Renata Manelli-Oliveira

**CITOESQUELETO E ALTERAÇÕES NUCLEARES
EM CÉLULAS TUMORAIS: UMA ABORDAGEM
TRIDIMENSIONAL AO MICROSCÓPIO
CONFOCAL**

Disseratação apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências/Biologia
Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli

São Paulo
2000

Renata Manelli Oliveira

Citoesqueleto e alterações nucleares em células tumorais:
uma abordagem tridimensional ao microscópio confocal.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
mestre em Ciências/Biologia Celular e
Tecidual.

São Paulo
2000

Idéias não podem ser possuídas
Elas pertencem a quem quer
que as compreenda.

Sol Le Witt

Aos meus familiares, em
especial aos meus pais
Sérgio e Leda,
minha irmã Karina e
meus avós Nelson, Zéza,
Véssio e Therezinha.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Machado-Santelli, pela orientação, apoio e confiança no decorrer deste trabalho;

Aos Professores Júlio Boschini Filho e Lenita Crespo R.F. Sampaio, pelo incentivo inicial e por acreditarem no meu trabalho;

À Marisa Ionta pela constante ajuda no trabalho e amizade;

À Danilo e Marisa Prado pelas caronas nos momentos de urgência e pelo constante apoio;

Aos amigos do Laboratório, Egle, Adriana, Marta, Adriana Patrícia e Elly, pelo convívio dia-a-dia e pela amizade;

À Roberto Cabado, pelo constante apoio técnico e auxílio com a parte gráfica deste trabalho;

Aos meus amigos, em especial ao meu namorado Luciano Bonatti Regalado, pela amizade e incentivo para a realização desse trabalho;

À Cintia Bavaresco, pelo incentivo e amizade nesses anos;

À Edson Rocha de Oliveira, pelo cuidado e atenção na revelação da fotomicrografias;

Às secretárias do Departamento, pela constante atenção fornecida durante o curso de pós-graduação;

Às bibliotecárias do Instituto, por terem sido tão solícitas nas suas funções;

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro;

À CAPES, pela bolsa de Mestrado concedida para a realização deste trabalho e;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, um MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Células em cultura	17
3.2. Curva de crescimento	18
3.3. Imunofluorescência	18
3.4. Análise ao microscópio confocal	19
3.5. Preparações citológicas de células da mucosa oral	21
3.6. Materiais	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Caracterização das linhagens celulares	23
4.2. Citoesqueleto	23
4.2.1. Filamentos de actina	24
4.2.2. Microtúbulos	25
4.2.3. Filamentos de vimentina	26
4.2.4. Filamentos de citoqueratina-8	27
4.2.5. Filamentos de lamina B	27
4.3. Alterações nucleares	28
4.4. Alterações nucleares e padrão de distribuição dos filamentos do citoesqueleto	30
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Interface do software “Zeiss LSM 510”.

FIGURA 2 – Interface dos módulos de galeria, “split” e projeção ortogonal.

FIGURA 3 – Interface dos módulos “Profile” e “Pseudo 3D”.

FIGURA 4 – Interface do módulo “Projection”.

FIGURA 5 – Interface do software “3D for Zeiss LSM 510”.

FIGURA 6 – Interface do software “Imaris” (Bitplane).

FIGURA 7 – Reconstrução 3D de uma célula HK2 em mitose vista em diferentes ângulos.

FIGURA 8 – Esquema do padrão de classificação de alterações nucleares estabelecido por TOLBERT et al. (1992).

FIGURA 9 – Fotomicrografia das linhagens celulares HK2 e A549.

FIGURA 10 – Curva de crescimento da linhagem HK2.

FIGURA 11 – Imagens de filamentos de actina em células HK2.

FIGURA 12 – Imagens de filamentos de actina em células HK2, BRL3A e A549.

FIGURA 13 – Imagens de filamentos de tubulina em células BRL3A e A549.

FIGURA 14 – Imagens de filamentos de tubulina em células HK2.

FIGURA 15 – Imagens de filamentos de tubulina em células HK2 em mitose.

FIGURA 16 – Imagens de filamentos de vimentina em células HK3, A549 e BRL3A.

FIGURA 17 – Imagens de filamentos de citoqueratian-8 em células HK2 e A549.

FIGURA 18 – Imagens de filamentos de lamina B em células HK2, A549 e BRL3A.

FIGURA 19 – Imagens de núcleos de células HK2.

FIGURA 20 - Imagens de núcleos de células HK2.

FIGURA 21 – Imagens de núcleos de células de mucosa oral.

FIGURA 22 - Imagens de núcleos de células de mucosa oral.

FIGURA 23 – Fotomicrografia de núcleos de células de mucosa oral.

FIGURA 24 – Imagens de células HK2 e A549 onde observa-se micronúcleos e padrão dos filamentos do citoesqueleto.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sumário dos dados de citoesqueleto28

TABELA 2 – Frequência de alterações nucleares nos tipos celulares estudados.....30

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

3D	tridimensional
aa	aminoácidos
ATCC	American Tissue Culture Collection
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMs	double minutes
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FI.....	Filamentos intermediários
FITC	fluoresceína
IgG	imunoglobulina G
LAPs	polipeptídeos associados à lamina
LBR	proteína receptora de lamina B
LSM	Laser Scanning Microscope
MCVL.....	Microscópio confocal de varredura a laser
MTOC	centro organizador de microtúbulos
NLS	sinal de localização nuclear
PBSA	salina tamponada com fosfatos
RGB.....	red, green, blue
RNA	ácido ribonucleico
SFB	soro fetal bovino
TRITC	rodamina

RESUMO

O mecanismo de formação e origem das alterações nucleares ainda é pouco conhecido, sendo o micronúcleo a mais estudada. As células tumorais geralmente apresentam vários tipos de alterações nucleares que estariam associadas à instabilidade genética. O objetivo deste trabalho foi analisar as possíveis associações entre alterações nucleares e citoesqueleto em células HK2 e A549, derivadas de carcinoma de pulmão humano. Otimizamos a metodologia de uso do MCVL para redefinir as alterações nucleares e caracterizar os principais filamentos do citoesqueleto em preparações coradas por Feulgen ou imunofluorescência. As células da linhagem HK2 apresentaram fibras de actina dispostas concentricamente e em “clusters” e os filamentos de tubulina apareceram de forma radial, enquanto que o padrão de distribuição em A549 foi mais semelhante ao das células normais (BRL3A). Os filamentos de lamina B foram os mais importantes para evidenciar as alterações nucleares, porém essas alterações não puderam ser relacionadas com alterações do citoesqueleto.

