas em câmara úmida e escura e as células permaneceram com os anticorpos por 24 horas. Para visualizar os microtúbulos foi utilizado anticorpo secundário conjugado a fluoresceína por 2 horas. Dois anticorpos foram utilizados: um conjugado a TRITC (Sigma-Aldrich®) usado na concentração de 1:200, e outro conjugado a alexa 647 (Invitrogen®) na concentração de 1:200. Após lavagem, as células foram coradas por 40 minutos com faloidina TRITC ou FITC para marcação dos filamentos de actina. O núcleo foi evidenciado por iodeto de propídeo ou DAPI por 15 minutos. Para a marcação do núcleo por iodeto de propídeo, as células foram submetidas a 30 minutos de RNAase. As

lâminas foram montadas com antifading Vectashield (Vector) e seladas com esmalte.

As imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) (Zeiss LSM 510) com laser de argônio (458, 488 e 514 nm) ligado a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100M. A fluorescência emitida foi selecionada por um filtro LP 505nm e exibida com resolução 512x512 pixels em modo RGB.

3.5 Quantificação do DNA nuclear

3.5.1 Análise de imagem (CIRES)

A quantificação do DNA foi realizada por análise de imagem através do programa CIRES (Kontron Elektronik), instalado em microscópio Axioskop da Zeiss. O programa fornece o histograma da distribuição do conteúdo de DNA em valores de IOD (densidade óptica integrada) que é convertido em ploidia por valores correspondentes a IOD de células diplóides. A linhagem MCF 10A foi utilizada como controle diplóide.

As células foram semeadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro contendo uma lamínula cada placa. Após quatro dias foram realizados os tratamentos 24 horas e tratamento 48 horas com as drogas vincristina e paclitaxel. Para a quantificação por análise de imagem foi realizada a coloração de Feulgen, utilizando-se o Reativo de Schiff. As células foram fixadas com etanol e ácido acético (3:1) por 30 minutos, e após lavagem com PBSA, as lamínulas foram coladas em lâminas com Entelan®. As células foram, então, tratadas com 5M de HCl por 30 minutos, e as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Após lavagem, as lâminas ficaram imersas em Reativo de Schiff por 90 minutos, e foram posteriormente lavadas em água corrente.

3.5.2 Citometria de Fluxo

3.5.2.1 Marcação do núcleo por iodeto de propídeo

As células foram semeadas em placas de Petri 35 mm com os mesmos inóculos utilizados na curva de crescimento. Depois de quatro dias, foram realizados os tratamentos 24 horas e 48 horas com o paclitaxel e a vincristina. Após os tratamentos, as células foram descoladas das placas pela ação da tripsina e, após inativação da enzima com meio de cultura, as células foram transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 1000 rpm (Fisher Scientific-Centrific Centrifuge) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em PBSA e metanol gelado a 4°C (1:3), e os tubos foram deixados por 1 hora no gelo. Após centrifugação e lavagem com PBSA o pellet foi suspenso em uma solução contendo 200 µL de PBSA, 20 µL de RNAase (10mg/mL) e 20 µL de iodeto de propídeo. As células em suspensão foram deixadas por 30 minutos no gelo antes da leitura pelo citômetro de fluxo (Beckman Coulter).

4 RESULTADOS

4.1 Curva de crescimento

O comportamento das linhagens celulares *in vitro* foi avaliado pela curva de crescimento, metodologia que nos permitiu analisar a adaptação das células às condições de cultivo. Uma vez que o crescimento das células altera-se ao longo de cada fase da curva de crescimento (que compreende as fases lag, log, fase estacionária e de declínio) é importante determinar quando as células se encontram em cada fase. A fase lag caracteriza-se pelo período de tempo no qual o número de células não varia, e sua duração depende do estágio de crescimento em que se encontra a linhagem que lhe deu origem e da adesão do substrato. Nas linhagens utilizadas nesse trabalho essa fase não aparece. A fase logarítmica (log) ou exponencial compreende o período de tempo no qual as células estão em constante multiplicação. Foi durante esse período que os tratamentos foram realizados, pois era essencial que as células estivessem em proliferação. Na fase estacionária não há aumento no número de células, o que pode resultar de um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular ou parada do crescimento, decorrente da inibição por contato quando a cultura atinge a densidade de saturação. Essa fase foi alcançada nas linhagens MCF 10A e MCF7 no período de tempo analisado. Já a fase de declínio não foi alcançada por nenhuma das linhagens utilizadas, pois não houve uma redução no número de células.

Para a realização da curva de crescimento da linhagem MCF 10A o inóculo inicial de células foi de 6×10^4 e as contagens de células se realizaram nos dias 2, 4, 6, 8 e 11. No Gráfico 1 temos o gráfico que foi obtido através da média aritmética da contagem de três placas por dia. A fase exponencial da linhagem se estende do segundo dia em cultura até o oitavo dia em cultura. A partir desse ponto as células tendem à fase estacionária (ou “plateau”).

Gráfico 1: Curva de crescimento da linhagem MCF 10A.

Com a linhagem T-47D o inóculo de células foi de 5×10^4 e as contagens foram realizadas nos dias 2, 4, 7 e 10. O gráfico obtido através da contagem de três placas por dia (Gráfico 2) revela que entre os dias 2 e 10 a cultura está na fase exponencial de crescimento. As fases estacionária e de declínio não foram contempladas durante esse período de tempo.

Gráfico 2: Curva de crescimento da linhagem T-47D.

A linhagem MCF7 teve como inóculo inicial 3×10^4 células e as contagens foram realizadas em triplicatas nos dias 2, 4, 6 e 8. A fase exponencial se estende do segundo ao sexto dia de cultivo. A partir do sexto dia a cultura tende à fase estacionária (Gráfico 3). A partir dos dados obtidos padronizou-se começar os tratamentos após o quarto dia de cultivo para todas as linhagens utilizadas, obedecendo-se os respectivos inóculos iniciais.

Gráfico 3: Curva de crescimento da linhagem MCF7.

4.2 Análise da morfologia celular

As variações morfológicas das células com os tratamentos 24 horas e 48 horas foram analisadas primeiramente através de microscopia de contraste de fase. Em todas as linhagens estudadas não houve diferença quanto à densidade de células entre o grupo controle e os grupos tratados.

A cultura celular MCF 10A, quando está subconfluente, tem por característica a presença de células alongadas que podem emitir prolongamentos como filopódios (Figura 1A, seta branca) e lamelipódios (Figura 1A, seta preta). Quando a cultura está confluenta as células tornam-se poliédricas, não apresentando mais as expansões citoplasmáticas, o que constitui uma característica de células epiteliais (Figura 2A).

O tratamento 24 horas com a vincristina sobre a linhagem MCF 10A (Figura 1B) provocou o aparecimento de células arredondadas decorrentes do tratamento, que foram visualizadas por microscopia de luz. Para confirmar se essas células eram mitoses decorrentes do bloqueio causado pela droga, o índice mitótico das linhagens foi determinado. Para isso foram utilizadas lâminas coradas por Reativo de Schiff, e o índice foi determinado contando-se células em metáfase. O índice mitótico do grupo controle foi de 0,5% enquanto que no tratamento 24 horas com vincristina foi de 1,8%. Esse tratamento (Figura 1B) não causou nenhuma modificação no comportamento da cultura celular, uma vez que a distribuição das células permaneceu igual ao do grupo controle (Figura 1A). Também não provocou alterações na morfologia celular visíveis à microscopia de luz.

O tratamento 24 horas com a droga paclitaxel (Figura 1C) da linhagem não tumorigênica (MCF 10A) aparentemente não provocou nenhuma alteração morfológica nem comportamental nas células quando comparado com o grupo controle (Figura 1A). Mas causou um aumento no número de mitoses. O índice mitótico do tratamento 24 horas com paclitaxel foi de 1,6%.