1. INTRODUÇÃO

A célula eucariônica possui muitos tipos de moléculas protéicas que se organizam em complexos funcionais de diferentes níveis, entre eles está o citoesqueleto, que possui milhares de monômeros idênticos, polimerizados em filamentos lineares. Esse citoesqueleto possui várias funções: é responsável por conectar complexos protéicos e organelas, pelo posicionamento das organelas, servem como via de transporte entre as estruturas intracelulares, proporcionam um suporte mecânico que sustenta a célula, é responsável pela movimentação da célula e um componente importante da divisão celular.

O citoesqueleto era visto como uma estrutura predominantemente estática que era responsável apenas pelo suporte estrutural da célula. Agora com o desenvolvimento de novas metodologias muitos trabalhos já estão sendo realizados para se tentar elucidar as funções do citoesqueleto. Recentes descobertas revelam que os componentes do citoesqueleto são estruturas dinâmicas que têm capacidade de se ligar umas as outras .

O citoesqueleto possui três tipos principais de filamentos: microtúbulos, que apresentam diâmetro aproximado de 20 nm; filamentos intermediários, com diâmetros entre 8 e 12 nm e filamentos de actina ou microfilamentos com 6 nm de diâmetro. Esses filamentos consistem de um mesmo polímero helicoidal com arranjos e funções diferentes que dependem de proteínas acessórias que ligam os filamentos entre si e a outros componentes. Os filamentos intermediários (FI) exibem especificidade de expressão nos diferentes tipos celulares.

Os filamentos intermediários são os principais componentes do citoesqueleto e da lâmina nuclear da maioria das células eucariônicas. Eles são formados por um grupo heterogêneo de proteínas fibrosas e alongadas que se dispõem ao longo do citoplasma ou como uma estrutura compactamente entrelaçada abaixo do envoltório nuclear (ALBERS & FUCHS, 1992; HEINS & AEBI, 1994). As moléculas dos filamentos intermediários possuem uma cabeça aminoterminal, uma cauda carboxiterminal e um domínio central em forma de bastão, que as caracterizam. Esse domínio em bastão consiste de uma região α -hélice contendo repetições em tandem de uma sequência de 7 aminoácidos (aa) diferentes formando a repetição-hepta (ALBERS & FUCHS, 1992; HEINS & AEBI, 1994). Os monômeros se pareiam e os domínios centrais se enrolam em uma estrutura torcida formando um dímero. Dois dímeros se associam de maneira antiparalela formando um tetrâmero não polarizado. Os tetrâmeros se ligam uns aos outros formando os filamentos. Nos 10 nm finais dos filamentos os tetrâmeros são mantidos unidos por um enrolamento helicoidal (ALBERS & FUCHS, 1992; HEINS & AEBI, 1994).

Alguns trabalhos têm estudado o papel do domínio central em bastão e da cauda do filamento de vimentina e têm verificado que, a cauda é um domínio crítico para a formação da rede de FI “in vivo” (McCORMICK et al., 1993; HEINS & AEBI, 1994) e medeiam interações entre a vimentina e os microfilamentos (CARY et al., 1994).

Os filamentos intermediários citoplasmáticos são divididos em 6 grupos: queratinas tipos I, queratinas tipo II, vimentina, proteína glial fibrilar ácida, desmina e os neurofilamentos. Já os filamentos nucleares

compreendem as laminas, sendo que as principais são as laminas tipo A, B e C ([ALBERS & FUCHS, 1992](#)).

As queratinas constituem uma ampla classe de filamentos intermediários, são divididas em tipo I (ácidas) com 12 sub-tipos e tipo II (básicas/neutras) com 8 sub-tipos. Elas diferem dos demais FI por serem heteropolímeros compostos dos diferentes sub-tipos, os quais são classificados de acordo com o peso molecular. Sua expressão é regulada durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação celular ([ALBERS & FUCHS, 1992](#)).

Diferente do que acontece com a vimentina, o “knockout” da queratina tem um efeito danoso, em K8 null-mouse leva a um fenótipo embrionário letal. Esses estudos com “knockouts” sugerem que a queratina em ratos e humanos é crucial para manter a integridade e conexões requeridas para os vários tecidos epiteliais ([HOUSEWEART & CLEVELAND, 1998](#); [KLYMKOWSKY, 1995](#)).

A vimentina é geralmente encontrada em células de origem mesenquimal, tais como fibroblastos, e sua função ainda não é clara. A sua expressão tem sido relacionada com a morfologia nuclear, localização da membrana nuclear durante a mitose, etc. Num estudo em células SW-13, [SARRIA et al. \(1994\)](#) analisaram o efeito da presença de filamentos de vimentina na morfologia nuclear e observaram que na ausência desses filamentos o núcleo apresenta invaginações. Alterações no citoplasma não foram verificadas, indicando que a organização dos FI não parece ser determinante na organização citoplasmática e de outros componentes do citoesqueleto mas demonstra um efeito na morfologia nuclear. Esses

resultados também indicam que não somente a expressão, mas também a organização da vimentina expressa é um importante fator, já que ao transfectar vimentina mutante nas células essas apresentaram diferente organização da vimentina e invaginações nucleares ([SARRIA et al., 1994](#)).