O tratamento 48 horas com a vincristina (Figura 2B) aparentemente causa uma desarmonia na forma como as células crescem em monocamada. O grupo controle das células MCF 10A (Figura 2A) tem um crescimento uniforme, as células crescem uma do lado da outra. Após o tratamento com vincristina e posterior tempo de recuperação (tratamento 48 horas), as células continuam a crescer em monocamada, mas vemos algumas células crescerem sobrepostas a outras células (Figura 2B). Não foram observadas células em suspensão (indicativo de morte celular) nem células em mitose.

O tratamento 48 horas com o paclitaxel não provocou nenhuma alteração morfológica nem comportamental sobre a linhagem (Figura 2C). Não foram visualizadas células em suspensão.

Figura 1: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre as células MCF 10A.

Figura 2: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A), e os tratamentos 48 horas com drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre as células MCF 10A.

As células da linhagem MCF7 apresentam-se poliédricas e agrupam-se em pequenos *domus* quando a cultura está subconfluyente (Figura 3A e 4A). O tratamento 24 horas com a vincristina (Figura 3B) bloqueou as células em

mitose, uma vez que houve o aparecimento de células arredondadas nesse tratamento. O índice mitótico do grupo controle foi de 1,2 % e o índice das células tratadas por 24 horas com vincristina foi de 19,2%. Nesse tratamento (Figura 3B) não foi visualizada nenhuma alteração morfológica nas células quando comparado com o grupo controle (Figura 3A).

O tratamento 24 horas com a droga paclitaxel (Figura 3C) provocou o aparecimento de células em mitose. O índice mitótico foi de 6,5%. As células durante o tratamento (Figura 3C) permaneceram com as mesmas características morfológicas do que o grupo controle (Figura 3A), além de continuarem com o mesmo comportamento de formar pequenos grupos em monocamada.

O tratamento 48 horas com vincristina (Figura 4B) modificou o comportamento da linhagem. As células não se apresentaram mais em pequenos grupos, mas sim ficaram espalhadas pela placa aparentemente sem nenhuma disposição especial. Parece ter havido um aumento de células com diâmetro maior (células gigantes) no tratamento com vincristina (Figura 4B, setas) comparado com o grupo controle (Figura 4A), que apresentou células pequenas. Há uma uniformidade no tamanho das células no grupo controle, característica que se perde no tratamento. Ainda pudemos ver no grupo tratado células arredondadas, indicativas de células em mitose. Mas não foram observadas células em suspensão.

Já o tratamento 48 horas com paclitaxel nas células MCF7 não causou nenhuma alteração no comportamento da linhagem, nem na morfologia das células (Figura 4C). Não foram encontradas células em mitose nem em suspensão.

Figura 3: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem MCF7.

Figura 4: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A) e os tratamentos 48 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem MCF7. Setas em B indicam células gigantes.

As células T-47D são poliédricas e também se apresentam em pequenos grupos quando a cultura está subconfluente (Figura 5A e 6A). Da mesma maneira que ocorreu com as outras linhagens, o tratamento 24 horas

com a vincristina (Figura 5B) provocou o aparecimento de um número maior de células em mitose, quando comparado com o tratamento com a droga paclitaxel. Essa linhagem atingiu o maior índice mitótico para o tratamento 24 horas com vincristina que foi de 39,4%, enquanto que no grupo controle o índice mitótico foi de 0,6%. O tratamento não provocou nenhuma alteração na linhagem.

O tratamento 24 horas com o paclitaxel também não causou alterações nas células. O índice mitótico desse tratamento foi de 3,2% (Figura 5C).

No tratamento 48 horas com a vincristina as células ainda permanecem bloqueadas em mitose, devido a grande quantidade de células arredondadas (Figura 6B). Nenhuma alteração morfológica ou comportamental foi observada nessa linhagem. As células permaneceram reunidas em pequenos grupos, como no grupo controle (Figura 6A), e o tamanho celular não variou. Não foram visualizadas células em suspensão.

O tratamento 48 horas com paclitaxel não provocou nenhuma alteração no comportamento ou na morfologia das células T-47D (Figura 6C). Não foram observadas células mitóticas nem células em suspensão nesse tratamento.

Figura 5: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 24 horas (A) e os tratamentos 24 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem T-47D.

Figura 6: Fotomicrografias obtidas em microscópio invertido de fase mostrando o grupo controle 48 horas (A) e os tratamentos 48 horas com as drogas vincristina (B) e paclitaxel (C) sobre a linhagem T-47D.

4.3 Análise do citoesqueleto

Após análise ao microscópio de fase as células foram marcadas para visualização ao microscópio confocal de varredura a laser. Uma vez que as

drogas paclitaxel e vincristina atuam sobre os microtúbulos o citoesqueleto foi analisado, comparando-se as células do grupo controle e dos grupos tratados 24 horas e 48 horas.

O citoesqueleto das células interfásicas e das células em mitose foi analisado. Nas preparações por imunofluorescência da linhagem MCF 10A o núcleo foi evidenciado por iodeto de propídeo (Figura 7A), os filamentos de actina foram evidenciados por faloidina FITC (Figura 7B) e os microtúbulos foram evidenciados por anticorpo primário contra α e β tubulina, seguido de anticorpo secundário alexa 647 (Figura 7C).

As células do grupo controle possuem microfilamentos do tipo “stress fibers” ordenadas paralelamente entre si e ao maior eixo da célula (Figura 7B). Há também a presença de actina nas projeções citoplasmáticas como os filopódios (Figura 7B, seta). Os microtúbulos aparecem distribuídos por todo o citoplasma da célula com organização normal (Figura 7C).

Nas células interfásicas da linhagem MCF 10A os tratamentos 24 horas e 48 horas tanto com a vincristina quanto com o paclitaxel aparentemente não afetaram os filamentos de actina nem os filamentos de tubulinas. No tratamento 24 horas com vincristina, por exemplo, vemos a distribuição dos filamentos de actina (Figura 8B) e a distribuição dos microtúbulos (Figura 8C) iguais aos do grupo controle (Figura 7B e 7C, respectivamente).

As células mitóticas da linhagem MCF 10A possuem organização dos microtúbulos característicos de fusos mitóticos normais. Podemos identificar dois tipos de microtúbulos: microtúbulos astrais (Figura 9, seta rosa) e microtúbulos polares (Figura 9, seta branca). Essa organização desaparece quando a linhagem é tratada com vincristina.

O tratamento 24 horas com vincristina provoca o desarranjo dos filamentos de tubulinas em células mitóticas, e o fuso mitótico deixa de existir (Figura 10C). O fuso mitótico não se formando os cromossomos não se alinham na placa metafásica (Figura 10A, cromossomos e 10C, microtúbulos). Até há marcação de tubulina, mas essa marcação aparece como pequenos agregados distribuídos no citoplasma das células mitóticas, notadamente próximos aos cromossomos (Figura 10C, seta branca).

Interessante notar que essa alteração no fuso mitótico só ocorreu no tratamento 24 horas com a vincristina. No tratamento 24 horas com paclitaxel

não foi observado tal fenômeno. No tratamento 24 horas com paclitaxel o fuso mitótico se forma, e apresenta a mesma morfologia do que a célula normal. Não houve alterações nos microtúbulos.

No tratamento 48 horas com a vincristina não há mais evidências do fenômeno. Ou seja, os fusos mitóticos se formam e apresentam morfologia normal. O tratamento 48 horas com o paclitaxel também não alterou a formação dos fusos mitóticos.