[CHU et al. \(1993\)](#) estudaram a habilidade migratória da célula num sistema “in vitro” de penetração em filtros de policarbonato. Essa habilidade foi relacionada com a expressão de queratinas adicionais (8 e 18) em células “mouse-L” que expressam vimentina, sugerindo que as células que coexpressam vimentina e queratinas apresentam uma modificação morfológica, passando a ter maior capacidade invasiva e de motilidade. Essa coexpressão de FI tem sido encontrada em células tumorais e relacionada com o potencial metastático.

A indução da expressão de vimentina em células de hepatócitos de rato neonatal, que normalmente expressam queratina, indica que a vimentina interferiu no contato célula-célula, uma vez que estas apresentaram morfologia migratória ([PAGAN et al., 1996](#)).

O envoltório nuclear é uma estrutura formada por dupla membrana: interna e externa. A membrana nuclear externa é contínua com o retículo endoplasmático granular e contém ribossomos aderidos à sua face externa. Já a membrana nuclear interna possui proteínas específicas que se ligam à lâmina nuclear ([GERACE, 1988](#); [DINGWALL & LASKEY 1992](#); [YE & WORMAN, 1994](#); [ROLLS et al., 1999](#)). O espaço entre as duas membranas é chamado perinuclear, sendo contínuo com o lúmen do retículo endoplasmático granular. O tráfego entre o citosol e o núcleo ocorre através dos poros (complexo nuclear do poro), cada complexo possui variedade de

proteínas que se organizam de forma octogonal (GERACE, 1988; DINGWALL & LASKEY, 1992).

As laminas são os principais componentes da lâmina nuclear e tem como funções a manutenção da integridade do envoltório nuclear, a ancoragem da cromatina durante a intérfase e ajuda na remontagem da membrana nuclear depois da mitose (HOUSEWEART & CLEVELAND, 1998; SULLIVAN et al., 1999). Os principais tipos de laminas são as A, B e C, sendo que as laminas A e C são formas resultantes de processamento alternativo do mRNA codificado por um mesmo gene (GEORGATOS et al., 1994).

As laminas diferem dos filamentos intermediários citoplasmáticos quanto a estrutura da molécula: apresentam $\cong$ 352 aa no domínio central, sinal de localização nuclear (NLS) na cauda e um motivo CAAX no sítio carboxiterminal (HEINS & AEBI, 1994; GEORGATOS et al., 1994; MICAL & MONTEIRO, 1998). As três seqüências lamina específicas agem, possivelmente, em combinação para garantir a montagem correta, espacial e temporal, das laminas B. Uma dessas seqüências pode ser abolida sem maiores comprometimentos no endereçamento da proteína, mas se duas ou mais são deletadas há um grande comprometimento (MICAL & MONTEIRO, 1998).

Para entender melhor a função das laminas os pesquisadores estão estudando os novos tipos descobertos e identificando seus componentes, assim como proteínas acessórias. Alguns novos tipos de laminas já foram caracterizados, como é o caso da DMO e pG-IF de *Drosophila melanogaster*

e CeLam-1 de *Caenorhabditis elegans* em invertebrados e a lamina B3 de espermátócito de rato ([GEORGATOS et al., 1994](#)).

Durante a intérfase as laminas interagem com a cromatina e a membrana nuclear interna, sendo substratos de numerosas proteínas kinases que fosforilam a lâmina nuclear e modulam o transporte das laminas e sua montagem durante a intérfase. Alguns estudos também observaram que as laminas A e B podem se associar com os nucleossomos, porém os detalhes dessa associação devem ser melhor examinados ([GEORGATOS et al., 1994](#)).

Existem vários tipos de proteínas de ligação associadas as laminas, como é o caso da proteína receptora de lamina B (LBR ou p58) e dos polipeptídeos associados a lamina (LAPs), que são proteínas responsáveis por ligar as laminas à membrana nuclear interna ([GEORGATOS et al., 1994](#); [YE & WORMAN, 1994](#)). Durante a mitose a lamina A é completamente desmontada e dissociada do envoltório nuclear, enquanto a lamina B permanece associada com estruturas membranosas. A lamina B se dissocia do envoltório nuclear em vesículas carregando a proteína p58 que é remontada no final da mitose ([GEORGATOS et al., 1994](#)). Estudos dessas vesículas em células de ovário de hamster chinês (CHO) indicam que pode haver uma associação entre as vesículas e os filamentos de vimentina e isso ocorreria por um mecanismo dependente de fosforilação. Essas vesículas membranosas foram encontradas em colocalização com filamentos de vimentina em células CHO, especialmente em áreas onde as fibras estavam dispersas e bem discerníveis ([MAISON et al., 1993](#); [CHOU et al., 1997](#)).

Estudos indicam que a lamina A está envolvida na regulação da diferenciação terminal, pois células cuja lamina A foi abolida apresentaram fenótipos patológicos que são manifestados primeiramente na forma de distrofia muscular, em consequência a perturbações no envoltório nuclear ([SULLIVAN et al., 1999](#)).

O envoltório nuclear de células mitóticas passa por uma série de mudanças estruturais que alteram sua morfologia. A quebra desse envoltório nuclear envolve a despolimerização das lamina e uma deformação causada pelos microtúbulos ([GEORGATOS et. al, 1997](#)). As invaginações vistas no começo da mitose são causadas pelo crescimento dos microtúbulos e posição dos ásteres, sendo que a lamina B acompanha o formato dessas invaginações. O desarranjo da lamina A ocorre nas primeiras fases da prófase, já o da lamina B em fases mais tardias. Em células tratadas com nocodazol, os microtúbulos são destruídos levando ao desarranjo da lamina B, que ocorre sem as invaginações vistas normalmente, sendo observado um desarranjo homogêneo. Esses dados indicam que a deformação do envoltório nuclear ocorre pelo crescimento dos microtúbulos, mas a lâmina nuclear pode se fragmentar na ausência deles ([GEORGATOS et. al, 1997](#)).