Uma alteração encontrada nas células mitóticas após tratamento tanto com vincristina quanto paclitaxel (tratamentos 24 e 48 horas) foi a presença de células contendo múltiplos fusos mitóticos. A Figura 11 mostra uma célula em metáfase contendo três fusos mitóticos aos quais os cromossomos estão ligados. Nota-se que os cromossomos não estão alinhados na placa metafásica.

Figura 7: Imagem obtida ao MCVL de células MCF 10A controle 24 horas. As seguintes estruturas estão evidenciadas: A: núcleos; B: filamentos de actina; C: microtúbulos. D: todos os canais em conjunto. A seta em B mostra projeções citoplasmáticas (filopódios) de uma célula.

Figura 8: Imagem obtida ao MCVL de células MCF 10A tratamento 24 horas com vincristina. As seguintes estruturas estão evidenciadas: A: núcleos; B: filamentos de actina; C microtúbulos. D: todos os canais em conjunto.

Figura 9: Imagem obtida ao MCVL de uma célula mitótica da linhagem MCF10A controle 24 horas. Em vermelho estão evidenciados os cromossomos, em azul estão evidenciados os microtúbulos e em verde há marcação dos filamentos de actina. A seta branca aponta microtúbulos polares, e a seta rosa microtúbulos astrais.

Figura 10: Imagem obtida ao MCVL de células da linhagem MCF10A após tratamento 24 horas com vincristina. A: núcleos, B: filamentos de actina, C: microtúbulos. D: todos os canais juntos. A seta branca em C aponta marcação anormal de tubulina.

Figura 11: Imagem obtida ao MCVL de célula mitótica da linhagem MCF10A. Em vermelho os cromossomos estão evidenciados, e em azul os microtúbulos. Nota-se que os três fusos mitóticos estão ligados aos cromossomos, e que esses não se distribuem corretamente na placa metafásica.

Os tratamentos com ambas as drogas provocaram o aumento ou diminuição na quantidade de núcleos presentes nas células da linhagem MCF 10A. A linhagem controle já possui em sua população células binucleadas e multinucleadas. O tratamento 24 horas com a vincristina aumentou em $\approx 22\%$ a quantidade de células binucleadas, e em $\approx 527\%$ a quantidade de células multinucleadas. O tratamento 48 horas com vincristina aumentou em $\approx 23\%$ o número de células binucleadas e $\approx 637\%$ o número de células multinucleadas (Tabela 1).

O tratamento 24 horas com paclitaxel diminuiu em $\approx 36\%$ o número de células binucleadas e aumentou em $\approx 45\%$ o número de células multinucleadas. O tratamento 48 horas com paclitaxel diminuiu em $\approx 55\%$ o número de células binucleadas e aumentou em $\approx 64\%$ o número de células multinucleadas (Tabela 1). A Figura 12 mostra células multinucleadas após tratamento 48 horas com vincristina.

Tabela 1: porcentagem de alterações nucleares em células MCF 10A.

MCF10A 24hrs	Binucleada	Multinucleada	MCF10A 48hrs	Binucleada	Multinucleada
Controle	7,3%	1,1%	Controle	7,3%	1,1%
VCR	8,9%	6,9%	VCR	9%	8,1%
PTX	4,7%	1,6%	PTX	3,3%	1,8%

Figura 12: Imagem obtida ao MCVL mostrando núcleos de células da linhagem MCF10A após tratamento 48 horas com vincristina. As setas mostram células multinucleadas.

Nas preparações de imunofluorescência com as células MCF7 os microtúbulos foram marcados com anticorpo primário contra α e β tubulina, seguido de marcação com anticorpo secundário conjugado a TRITC (Figura 13A), os filamentos de actina foram marcados com faloidina FITC (Figura 13B) e os núcleos evidenciados com DAPI (Figura 13C). Na linhagem MCF7 os filamentos de tubulina aparecem distribuídos por todo o citoplasma. Nota-se que os microtúbulos são irradiados a partir de um ponto próximo a um dos núcleos, da região do centróssomo (Figura 13A). Já os filamentos de actina aparecem como fibras de estresse por toda a célula (Figura 13B). Nas células interfásicas tratadas com vincristina e paclitaxel (tratamentos 24 e 48 horas) não houve alterações no citoesqueleto, e sua distribuição ficou inalterada

quando comparada com as células controle. A Figura 14 mostra uma célula interfásica após tratamento 24 horas com vincristina.

As alterações no citoesqueleto decorrentes dos tratamentos ocorreram aparentemente apenas nas células mitóticas, mesmo resultado encontrado para a linhagem não tumorigênica. Células mitóticas contendo múltiplos fusos mitóticos foram encontradas nos tratamentos com ambas as drogas, principalmente no tratamento 24 horas. Uma alteração encontrada nessa linhagem foi a visualização de cromossomos “soltos” não alinhados na placa metafásica após tratamento 24 horas com as drogas vincristina e paclitaxel. Na Figura 15 (setas) podemos ver três cromossomos não alinhados em célula MCF7 após tratamento 24 horas com paclitaxel.

Foram encontradas células em mitose, na fase de telófase, que poderiam dar origem a três células filhas (Figura 16). Bem como células multinucleadas após tratamento 48 horas com vincristina (Figura 17).

Figura 13: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 controle 24 horas. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais juntos.

Figura 14: Imagem obtida ao MCVL de célula da linhagem MCF7 após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais junto.

Figura 15: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 evidenciando em vermelho os cromossomos e em azul os microtúbulos. As setas mostram cromossomos não alinhados à placa metafásica.

Figura 16: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais junto.

Figura 17: Imagem obtida ao MCVL da linhagem MCF7 após tratamento 48 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais em conjunto.

As alterações nucleares nas células MCF7 foram analisadas. O tratamento 24 horas com a vincristina provocou o aumento de 1775% o número de células binucleadas, e o aumento de 7,3% no número de células multinucleadas. O tratamento 48 horas com a vincristina aumentou em 1675% o número de células binucleadas e 9,3% o número de células multinucleadas. O tratamento 24 horas com paclitaxel aumentou em 25% o número de células binucleadas. O tratamento 48 horas com paclitaxel aumentou em 150% o

número de células binucleadas. Paclitaxel não provocou o aparecimento de células multinucleadas.

Tabela 2: porcentagem de alterações nucleares em células MCF7.

MCF7 24hrs	Binucleada	Multinucleada	MCF7 48hrs	Binucleada	Multinucleada
Controle	0,4%	0%	Controle	0,4%	0%
VCR	7,5%	7,3%	VCR	7,1%	9,3%
PTX	0,5%	0%	PTX	1%	0%

Nas preparações para imunofluorescência das células T-47D foi utilizado anticorpo primário contra α e β tubulina, seguido de anticorpo secundário conjugado a TRITC para visualização dos microtúbulos (Figura 18A), faloidina FITC para marcar os filamentos de actina (Figura 18B) e DAPI para marcar o núcleo (Figura 18C). Os microtúbulos das células T-47D estão distribuídos por todo o citoplasma da célula (Figura 18A). Os microfilamentos se distribuem por todo o citoplasma e em algumas células não formam fibras de estresse (Figura 18B), se acumulando nos limites celulares.

Após o tratamento 24 horas com vincristina as células interfásicas apresentavam microtúbulos proeminentes próximos ao córtex celular. Tal arranjo foi encontrado somente no tratamento 24 horas com vincristina (Figura 19A, seta). Esse resultado pode ser indicativo de alterações dos microtúbulos nas células interfásicas.

Uma alteração encontrada foi a presença de quatro fusos mitóticos na mesma célula (Figura 20, seta branca). A Figura 21 mostra tratamento 24 horas com vincristina e várias mitoses contendo números anormais de pólos mitóticos. A Figura 22 mostra mitose contendo múltiplos fusos mitóticos evidenciados pelo módulo de projeção ortogonal do programa de aquisição do MCVL (LSM Image Browser).

Figura 18: Imagem ao MCVL de células T-47D controle 24 horas. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleo; D: todos os canais em conjunto.

Figura 19: Imagem obtida ao MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C núcleo; D todos os canais em conjunto. A seta em A mostra distribuição alterada de microtúbulos pelo citoplasma.

Figura 20: Imagens seqüenciais obtidas por MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciados em vermelho os microtúbulos e em verde os filamentos de actina. As setas brancas mostram uma célula contendo duas mitoses.

Figura 21: Imagem obtida ao MCVL de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. Estão evidenciadas as seguintes estruturas: A: microtúbulos; B: filamentos de actina; C: núcleos; D: todos os canais em conjunto.

Figura 22: Projeção ortogonal de células T-47D após tratamento 24 horas com vincristina. A imagem mostra mitose contendo múltiplos fusos mitóticos numa determinada secção ótica.

As alterações nucleares das células T-47D foram contabilizadas. O tratamento 24 horas com vincristina aumentou em 500% o número de células binucleadas e em 740% o número de células multinucleadas. O tratamento 48 horas com vincristina aumentou em $\approx 195\%$ o número de células binucleadas, e aumento em $\approx 483\%$ o número de células multinucleadas. O tratamento 24 horas com paclitaxel aumentou em $\approx 66\%$ o número de células binucleadas, e aumentou em 260% o número de células multinucleadas. O tratamento 48 horas aumentou em $\approx 21\%$ o número de células binucleadas, e diminuiu em $\approx 33\%$ o número de células multinucleadas.

Tabela 3: porcentagem de alterações nucleares em células T-47D.

T-47D 24hrs	Binucleada	Multinucleada	T-47D 48hrs	Binucleada	Multinucleada
Controle	1,2%	0,5%	Controle	1,9%	0,6%

VCR	7,2%	4,2%	VCR	5,6%	3,5%
PTX	2,0%	1,8%	PTX	2,3%	0,4%

4.4 Quantificação do DNA nuclear

Os dados coletados no CIRCES, contendo o conteúdo de DNA das células analisadas, foram categorizados em cinco classes:

Classe 1: compreende as células cujos valores de ploidia variam de 0 – 1,59 C.

Classe 2: compreende as células cujos valores de ploidia variam de 1,60 – 2,59 C.

Classe 3: compreende as células cujos valores de ploidia variam de 2,60 – 3,59 C.

Classe 4: compreende as células cujos valores de ploidia variam de 3,60 – 4,59 C.

Classe 5: compreende as células cujos valores de ploidia são maiores do que 4,60 C.

A classe 1 é representada pelas células cuja ploidia permanecem abaixo de 2C, denominadas de células hipodiplóides. São consideradas células comprometidas com a morte celular. A classe 2 representa as células diplóides com ploidia 2C. Na classe 3 a ploidia das células varia entre 2C e 4C, e pode ser representativa de duas situações. Primeiro pode representar células em proliferação, na fase S do ciclo celular; segundo que pode representar células aneuplóides ou hiperdiplóides. A classe 4 representa as células tetraplóides com ploidia 4C, e a classe 5 podemos dizer que é composta por células hipertetraplóides, representada pelas células aneuplóides. As células poliplóides (binucleadas e multinucleadas) não foram consideradas na análise por imagem.

Nas células MCF 10A controle 24 horas e 48 horas (Gráficos 4A e 4B, respectivamente) há dois picos principais: um representando as células diplóides, e outro representando as células tetraplóides, como esperado. O tratamento 24 horas e 48 horas com vincristina aumenta bastante a frequência de células 5C na população. Para determinar a significância desse aumento,

foram utilizadas duas análises estatísticas: modelos funcional linear e log linear, ambos considerando a variável ploidia categorizada.

No modelo funcional linear, a análise foi feita com relação a uma referência pré-fixada que foi o valor esperado da classe média de ploidia. A classe média de ploidia é calculada com base no controle 24 horas, e seu valor é 2,942. A droga vincristina aumenta o valor esperado da classe média de ploidia, independentemente do tempo. A classe média do tratamento 24 horas com vincristina aumenta em 0,404, sendo considerado um aumento significativo ($p\text{-valor} < 0,001$). Isso é ratificado no modelo log-linear. Nesse modelo é possível comparar os efeitos das drogas para cada classe analisada separadamente. A chance de se classificar uma célula na classe 5 é maior nos grupos tratados com vincristina com relação ao grupo controle. A chance de classificar uma célula na classe 5 (tratamento 24 horas com vincristina) é 7,6 vezes a chance em comparação com o controle. Ou seja, há um aumento significativo de células aneuplóides nos tratamentos 24 horas e 48 horas com a vincristina.

Os gráficos dos tratamentos 24 e 48 horas com paclitaxel sobre as células MCF 10A estão representados nos Gráficos 4A e 4B. A classe média de ploidia dos tratamentos 24 horas e 48 horas com paclitaxel não teve alteração significativa, quando comparada com o controle. Através da análise inferencial que utilizou como ferramenta os modelos funcionais lineares e os modelos log-lineares, podemos concluir que para a linhagem MCF 10A não existe efeito significativo da droga paclitaxel.

O efeito do tempo (de 24 horas para 48 horas) sobre a classe média de ploidia no grupo controle não teve efeito significativo ($p\text{-valor} > 0,05$).

Gráfico 4: Quantificação de DNA das células MCF 10A por análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.

O gráfico das células MCF7 controle 24 horas (Gráfico 5A) mostra uma distribuição desigual na quantidade de DNA, que foge dos dois picos definidos observados nas células MCF 10A. Há células hipodiplóides e hipertetraplóide no grupo controle. O tratamento 24 horas com a vincristina aumentou em 0,258 a classe média de ploidia (considerado o controle 24 horas como referência, que foi de 2,842), sendo esse aumento considerado significativo (p-valor <

0,001). Já o tratamento 48 horas diminui a classe média de ploidia em 0,935, sendo considerado significativo ($p\text{-valor} < 0,001$).

O tratamento 24 horas com paclitaxel diminuiu o valor esperado da classe média de ploidia em 0,546, sendo considerado significativo ($p\text{-valor} < 0,001$). Já o tratamento 48 horas aumentou a classe média de ploidia, mas esse aumento não é significativo.

O efeito de tempo (de 24 horas para 48 horas) nesta linhagem no grupo controle não foi significativo, ou seja, o valor esperado da classe média de ploidia não modificou ($p\text{-valor} = 0,080$).

No modelo log-linear a chance de se encontrar uma célula da classe 5 no tratamento 24 horas com a vincristina é maior do que encontrar essa mesma célula no grupo controle. E interessante notar que há maior chance de se encontrar uma célula da classe 5 no grupo controle 24 horas (49,1 vezes maior) do que no tratamento 24 horas com paclitaxel.

Gráfico 5: Quantificação de DNA das células MCF7 através de análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.

O Gráfico 6 mostra a distribuição da quantidade de DNA das células T-47D. Os controles 24 e 48 horas não mostram a mesma distribuição de dois picos. Na análise funcional linear somente a droga vincristina altera o valor esperado da classe média de ploidia. O valor esperado foi de 2,406 e o tratamento 24 horas com vincristina aumenta em 1,240 esse valor, sendo

significativo ($p\text{-valor} < 0,001$). O tratamento 48 horas com vincristina não foi considerado significativo, nem os tratamentos com paclitaxel.