Durante a apoptose a membrana nuclear interna se fragmenta e a lamina B é destruída por proteólise em seus estágios tardios, embora a dispersão da membrana possa ser subsequente a da lamina B. Isso causa uma alteração na morfologia nuclear, onde a cromatina aparece condensada e a lamina B e a membrana nuclear dispersas ([DUBAND-GOULET et al., 1998](#)).

Os microtúbulos são formados por sub-unidades protéicas de tubulinas, que formam uma estrutura tubular longa com um diâmetro de aproximadamente 25 nm. As proteínas são arranjadas longitudinalmente em estruturas denominadas protofilamentos, sendo cada um deles formado pela repetição de α -tubulina e β -tubulina globular (SULLIVAN, 1988). Todos os protofilamentos do microtúbulo são polarizados, fazendo com que o polímero apresente uma extremidade “plus” e outra “minus”. As extremidades “plus” crescem livres por adição de tubulina e as “minus” ficam imersas no centrôssomo, conferindo dinâmica à estrutura. A γ -tubulina é uma sub-unidade que não faz parte do filamento do microtúbulo, ela é apenas encontrada no citoplasma e no centrôssomo. Outros tipos de tubulinas têm sido descobertos, tais como a Tub4 em levedura e a Uni3 em *Chlamydomonas* (SCHIEBEL, 2000).

Dentre as funções dos microtúbulos podemos citar: suporte estrutural e ajuda no posicionamento das organelas, movimentação de organelas e materiais dentro da célula, motilidade de cílios e flagelos, participação ativa no processo de divisão celular, dentre outros. O transporte de membranas, proteínas, lipídios, etc. entre as organelas ocorre ao longo dos microtúbulos. Esse tráfego é mediado por proteínas acessórias, tais como a cinesina e a dineína (COLE & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 1995; HIROKAWA, 1996). Durante a divisão celular os microtúbulos e proteínas associadas formam o fuso mitótico, que é uma estrutura dinâmica que se liga ao cinetocoro dos cromossomos e promove os movimentos nas diferentes fases. (COMPTON, 1998; CASSIMERIS, 1999).

Os filamentos de actina ou microfilamentos são formados por sub-unidades globulares da proteína actina (actina G) que se arranjam na mesma direção em 2 cadeias entrelaçadas, como uma hélice, formando um filamento polar (actina F) de aproximadamente 8 nm. Existe um equilíbrio entre as actinas G e F, sendo a montagem e dinâmica da actina F parecida com a que ocorre nos microtúbulos.

A actina está relacionada com a morfologia e locomoção celular, contração muscular, interações célula-célula e célula-matriz extracelular e citocinese. Estudos revelam que a organização da actina pode ser modulada por interações extracelulares e pela atividade dos microtúbulos. [WALERMAN-STORER & SALMON \(1999\)](#), em recente revisão, propõem a interação entre os filamentos de actina e microtúbulos em lamelipódios durante a motilidade celular.

Os microtúbulos e os filamentos de actina têm sido amplamente estudados como alvos de drogas anti-tumorais. As drogas que agem nos microtúbulos, inibindo a polimerização (colchicina e alcalóides vinca) ou aumentando a massa dos polímeros e os estabilizando (taxol e outros), afetam a proliferação celular e podem induzir a apoptose. A proliferação celular tem sido estudada usando-se drogas que afetam a polimerização e dinâmica dos filamentos de actina, indicando que algumas drogas afetam a proliferação de células transformadas e não agem sobre as células normais. ([JORDAN & WILSON, 1998](#)).

Algumas moléculas da matriz extracelular interagem com o citoesqueleto, como é o caso das caderinas e integrinas. Elas interagem com os filamentos de actina e com os FI através dos desmossomos e

hemidesmosomos, respectivamente. A ligação do citoesqueleto às integrinas transmite força à célula e a torna capaz de realizar movimentos (BURRIDGE, 1988; GEIGER, 1992; SCHOENWAEELDER & BURRIDGE, 1999; VUORI & RUOSLAHTI, 1999).

Todas as estruturas mencionadas (filamentos intermediários, filamentos de actina, microtúbulos, envoltório nuclear e matriz extracelular) podem interferir, direta ou indiretamente, na morfologia nuclear e causar alterações.

Em recente artigo sobre a estrutura nuclear, COOK (1998) diz que "num tempo em que logo saberemos a exata sequência de bilhões de bases no genoma humano, não sabemos quase nada sobre como estas bases se organizam no espaço tridimensional e como a estrutura resultante facilita a função gênica". Do mesmo modo, embora anomalias nucleares, tais como micronúcleos, tenham sido amplamente utilizadas na avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos e no biomonitoramento de indivíduos expostos ocupacionalmente, outras alterações descritas por TOLBERT et al. (1992) tem seu significado biológico pouco conhecido.

O teste do micronúcleo é uma análise simples baseada na observação e contagem de "pequenos núcleos" em populações de células que estejam se dividindo ativamente. A frequência de micronúcleos representa um índice composto de aberrações cromossômicas em uma determinada população celular (OLIVEIRA & MACHADO-SANTELLI, 1987). Os micronúcleos são estruturas constituídas por material cromatínico contido por um envoltório nuclear e menores que o núcleo principal, que quando observados em células somáticas interfásicas, são indicativos de quebras

cromossômicas, distúrbios do fuso mitótico ou alterações cromossômicas estruturais que afetam a região centromérica. A formação do micronúcleo ocorre durante o processo de mitose.