No modelo log-linear a chance de se classificar uma célula na classe 5 do tratamento 24 horas com vincristina é 131,8 vezes a chance de se encontrar células dessa mesma classe no grupo controle 24 horas. Ou seja, o efeito no tratamento 24 horas é maior do que o tratamento 48 horas. Através desse modelo concluímos também que os tratamentos com paclitaxel não altera os valores de ploidia das células T-47D.

O efeito de tempo (de 24 horas para 48 horas) sobre a linhagem no grupo controle não modificou o valor da classe média de ploidia ($p\text{-valor} = 0,136$), não sendo significativa.

Gráfico 6: Quantificação de DNA das células T-47D através de análise por imagem. A: tratamento 24 horas. B: tratamento 48 horas. Controle: roxo; Vincristina: azul e Paclitaxel: verde.

4.5 Citometria de fluxo

As linhagens celulares foram analisadas quanto a quantidade de DNA antes e após os tratamentos com as drogas, sendo analisada a capacidade das

células de realizar bloqueio mitótico. A porcentagem denominada de < G1 representa as células hipodiplóides, e essas se localizam a esquerda do pico de G1. A porcentagem denominada de > G2/M representa as células aneuplóides ou poliplóides, e essas células se localizam a direita do pico de G2/M.

As células MCF 10A controle 24 horas possuem distribuição de DNA esperada para população de células normais. Há dois picos bem característicos representando as fases G1 (que compreende mais de 80% das células) e fases G2/M (que compreende pouco mais de 4% da população) (Gráfico7). Não há quantidade significativa de células hipodiplóides e aneuplóides na população de células normais.

Gráfico 7: Distribuição de DNA das células MCF 10A controle 24 horas.

Essa distribuição é modificada quando as células são tratadas com os venenos de fuso. O tratamento 24 horas com vincristina provoca um bloqueio em G2/M, pois há a mesma quantidade de células na população G1 e G2/M (aproximadamente 35%). A quantidade de células com ploidia anormal aumenta com esse tratamento: 8,4% da população têm conteúdo de DNA aneuplóide e outros 8,4% consiste de células hipodiplóides.

Gráfico 8: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 24 horas com vincristina.

O tratamento 24 horas com paclitaxel também bloqueou as células em mitose: há 30,8% da população celular concentrada no pico de G2/M. A droga causou o aparecimento de células hipodiplóides (12%) e aneuplóides (5,8%).

Gráfico 9: Distribuição de DNA das células MCF 10A do tratamento 24 horas com paclitaxel.

A distribuição de DNA das células MCF 10A controle 48 horas não se comporta como o esperado. Há muitas células com conteúdo 4C de DNA (20,6%), e grande quantidade de células hipodiplóides (21,9%) e aneuplóides (6,6%) (Gráfico 10).

Gráfico10: Distribuição de DNA das células MCF 10A controle 48 horas.

No tratamento 48 horas com a vincristina as células ainda permanecem bloqueadas em G2/M, com quantidade 4C de DNA, abrangendo 26,9% da população celular. O tratamento provoca o aparecimento de muitas células hipodiploides (28,68%) e células aneuploides (7,4%) (Gráfico 11).

Gráfico 11: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 48 horas com vincristina.

No tratamento 48 horas com paclitaxel as células ainda permanecem bloqueadas com conteúdo 4C de DNA. 32% das células permanecem no pico

G2/M. Há o aparecimento de células hipodiplóides (10,8%) e aneuplóides (8,7%).

Gráfico12: Distribuição de DNA das células MCF 10A tratamento 48 horas com paclitaxel.

No grupo controle 24 horas das células MCF7 há uma distribuição em dois picos: pico G1 que contém 45,7% das células e pico G2/M, que contém 14,5% das células da população. Há células hipodiplóides no grupo controle (24,1%) (Gráfico 13).

Gráfico 13: Distribuição de DNA das células MCF7 controle 24 horas

O tratamento 24 horas com a droga vincristina causa bloqueio em G2/M nas células MCF7. 46,5% das células estão com conteúdo 4C de DNA, ante 13,7% de células no pico em G1. Há o aparecimento de células hipodiplóides, que totaliza 17% da população celular (Gráfico 14).

Gráfico 14: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 24 horas com vincristina.

O tratamento 24 horas com paclitaxel causa bloqueio em G2/M nas células MCF7. 33,6% das células estão com conteúdo 4C de DNA, e 38,1% das células estão concentradas no pico G1. A droga não provoca o aparecimento de células com ploidia anormal (Gráfico 15).

Gráfico 15: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 24 horas com paclitaxel.

O grupo controle 48 horas das células MCF7 possui células predominantemente na região 2C do gráfico, contendo 39,8% da população celular. A população celular da fase S (22,9%) é quase equivalente a população na fase G2/M do ciclo celular (25,7%).

Gráfico 16: Distribuição de DNA de células MCF7 controle 48 horas.

No tratamento 48 horas com vincristina as células continuam bloqueadas em G2/M, com 70,2% das células com conteúdo 4C de DNA.

Gráfico 17: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 48 horas com vincristina.

No tratamento 48 horas com paclitaxel não houve um bloqueio na fase G2/M do ciclo celular. As células se localizaram predominantemente na região G1 do gráfico, contendo 47,2% da população celular. As células com conteúdo 4C de DNA compreendem 17,9% da população celular (Gráfico 18).

Gráfico 18: Distribuição de DNA das células MCF7 tratamento 48 horas com paclitaxel.

As análises da distribuição do DNA das células controle e tratadas não são satisfatórias quando a aquisição é realizada em escala logarítmica. As aquisições das células MCF7 foram ajustadas em logaritmo, não permitindo a visualização de células aneuplóides (localizadas à direita do pico de G2/M). O gráfico fica contraído, não permitindo avaliar se as drogas provocam o aparecimento de células com ploidia anormal.

Nas células T-47D o controle 24 horas mostra dois picos definidos. O primeiro pico, com 67% das células corresponde às células com ploidia 2C. O segundo pico (18,6%) corresponde às células com ploidia 4C. Essa linhagem apresenta em sua população de células controle uma porcentagem de células hipodiplóides (5,9%) e de células aneuplóides (4,9%) (Gráfico 19).

Gráfico 19: Distribuição de DNA das células T-47D controle 24 horas.

No tratamento 24 horas com vincristina há bloqueio em G2/M da população celular, uma vez que 60,8% das células estão com conteúdo 4C de DNA. A quantidade de células hipodiplóides teve um pequeno aumento para 8,9%, quando comparado com o grupo controle (5,9%). As células aneuplóides nesse tratamento diminuíram em 81% (Gráfico 20).

Gráfico 20: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 24 horas com vincristina.

O tratamento 24 horas com paclitaxel não fez efeito sobre as células. Não houve bloqueio em G2/M. O gráfico do tratamento se assemelha ao gráfico do grupo controle 24 horas, onde podemos ver dois picos bem definidos em G1 (61,6%) e G2/M (12,1%). Há uma parcela de células hipodiplóides (5%) e poucas células aneuplóides (1,8%) (Gráfico 21).

Gráfico 21: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 24 horas com paclitaxel.

O grupo controle 48 horas das células T-47D comporta-se do mesmo modo do que as células do grupo controle 24 horas. Há dois picos definidos, sendo um em G1 (com 60,6% das células) e outro em G2/M (com 33,6% das células). A população de células aneuplóides continuou a mesma (Gráfico 22).

Gráfico 22: Distribuição de DNA das células T-47D controle 48 horas.

No tratamento 48 horas com vincristina as células continuam bloqueadas com conteúdo 4C de DNA. 24,9% das células se encontram no pico de G2/M, enquanto que 17,3% das células se encontram no pico G1. Há um grande aumento de células hipodiplóides (24,7%) e de células aneuplóides (29,3%) (Gráfico 23).

Gráfico 23: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 48 horas com vincristina.

Já o tratamento 48 horas com paclitaxel sobre as células causou o bloqueio da população em G2/M, que compreende 21,9% das células (ante 12,8% de células em G1). Esse resultado é inesperado, uma vez que o tratamento 24 horas não bloqueou as células em G2/M. A droga causou o aparecimento de uma grande quantidade de células aneuplóides na população celular: 45,7% das células são aneuplóides. E 12,9% das células são hipodiplóides (Gráfico 24).

Gráfico 24: Distribuição de DNA das células T-47D tratamento 48 horas com paclitaxel.

5 DISCUSSÃO

Carcinomas se originam a partir do acúmulo de mutações genéticas, mas a natureza e a seqüência de tais mutações são incertas. As modificações que acometem o genoma podem variar desde mutações pontuais até perdas e ganhos de cromossomos (PIHAN e DOXSEY, 2003). A aneuploidia é um fenômeno constantemente observado em muitos tipos de tumores, particularmente carcinomas. Um grande número de evidências sugere que a aneuploidia pode ser causada por um tipo particular de instabilidade genética, denominada instabilidade cromossômica, causada por defeitos na segregação do DNA da célula durante a metáfase (RAJAGOPALAN e LENGAUER, 2004). O presente trabalho enfoca particularmente a aneuploidia como consequência de defeitos na segregação dos cromossomos, uma vez que os resultados encontrados sugerem que as células, após os tratamentos, realizam mitoses aberrantes originando células com ploidia anormal.

Induzir mitose aberrante em células tumorais através de distúrbios nos fusos mitóticos leva ao bloqueio em metáfase, e a consequência pode ser (mas nem sempre) a morte celular (TORRES e HORWITZ, 1998; WANG *et al.*, 2000). Estudos utilizando drogas anti mitóticas em linhagens celulares tumorais mostram que há várias maneiras das células responderem à injúria nos fusos mitóticos, e as respostas aos tratamentos diferem conforme as células utilizadas e à concentração das drogas. Células tumorais que realizam bloqueio em metáfase e sobrevivem ao tratamento podem desenvolver mecanismos de sobrevivência ao se tornarem resistentes à morte celular (revisado em JACKSON, 2007). Células aneuplóides podem surgir após tratamento com venenos de fuso, e a questão é saber se a aneuploidia leva as células à morte por apoptose, ou pode originar células mais malignas, contribuindo dessa maneira para a tumorigênese.

Estudos realizados com diversas concentrações de venenos de fuso levam a comparações dos efeitos causados, sendo um recurso muito utilizado. Entretanto, o uso de altas concentrações para extrapolar o efeito das drogas pode ser uma ferramenta inválida. Segundo Blagosklonny e Fojo (1999), estudos realizados com altas concentrações de paclitaxel, que excedem os

níveis farmacológicos, são suspeitos, pois não têm significado clínico relevante. Embora a concentração de paclitaxel no plasma fique em torno de 5 a 10 μM após administração da droga, rapidamente cai para concentrações nanomolares quando atinge o tumor (HUIZING *et al.*, 1993 apud BLAGOSKLONNY e FOJO, 1999). O uso de concentrações clínicas relevantes (5 a 200 nM) de paclitaxel produzem bloqueio mitótico e morte celular (BLAGOSKLONNY e FOJO, 1999). Porém, baixas concentrações de paclitaxel podem provocar o aparecimento de células aneuplóides que escapam do bloqueio mitótico (CHEN e HORWITZ, 2002).

Os tratamentos 24 horas com vincristina e paclitaxel nesse trabalho provocaram o aumento de mitoses na população celular, mas as análises pela microscopia revelaram que a maioria das células estava aderida. O índice mitótico confirmou tal resultado, indicando que as células em mitose não chegavam nem a 50% da população (o maior índice encontrado foi de 39,4% na linhagem T-47D após administração de vincristina). O mesmo resultado também foi encontrado por Giannakakou *et al.* (2001) que utilizaram diferentes concentrações de paclitaxel sobre a linhagem A549 (câncer de pulmão). Segundo esses autores, o índice mitótico da linhagem após tratamento (16 horas) com 100 nM de paclitaxel provocou o aparecimento de menos do que 50% de células em mitose. Jordan e Wilson (1991) relatam que somente 3% das células BSC (células de rim de macaco verde) e somente 5% das células PtK1 (células de rim de canguru rato) estavam bloqueadas em metáfase após incubação por 100 nM de vinblastina. Em contrapartida, esses autores relatam que 90% das células HeLa estavam bloqueadas em metáfase após tratamento (20 horas) com 10 nM de vincristina (JORDAN e WILSON, 1991).

O índice mitótico das linhagens tratadas nesse trabalho indica que a maioria das células estava aderida após tratamento com as drogas. Porém, os resultados obtidos pela citometria de fluxo nos mostram que os tratamentos bloqueiam as células na fase G2/M do ciclo celular, quando possuem conteúdo 4C de DNA. A mesma situação ocorreu com os autores Giannakakou *et al.* (2001), que relatam que após administração de 100 nM de paclitaxel sobre as células A549, 100% das células estavam bloqueadas em G2/M. Como o índice mitótico desse tratamento foi menor do que 50%, os autores concluíram que somente metade das células estavam bloqueadas em mitose, enquanto que a

outra metade estava bloqueada em intérfase, com conteúdo 4N de DNA. As células em intérfase estariam bloqueadas em G2 ou estariam em uma fase parecida com G1 e seriam representadas por células multinucleadas, que saíram da mitose sem realizarem citocinese.

Essa hipótese levantada por Giannakakou *et al.*, (2001) de que as células poderiam ficar bloqueadas em G2 e em G1 com conteúdo de DNA 4N tem por base a proteína p53. Segundo os autores, o bloqueio em G1 (4N) causado por baixas concentrações de paclitaxel depende da indução de p53. Os autores, então, para verificar se p53 estaria envolvida nesse bloqueio, transfectaram células A549 com uma proteína que se liga à p53 e a marca para a degradação. Após tratamento com paclitaxel essas células não ficaram bloqueadas em G1, enquanto que células transfectadas com vetor vazio e expressão normal de p53 ficaram bloqueadas em intérfase. Células cuja expressão de p53, p21 e pRB são deficientes são capazes de bloquear o ciclo celular em mitose após danos no fuso mitótico, mas após saírem da mitose entram na intérfase e duplicam o DNA. Isso resulta na poliploidização da célula, indicando uma dependência com o “checkpoint” em G1 (LANNI e JACKS, 1998; CASENGUI *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 1999). Dessa maneira, resultados indicam que a p53 é requerida para prevenir a poliploidia (GIANNAKAKOU *et al.*, 2001; VOGEL *et al.*, 2004).

Proposta semelhante foi feita por Margolis *et al.* (2003) que propuseram um “checkpoint” tetraplóide responsável por bloquear células em G1 que se tornaram tetraplóides devido a erros na mitose (sem realizar citocinese). Para explicar a aneuploidia que acompanha a tumorigênese, os autores propõem um processo de dois passos. O primeiro passo envolve uma mitose aberrante (que não realiza citocinese ou que distribui os cromossomos desigualmente) que leva a uma célula tetraplóide ou aneuplóide. O segundo passo ocorre quando essa célula com ploidia anormal falha no mecanismo de defesa de G1, que previne o ciclo celular de células com complemento de DNA anômalo. Essa célula poderia continuar pelo ciclo celular dando origem a células aneuplóides. Esse passo seria alcançado em células deficientes em p53, resultando em uma célula com instabilidade cromossômica.