Além dos micronúcleos, outros tipos de alterações nucleares têm sido observadas nos diferentes sistemas celulares utilizados para a análise da avaliação do potencial genotóxico de agentes químicos. [TOLBERT et al.\(1992\)](#) propuseram classificá-las nas células de mucosa oral em: (1) **binucleadas**, ou a presença de dois núcleos dentro de uma célula; (2) **“broken eggs”**, ou núcleos que aparecem estragulados com uma banda Feulgen-negativa; (3) **picnose**, núcleo pequeno com cromatina picnótica; (4) **cromatina condensada**, na qual a cromatina nuclear aparece agregada; (5) **cariorrexis**, ou desintegração nuclear envolvendo perda de integridade do núcleo, e (6) **cariólise**, ou dissolução nuclear, na qual permanece uma imagem negativa do núcleo. Esta classificação tem sido utilizada sem um questionamento maior e sabe-se que algumas dessas figuras estão relacionadas com o processo de morte celular, mais especificamente com a apoptose. Entretanto para sua re-interpretação é importante a realização de estudos morfológicos mais detalhados. De modo geral, classifica-se “cromatina condensada” e “cariorrexis” como figuras associadas a apoptose e isto pode estar, por vezes, incorreto. Morfologias ou padrões nucleares semelhantes ao microscópio de luz podem na verdade estar relacionados a processos celulares diferentes. Em consequência destas dificuldades, os trabalhos geralmente fogem a interpretação de alterações nucleares que não micronúcleos ([BROOKS et al., 1990](#); [MERETO et al.,1994](#); [TITENKO-](#)

HOLLAND et al., 1994; CERQUEIRA et al., 1998; TORRES-BUGARÍN et al., 1998; dentre outros).

ROBERTS (1997), estudando a incidência de células anormais na mucosa oral de “snuff users”, mostrou que o uso do tabaco está associado ao aumento da frequência de micronúcleos. A análise de outras alterações nucleares, dentre as quais “broken egg”, não apresentou a mesma associação. “Broken egg” seria portanto um fenômeno interessante, mas ainda de significado pouco claro.

Alguns autores sugerem que as células binucleadas se originam como resultado de um processo incompleto de divisão celular ou resultam de uma divisão mitótica de uma célula binucleada pré-existente. O significado do aparecimento dessa estrutura ainda não é bem claro, mas sugere-se que pode ser um possível mecanismo compensatório para manter o balanço genético em certa população ou é um estado transicional para a poliploidia. Vários autores têm sugerido que em muitos tipos celulares de mamíferos, o primeiro passo para altos níveis de ploidia é as células se tornarem binucleadas e isso poderia ter um importante papel na transformação maligna (RODILLA, 1993).

As diferenças morfológicas nucleares entre células normais e malignas são tão marcantes que são utilizadas no diagnóstico do câncer. Entretanto, não se conhece ainda a base molecular para estas diferenças estruturais, visíveis ao microscópio de luz, e nem sua correspondência ao estado funcional da célula. Na tentativa de entender estas diferenças, alguns trabalhos enfocaram a relação entre ativação gênica e a organização da cromatina. KRYSTOSEK (1998) estudou o papel da dinâmica nucleolar

no reposicionamento dos cromossomos interfásicos em células em cultura. Concluiu que regiões cromossômicas, ou cromossomos inteiros, ocupam diferentes localizações espaciais no núcleo dependendo da fase de crescimento celular. O nucléolo participaria deste processo de modo mais amplo do que o esperado para envolvimento apenas dos cromossomos que o codificam. Os centrômeros também assumem diferentes posições intranucleares em resposta a modificações funcionais em células de *Xenopus* (JANEVSKI et al., 1995).

O estudo da associação entre aberrações nucleares e alterações do DNA com o processo de transformação em diferentes tipos celulares “in vitro” mostraram que as células fibroblásticas e epiteliais apresentam sensibilidade diferente à colchicina. Importante foi também a demonstração de que a interpretação dos dados de micronúcleos em células em cultura deve ser feita paralelamente a análise dos parâmetros que definem o ciclo da célula utilizada (LOTFI & MACHADO-SANTELLI, 1996).

Células de mucosa oral de indivíduos que manipulam drogas anti-neoplásicas, portanto ocupacionalmente expostos a mutagênicos, apresentaram freqüências de micronúcleos significativamente mais altas do que as dos controles (MACHADO-SANTELLI et al., 1994).

A análise de micronúcleos em células esfoliadas de colo de útero mostrou associação das freqüências mais altas com condições consideradas de alto risco para o desenvolvimento de câncer (CERQUEIRA et al., 1998).

Estudando a freqüência de micronúcleos em “engolidores de fogo” TORRES-BUGARÍN et al. (1998), apesar de não obterem evidências da genotoxicidade do diesel, mostraram existir diferenças entre os grupos

controle e expostos e que houve um aumento na frequência de alterações nucleares quando associadas ao fumo.

Inúmeros foram, portanto, os dados publicados utilizando este tipo de abordagem e é incontestável sua contribuição para o conhecimento do potencial genotóxico de uma grande variedade de agentes. Entretanto não tem havido uma preocupação maior com a causa ou mecanismo de origem do micronúcleo, assim como não foi ainda estabelecida a correlação direta do micronúcleo com o processo de transformação celular, aspecto relevante, principalmente quando se propõe a análise de células alvo específicas, como as células epiteliais, responsáveis pela maioria dos tumores malignos humanos e animais. É importante ainda a análise de alterações nucleares que ocorrem em células tumorais para a elucidação do processo de aneuploidização.

[RUSSO et al. \(1996\)](#), sugerem que a não-disjunção das cromátides é o maior mecanismo de aneuploidia em esplenócitos de ratos, já que micronúcleos com 1 marcação para centrômero e 4 para telômero foram os tipos mais comuns nas culturas estudadas. Seus dados indicam que seqüências teloméricas, junto com seqüências centroméricas, podem ser consideradas marcadores moleculares úteis para distinguir micronúcleos originados depois de mal-segregação cromossômica comparados com aqueles derivados de quebras cromossômicas. Outros pesquisadores estudaram a frequência de centrômero em micronúcleos em células de mucosa oral e urotelial humana e, encontraram que a frequência de micronúcleos centrômero-positivos foi de 56% e 57%, respectivamente, indicando uma perda cromossômica ([TITENKO-HOLLAND et al., 1994](#)). Os

estudos da frequência de centrômero em micronúcleos podem ser utilizados como indicadores de efeitos clastogênicos ou aneugênicos ([TITENKO-HOLLAND et al., 1994](#); [KRISHNA et al., 1995](#)).