Porém, fica a pergunta: qual a natureza do sinal? Para bloquear em G1 com conteúdo 4N de DNA a célula reconhece número anormal de

cromossomos, ou de centrossomos ou dos dois? Os autores (MARGOLIS *et al.*, 2003) vão mais além ao propor que cada cromossomo (ou cromossomos específicos) contém um mecanismo de indução de sinal quando presente em número anormal. Se for um cromossomo específico, o que acontece quando a célula o perde?

O *status* da proteína p53 pode influenciar a progressão pelo ciclo celular após bloqueio mitótico causado por paclitaxel (WANG *et al.*, 2000). Mas a apoptose causada pela ação da droga parece ocorrer independentemente da p53, não havendo correlação entre expressão de p53 e sensibilidade ao paclitaxel (DEBERNARDIS *et al.*, 1997; BLAGOSKLONNY e FOJO, 1999). Nossos dados concordam com essa hipótese. No presente trabalho as células MCF7 e T-47D responderam diferentemente ao tratamento 24 horas com paclitaxel. Ambas as linhagens expressam p53, e somente as células MCF7 ficaram bloqueadas em G2/M após administração da droga.

Os tratamentos 24 e 48 horas com as drogas sobre as linhagens de mama não causaram alterações nos filamentos de tubulinas em células interfásicas. Já Torres e Horwitz (1998) encontraram alterações em células interfásicas decorrentes de tratamentos com baixas concentrações de paclitaxel. Células A549 tratadas com paclitaxel nas concentrações de 1 nM até 250 nM por 18 horas apresentaram um alinhamento dos microtúbulos e formação de feixes em células interfásicas (TORRES e HORWITZ, 1998). Células HeLa também modificam a estrutura dos microtúbulos após tratamento com paclitaxel a 10 nM, que de uma distribuição homogênea pelo citoplasma passam a se distribuírem paralelamente. Em concentrações maiores nessas mesmas células (1 μ M) há formação de grandes feixes de microtúbulos (JORDAN *et al.*, 1993). Dependendo da linhagem celular, o tratamento com paclitaxel não restringe sua ação ao fuso mitótico, provocando também alterações nos microtúbulos interfásicos. Como os microtúbulos são requeridos para outras funções como transporte intracelular e posicionamento de organelas, o tratamento atinge células que não estão proliferando, trazendo uma desvantagem ao tratamento. Nesse trabalho as células interfásicas de mama não são afetadas pelas drogas, sendo interessante saber se diferentes tipos de células respondem diferentemente ao tratamento.

Já nas células em mitose as drogas interferem na organização dos filamentos de tubulinas. Os tratamentos provocam o aparecimento de células mitóticas contendo mais de dois pólos de fusos mitóticos. Essas alterações são comumente encontradas após tratamento com venenos de fuso. Torres e Horwitz (1998) relatam que com 10 nM de paclitaxel há o aparecimento de células contendo mais de dois pólos mitóticos, mesmo resultado encontrado por Jordan *et al.* (1996). Chen e Horwitz (2002) descrevem quatro tipos de estruturas de fuso, observadas em mitoses após tratamento com vinblastina e taxol: células contendo um pólo, dois pólos, três pólos ou quatro pólos mitóticos. Jordan e Wilson (1991) vão mais além, relatando a existência de quatro tipos de pólos de fuso anormais, dependendo da desorganização dos microtúbulos. Esses tipos de pólos de fuso foram descritos em células HeLa após administração de *Vinca* alcalóides. Um dos tipos descritos pelos autores, tipo IV, foi encontrado no tratamento 24 horas nas células MCF 10A nesse trabalho. Os fusos mitóticos não se formam, havendo agregados de tubulina pelo citoplasma da célula, além de os cromossomos ficarem empacotados.

Os autores acima citados não discutem se os tratamentos com os venenos de fuso são os responsáveis pela presença anormal de centrôssomos, mas propõem que as drogas atuam sobre a morfologia dos fusos mitóticos.

Os fusos mitóticos se irradiam a partir do centrôssomo, pequenas organelas citoplasmáticas envolvidas na nucleação e organização dos microtúbulos em células interfásicas e mitóticas. Sua síntese e divisão estão intimamente relacionadas com o ciclo celular. Boveri, em sua hipótese sobre a origem dos tumores malignos, desenvolveu paradigmas sobre a biologia do centrôssomo, sugerindo que número anormal de centrôssomos causa a formação de múltiplos fusos mitóticos. Fusos mitóticos a mais na célula levariam a um risco aumentado de segregação desigual dos cromossomos, podendo contribuir com a progressão (ou iniciação) da tumorigênese (DUENSING e MUNGER, 2001).

Outra alteração encontrada foi o aumento de células contendo mais de um núcleo. Os tratamentos provocaram um aumento de células binucleadas e multinucleadas nas células, mesmo resultado encontrado por outros pesquisadores (LONG e FAIRCHILD, 1994; GISSELSSON *et al.*, 2001; SHI e KING, 2005). Postula-se que essas células são provenientes das mitoses

aberrantes contendo múltiplos fusos mitóticos, que de alguma maneira escapam do bloqueio mitótico sem realizarem citocinese, originando células tetraplóides. Essa hipótese é delineada na Figura 23, que mostra a progressão pelo ciclo celular de células tratadas com paclitaxel.

Figura 23: Modelo do efeito da droga paclitaxel sobre a progressão pelo ciclo celular. Asteriscos representam células cujo ciclo se completa sem a realização de citocinese. Adaptado de: (SHI e KING, 2005).

Além das alterações nucleares, as drogas vincristina e paclitaxel também provocam o aparecimento de células aneuplóides e células hipodiplóides, em todos os tratamentos. O tratamento que mais causou células aneuplóides foi o tratamento 48 horas com vincristina sobre as células T-47D, que apresentaram 45% da população celular com quantidade de DNA maior que 4C. Notadamente, os tratamentos 48 horas apresentaram células aneuplóides e hipodiplóides em maior quantidade. Células HeLa tratadas com 12 nM de taxol por 24 horas provocam morte celular após bloqueio em G₂/M, evidenciado pela grande quantidade de células hipodiplóides analisadas por FACS (TORRES e HORWITZ, 1998). Taxol também foi efetivo em causar aneuploidia em células A549 (10 nM por 18 horas). Mas nessas células vinblastina não causa aparecimento de população aneuplóide (CHEN, HORWITZ, 2002). Os resultados referentes ao uso dos *Vinca* alcalóides nesse trabalho diferem dos dados encontrados no presente trabalho. Vincristina é efetiva em provocar população aneuplóide em células de mama.

Paclitaxel e vincristina causam uma desorganização do fuso mitótico, impedindo-o de segregar os cromossomos na metáfase. A interação dessas drogas com os microtúbulos, em baixa concentração, afeta esse importante

passo na mitose, resultando em segregação anormal dos cromossomos e uma citocinese aberrante. A citocinese aberrante resulta em células contendo conteúdo anormal de DNA, eventualmente causando a morte celular. Exposição com baixa concentração pode retardar a progressão pela mitose, mas é insuficiente para causar bloqueio mitótico. Ou seja, venenos de fuso em diferentes concentrações induzem diferentes sinalizações intracelulares.

Diversos tipos celulares respondem de diferentes maneiras à vincristina, e saber se a célula é capaz de progredir pela citocinese ou reverter o bloqueio mitótico sem se dividir pode ser uma importante questão na atividade antiproliferativa dos venenos de fuso.

6 CONCLUSÃO

Baixa concentração de vincristina causa o aparecimento de população aneuplóide nas células das linhagens de mama humana. Também causou a morte celular das linhagens tumorais, população celular representada pelas células hipodiplóides.

Baixa concentração de paclitaxel foi efetivo em provocar aneuploidia em todas as linhagens, notadamente na linhagem T-47D. Também provocou morte celular nas células analisadas.