[SHIMIZU et al. \(1998\)](#) propõem um novo mecanismo de micronucleação que envolve a formação de projeções nucleares durante a fase S que se associam seletivamente com “double minutes” (DMs). Os DMs são fragmentos de DNA acêntricos com seqüências gênicas amplificadas. Acredita-se que o processo de formação de DMs esteja associado à eliminação de oncogenes amplificados de células cancerosas humanas e isso seria importante num tratamento anti-câncer, já que drogas que aumentam o brotamento afetam o processo de micronucleação e aberrações citogenéticas (DMs) são restritas às células cancerosas ([SHIMIZU et al., 1996](#), [SHIMIZU et al., 1998](#)).

2. OBJETIVOS

Nosso trabalho teve por objetivo analisar as possíveis associações entre alterações nucleares e citoesqueleto. Para isto, propusemo-nos a:

- Otimizar a metodologia de uso do microscópio confocal para análise do citoesqueleto e de alterações nucleares;
- Redefinir as alterações nucleares com base nas reconstruções de superfície e volume, obtidas a partir das imagens ao microscópio confocal;
- Caracterizar os principais filamentos do citoesqueleto das linhagens tumorais HK2 e A549.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células em cultura

A linhagem celular HK2 foi derivada de uma massa tumoral, crescida em ratos “nude” atímicos, a partir de inóculo de células HK1 (carcinoma de células grandes de pulmão) que são de uma linhagem estabelecida “in vitro” a partir de metástase cervical de carcinoma. A linhagem HK2 apresenta características tais como: número de cromossomos anormal, presença de cromossomos marcadores, conteúdo de DNA do núcleo não-diplóide e localização anormal das regiões organizadoras de nucléolo. Essa linhagem possui também uma população de células gigantes, mono ou multinucleadas, que representam aproximadamente 10% do total de células (BONALDO et al., 1991). Outra linhagem celular de carcinoma de pulmão humano utilizada foi a A549, adquirida do banco de células do Rio de Janeiro (CR39) e caracterizada por LIEBER et al. (1976).

A BRL3A é uma linhagem de células epiteliais de fígado de rato adquirida da ATCC. Essa linhagem foi utilizada como controle normal.

As culturas das células foram feitas em garrafas de cultivo com meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5 ou 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) da Cultilab, sob atmosfera de 5% de CO₂. As subculturas foram obtidas por tripsinização com uma solução de tripsina 0,2% e EDTA a 0,02%. Estoques celulares foram mantidos congelados numa solução contendo 80% de DMEM, 10% DMSO e 10% de SFB.

3.2. Curva de crescimento

A curva de crescimento da linhagem celular HK2 foi obtida a partir da contagem de células, em câmara de Neubauer, nos 2^o, 4^o, 7^o e 10^o dias de cultivo. As células foram cultivadas em placas de Petri de 35 mm com inóculo inicial de 3×10^4 células por placa.

3.3. Imunofluorescência

A análise do citoesqueleto foi feita em células cultivadas sobre lamínulas em placas de Petri de 35 mm. As preparações em lamínulas foram lavadas em PBSA e fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos. Após lavagens (3x de 5 min.) em PBSA, as células foram submetidas a permeabilização em Triton X-100 a 0,5% por 10 minutos a temperatura ambiente e novamente lavadas em PBSA (3x de 5 min.). As incubações foram feitas em câmara úmida e escura com anticorpos primários específicos para elementos do citoesqueleto (lamina B e filamentos citoplasmáticos) por no mínimo 3 horas. Em seguida, as células foram incubadas em câmara úmida e escura com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo (FITC ou TRITC) por 1 hora ([MATSUI & MACHADO-SANTELLI, 1997](#)). Para a incubação dos anticorpos primários e secundários usou-se 7 µl do anticorpo sobre a lamínula, que foi recoberta com um pedaço de "parafilm" do tamanho da mesma. Após essa etapa, os núcleos foram corados com Iodeto de Propídio ([VILLA et al., 1994](#)), SYTOX[®] green ou TOTO[®]1 por 15 minutos. As lamínulas foram posteriormente montadas

em lâminas com “anti-fading”. A actina foi corada com faloidina-TRITC por 15 minutos.

3.4. Análise ao microscópio confocal

As imagens fluorescentes foram obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) com lasers de argônio (458, 488 e 514 nm), Hélio-Neônio1 (543 nm) e Hélio-Neônio2 (633 nm) ligados a um microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axiovert 100 M. A fluorescência emitida foi selecionada por um conjunto de filtros e exibida com uma resolução de 512x512 pixels em modo RGB. As imagens de secções verticais foram obtidas por intervalo de secionamento apropriado no eixo Z entre 0,3 a 0,7 μ m ([Figura 1](#)).

Após aquisição da imagem, esta foi analisada sob várias funções do software. A função de observar a galeria de imagens permite o estudo das secções obtidas no eixo Z, sendo as primeiras e últimas imagens as mais externas do espécimen estudado e as do meio as mais internas. A [Figura 2-A](#) mostra a galeria de uma célula que contém micronúcleo. Por meio dessa galeria pode-se observar que este micronúcleo está contido numa região mais interna e que o seu tamanho é menor que o do núcleo principal, pois ele aparece somente da 5^a. a 10^a. das 16 secções obtidas. Outra função que permite distinguir estruturas mais internas é a projeção ortogonal ([Figura 2-C](#)), onde uma secção do eixo Z é escolhida e projetada lateralmente nos eixo X e Y. Esta função também permite observar, por exemplo, se as estruturas estão no mesmo plano no eixo Z e se estão ligadas, como é o caso do micronúcleo da [Figura 2-C](#) que está no mesmo plano e separado do

núcleo principal. Se ainda houver dúvidas em relação ao plano e ligação das estruturas pode-se observar o espécimen na função “Profile”, que exibe um gráfico como o da [Figura 3-A](#), onde pode-se observar a distância das estruturas através da intensidade luminosa do pixel. Nesta Figura, por exemplo, pode-se observar que o espaço entre o micronúcleo e o núcleo principal aparece com intensidade zero no gráfico.