Provavelmente essas células aneuplóides surgem a partir de mitoses aberrantes que segregam desigualmente os cromossomos para as células filhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRIEU, A.; KAHANA, J. A.; WOOD, K. W.; CLEVELAND, D. W. CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint *in vitro*. **Cell**, v. 102, p. 817-826, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

AUER, G.; ERIKSSON, E.; AZAVEDO, E.; CASPERSSON, T.; WALLGREN, A. Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinomas in humans. **Cancer Res.**, v. 44, p. 394-396, 1984.

BABU, J. R.; JEGANATHAN, K. B.; BAKER, D. J.; WU, X.; KANG-DECKER, N.; VAN DEURSEN, J. M. Rae 1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. **J. Cell Biol.**, v. 160, p. 341-353, 2003.

BLAGOSKLONNY, M. V.; FOJO, T.; Molecular effects of paclitaxel: myths and reality (a critical review). **Int. J. Cancer**, v. 83, p. 151-156, 1999.

CASENGUI, M.; MANGIACASALE, R.; TUYNDER, M.; CAILLET-FAUQUET, P.; ELHAJOUJI, A.; LAVIA, P.; MOUSSET, S.; KIRSCH-VOLDERS, M.; CUNDARI, E. p53-independent apoptosis and p53-dependent block of DNA rereplication following mitotic spindle inhibition in human cells. **Exp. Cell Res.**, v. 250, n. 2, p. 339-350, 1999.

CIMINI, D.; DEGRASSI, F.; Aneuploidy: a matter of bad connections. **Trends Cell Biol.**, v. 15, p. 442-451, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; Plants as a source of anti-cancer agents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 72-79, 2005.

DAI, W.; WANG, Q.; LIU, T.; SWAMY, M.; FANG, Y.; XIE, S.; MAHMOOD, R.; YANG, Y. M.; XU, M. RAO, C. V. Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. **Cancer Res.**, v. 64, p. 440-445, 2004.

DEBERNARDIS, D.; SIRE, E. G.; DE FEUDIS, P.; VIKHANSKAYA, F.; VALENTI, M.; RUSSO, P.; PARODI, S.; D'INCALCI, M.; BROGGINI, M. p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. **Cancer Res.**, v. 57, p. 870-874, 1997.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, p. 256-268, 2003.

DUENSING, S.; MUNGER, K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1471, p. M81-M88, 2001.

DUESBERG, P.; LI, R.; FABARIUS, A.; HEHLMANN, R. The chromosomal basis of cancer. **Cell. Oncol.**, v. 27, p. 293-318, 2005.

ERHARDT, K.; SILTVERSWARD, C.; AUER, G. Nuclear DNA content and nuclear atypia. Relation to survival in patients with breast adenocarcinoma and serous ovarian tumors. **Anticancer Res.**, v. 9, p. 1325-1330, 1989.

GISSELSSON, D.; BJORK, J.; HOGLUND, M.; MERTENS, F.; CIN, P. D.; AKERMAN, M.; MANDAH, N. Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 199-205, 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HOYT, M. A.; TOTIS, L.; ROBERTS, B. T. *S. Cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. **Cell**, v. 66, p. 507-517, 1991.

HUIZING, M. T.; KEUNG, A. C. F.; ROSING, H.; VAN DER KUIJ, V.; TEN BOKKEL HUININK, W. W.; MANDJES, I. M.; DUBBELMAN, A. C.; PINEDO, H. M.; BEIJNEN, J. H. Pharmacokinetics of paclitaxel and metabolites in a randomized comparative study in platinum-pretreated ovarian cancer patients. **J. Clin. Oncol.**, v. 11, p. 2127-2135, 1993.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Incidência de câncer no Brasil.

Disponível em:

http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5/

Acesso em 20 jun. 2008.

JACKSON, J. R.; PATRICK, D. R.; DAR, M. M.; HUANG, P. S. Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulina agents? **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 107-117, 2007.

JORDAN, M. A.; THROWER, D.; WILSON, L.; Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. **J. Cell Sci.**, v. 102, p. 401-416, 1992.

JORDAN, M. A.; TOSO, R. J.; THROWER, D.; WILSON, L.; Mechanisms of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentrations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 9552-9556, 1993.

KEEN, N.; TAYLOR, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. **Nat. Rev. Cancer**, v.4, p. 927-936, 2004.

KOPS, G. J. P. L.; FOLTZ, D. R.; CLEVELAND, D. W. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, p. 8699-8704, 2004.

KOPS, G. J. P. L.; WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 773-785, 2005.

LANNI, J S; JACKS, T. Characterization of the p53-dependent post mitotic checkpoint following spindle disruption. **Mol. Cell. Biol.**, 18, 1055-1064, 1998.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.; VOGELSTEIN, B. Genetic instability in colorectal cancers. **Nature**, v. 386, p. 623-627, 1997.

LI, R.; MURRAY, A. W.; Feedback control of mitosis in budding yeast. **Cell**, v. 66, p. 519-531, 1991.

LOEB, L. A.; A mutator phenotype in cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3230-3239, 2001.

LONG, B. H.; FAIRCHILD, C. R.; Paclitaxel Inhibits Progression of Mitotic Cells to G1 Phase by Interference with Spindle Formation without Affecting Other Microtubule Functions during Anaphase and Telephase. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4355-4361, 1994.

MACHADO-SANTELLI, G. M.; MORI, L.; PEREIRA, C. A. B.; Prediction of relapse in patients with breast cancer by DNA cytometry. **Anal. Cell. Pathol.**, v. 7, p. 321-334, 1994.

MICHEL, L. S.; LIBERAL, V.; CHATTERJEE, A.; KIRCHWEGGER, R.; PASCHE, B.; GERALD, W.; DOBLES, M.; SORGER, P. K.; MURTY, V. V.; BENEZRA, R. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. **Nat. Rev. Cancer**, v. 409, p. 355-359, 2001.

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

MUSACCHIO, A.; SALMON, E. D.; The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 379-391, 2007.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, p. 23-28, 1976.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 1, p. 364-369, 2001.

STEWART, Z A.; LEACH, S.D.; PIETENPOL, J.A.; **Mol. Cell. Biol.** 19, 205-215, 1999.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN, D.; From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 45-54, 2004.

SUDO, T.; NITTA, M.; SAYA, H.; UENO, N. T.; Dependence of paclitaxel sensitivity on a function spindle assembly checkpoint. **Cancer Res.**, v. 64, p. 2502-2508, 2004.

TAO, W.; SOUTH, V. J.; ZHANG, Y.; DAVIDE, J. P.; FARRELL, L. KOHL, N. E.; SEPP-LORENZINO, L.; LOBELL, R. B. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. **Cancer Cell**, v.8, p. 49-59, 2005.

CLASSIFICAÇÃO DE TUMORES MALIGNOS (TNM), 6. ed, 2004.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (UICC)

Disponível em:

<<http://www.uicc.org/index.php>>

Acesso em 20 jun. 2008.

VOGEL, C.; KIENITZ, A.; HOFMANN, I.; MULLER, R.; BASTIANS, H. Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. **Oncogene**, v. 23, p. 6845-6853, 2004.

WANG, T. Z.; WANG, H. S.; SOONG, Y. K.; Paclitaxel-induced cell death. **Cancer**, v. 88, n. 11, p. 2619-2628, 2000.

WEAVER, B. A.; BONDAY, Z. Q.; PUTKEY, F. R.; KOPS, G. J. P. L.; SILK, A. D.; CLEVELAND, D. W. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. **J. Cell Biol.**, v. 162, p. 551-563, 2003.

WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D. W. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: the mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. **Cancer Cell**, v. 8, p. 7-12, 2005.