A função “split” permite a visualização individual de cada canal, sendo muito importante para se ter certeza de que um canal não está interferindo no outro, isto é, as estruturas observadas em um canal não devem ser visualizadas em outro. Permite também a avaliação inicial da colocação da estruturas ([Figura 2-B](#)).

O módulo “Projection” pode ser usado para fazer uma projeção de todas as secções obtidas no eixo z em uma única imagem, isso permite a visualização geral das estruturas estudadas, possibilitando a avaliação semi-quantitativa ([Figura 4-B](#)).

Os softwares “3D for Zeiss LSM 510” ([Figura 5](#)) e “Imaris” (Bitplane) ([Figura 6](#)) foram utilizados para fazer reconstrução 3D do espécimen estudado. Esta reconstrução foi obtida a partir das secções no eixo z. A imagem 3D gerada permite a visualização espacial do espécimen, como pode ser observado na [Figura 7](#), onde é possível ver os vários ângulos espaciais de uma célula em mitose.

Esses padrões de análise de imagem foram utilizados para analisar tanto dos filamentos do citoesqueleto como das alterações nucleares.

3.5. Preparações citológicas de células da mucosa oral.

A análise das alterações nucleares foi feita em preparações citológicas, obtidas por raspagem de células de mucosa oral de pacientes controle e expostos a genotóxicos potenciais. A raspagem da cavidade oral foi feita delicadamente nas bochechas esquerda e direita com uma lâmina limpa, depois a lâmina foi mergulhada em 8ml de solução salina (NaCl, 0,9%) e levada imediatamente ao laboratório ([MACHADO-SANTELLI et al.,1994](#)). As células, após secas, foram fixadas primeiramente em solução de etanol-ácido acético na proporção 3:1 diluída em PBSA 1:1 por 5 minutos e depois em etanol-ácido acético 3:1 puro por mais 30 minutos, lavadas em água corrente e secas. Após essa fase foram colocadas em HCl 5N por 30 minutos, lavadas em água corrente, secas e colocadas por 1 hora e 30 minutos no reativo de Schiff (reação de Feulgen).

As células de mucosa oral foram analisadas com objetiva de imersão num microscópio Zeiss. Lamínulas com células em cultura (HK2 e A549) foram fixadas e coradas da mesma forma que as células de mucosa oral. Foram contadas 1000 células por lâmina quanto à frequência de alterações nucleares caracterizadas por [TOLBERT et al. \(1992\)](#): micronúcleos, “broken egg”, células binucleadas, cariorrexis, cariólise, picnose e cromatina condensada ([Figura 8](#)). Outras anomalias nucleares também foram anotadas. Os micronúcleos foram analisados segundo os critérios a seguir: tamanho menor que 1/3 do núcleo principal, mesmo plano de foco do núcleo principal, padrão de estrutura da cromatina e coloração idênticos ao núcleo principal, nenhuma ligação com o núcleo principal. As alterações encontradas foram posteriormente analisadas ao microscópio confocal.

3.6. Materiais

Os seguintes anticorpos monoclonais foram utilizados nas reações de imunofluorescência: anti- α -tubulina (Amersham International); anti-vimentina (Boehringer Mannheim Biochemicals); anti-citoqueratina peptídeo 8 (Sigma); anti-mouse IgG (goat) – FITC (Calbiochem); anti-goat IgG (Santa Cruz). Foi também utilizado o anticorpo policlonal anti-Lamina B (Santa Cruz) é policlonal. Foram utilizados também corantes tais como Iodeto de Propídio (Sigma). SYTOX[®] green e TOTO[®]1 (Molecular Probes), faloidina-TRITC (Sigma). O “anti-fading” utilizado foi o VectaShield (Vector Laboratories).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das linhagens celulares

As células em cultura cresceram bem sob as condições de cultivo utilizadas. A [Figura 9](#) mostra fotomicrografia de cada uma das linhagens cultivadas, onde pode-se notar que as duas linhagens celulares apresentam morfologia compatível com sua origem a partir de carcinomas (epitelial). A linhagem HK2 tem aspecto mais irregular, mantendo sempre uma população de células gigantes. A A549 tem morfologia irregular somente durante a fase de sub-confluência. Após a confluência estas células apresentam morfologia mais regular, com aspecto de célula epitelial (mais poliédica).

A curva de crescimento construída a partir de contagens das células HK2 no 2º, 4º, 7º e 10º dias de cultura é mostrada na [Figura 10](#). As células cresceram bem desde o 1º até o 10º dia de plaqueamento, quando as células começaram a morrer e se soltar do substrato. A densidade de saturação obtida foi de cerca de 100.000 células/cm². A partir destes dados estabelecemos as condições para os experimentos posteriores, utilizando a linhagem A549 nas mesmas condições para melhor comparação dos dados.

4.2. Citoesqueleto

Nesta análise utilizou-se as linhagens celulares HK2, A549 e BRL3A. A linhagem celular BRL3A é constituída por células epiteliais de fígado de rato e em experimentos prévios em nosso laboratório apresentou padrão normal de distribuição dos filamentos do citoesqueleto, sendo utilizada como controle normal. Foram estudados os seguintes elementos do citoesqueleto: actina, microtúbulos, vimentina, citoqueratina-8 e lamina B.

4.2.1. Filamentos de actina

Os filamentos de actina foram marcados por reação com faloidina conjugada com rodamina (TRITC) e analisados ao microscópio confocal de varredura a laser. As células analisadas apresentaram filamentos do tipo “stress fibres” em todas as linhagens estudadas ([Figura 12](#)). Nas linhagens A549 e HK2 a marcação no citoplasma também apareceu na forma pontual e de “clusters”, respectivamente. Na [Figura 11-A](#) pode-se observar uma galeria de secções óticas, obtidas de uma célula HK2, que nos permite localizar a distribuição dos filamentos também no eixo Z, além do X e Y. Nas células HK2 marcações em “cluster” são mais freqüentes, embora existam fibras mais longas organizadas de modo concêntrico nas partes mais internas da célula e paralelas nas partes mais externas. Com a projeção de todas as secções em apenas uma única imagem ([Figura 11-B](#)) pode-se ter idéia da distribuição de actina em toda a célula. Pode-se notar que a distribuição dos filamentos aparece mais intensa no perímetro das células das três linhagens estudadas, embora este aspecto seja mais marcante na A549 ([Figura 12-E](#)).

Nas células em divisão os filamentos de actina se projetam na periferia da célula, como pode ser observado nas [Figuras 11-C e 12-F](#) (setas), que mostram respectivamente um corte ortogonal de uma célula HK2 e uma projeção das secções óticas adquiridas de células A549. Nota-se que a célula em divisão reduz sua área de adesão ao substrato.

A distribuição dos filamentos de actina é mais organizada nas células BRL3A do que nas células tumorais estudadas ([Figuras 11 e 12](#)).

4.2.2. Microtúbulos

Os microtúbulos foram marcados utilizando-se anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fluoresceína (FITC).

A distribuição dos filamentos de tubulina apresentou-se com um padrão bem organizado nas células de todas as linhagens estudadas (HK2, A549 e BRL3A). Os filamentos concentraram-se principalmente em volta do núcleo nas células das linhagens A549 e BRL3A, como mostra a [Figura 13](#). Na [Figura 13-A e B](#) que mostra uma projeção de imagens de células BRL3A pode-se observar que esses filamentos parecem estar associados com o centro organizador de microtúbulos (MTOC).

Através da observação de várias secções e de projeções, pode-se notar que as células gigantes da linhagem HK2 apresentam uma distribuição diferente dos filamentos, eles aparecem radiais e mais evidentes ([Figuras 14](#)) quando comparados com células gigantes das outras linhagens ([Figuras 13](#)).

A observação do padrão de distribuição desses filamentos durante a mitose é interessante pelo fato deles possuírem a importante função de distribuir os cromossomos às células filhas nesta fase da célula. Nas células das linhagens estudadas pode-se observar que esse padrão apareceu como normalmente descrito para as diferentes fases da mitose ([Figura 15](#)). Os filamentos de tubulina ficam bem evidentes no final da citocinese ([Figuras 14-C e 15-E](#)). A análise ao microscópio confocal proporcionou a observação

da projeção das imagens em todas as fases, bem como a imagem 3D nos diferentes ângulos espaciais ([Figura 7 – Materiais e métodos](#)).

Em algumas mitoses, entretanto, observou-se desvios de bipolaridade e evidências de material genético solto ([Figura 15-F](#)).

4.2.3. Filamentos de Vimentina

Os filamentos de vimentina foram evidenciados através da utilização de anticorpo primário monoclonal anti-vimentina e secundário anti-mouse conjugado com fluoresceína (FITC).

Esses filamentos apresentaram-se com aspecto de rede no citoplasma de todas as linhagens celulares estudadas, sendo intensos e bem organizados. As [Figuras 16-A, B, E e F](#) mostram projeções das secções no eixo Z de células das linhagens HK2 e BRL3A, onde esses filamentos concentram-se principalmente em volta do núcleo. Essa concentração nuclear pode ser melhor observada na [Figura 16-B](#), que mostra uma reconstrução 3D com projeção de sombra de uma célula HK2. Já na linhagem A549 esses filamentos parecem formar focos na periferia das células ([Figura 16-C e D](#)). O padrão de distribuição dos filamentos não se altera nas células gigantes bi ou multinucleadas ([Figura 16-A e F](#)), quando comparadas com células gigantes com um único núcleo ([Figura 16-E](#)).

As linhagens HK2 e A549, apesar de serem de carcinoma, e teoricamente apresentarem somente a expressão de citoqueratina, apresentaram expressão normal dos filamentos de vimentina ([Figura 16](#)).

4.2.4. Filamentos de citoqueratina-8

Os filamentos de citoqueratina foram evidenciados utilizando-se anticorpo primário monoclonal anti-citoqueratina-8 e anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fluoresceína (FITC).

Esses filamentos apresentaram-se com aspecto de rede no citoplasma das duas linhagens celulares tumorais, sendo essa bem nítida sobre o núcleo das células (Figura 17-A). Eles aparecem mais densos em volta do núcleo (Figura 17-B a F). O padrão de distribuição dos filamentos de citoqueratina-8 é semelhante nas células normais e gigantes, sendo elas multinucleadas ou não (Figura 17-B a E).

Comparando-se projeções de imagens de citoqueratina-8 e vimentina, sob o mesmo aumento, pode-se observar que os filamentos de citoqueratina-8 são mais finos e formam uma rede mais entrelaçada que os de vimentina.

Não foi possível localizar esse filamento nas células da linhagem BRL3A porque o anticorpo não reage em células de rato.

4.2.5. Filamentos de Lamina B

A marcação dos filamentos de lamina B foi realizada com anticorpo primário policlonal anti-Lamina B e anticorpo secundário anti-goat conjugado com fluoresceína (FITC). Esses filamentos contornaram o núcleo em todas as linhagens celulares e permitiram visualizar sua forma, assim como a forma das alterações nucleares encontradas (Figura 18-D e F). Foi possível determinar, com o auxílio de cortes ortogonais, se as estruturas classificadas como micronúcleos e células binucleadas estavam no mesmo plano,

elucidando possíveis dúvidas de classificação. O seu padrão de distribuição foi o mesmo em todas as linhagens celulares estudadas (Figura 18).

Um resumo dos dados de citoesqueleto pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1 – Sumário dos dados de citoesqueleto.

Filamentos	BRL3A	HK2	A549
Actina	“stress fibres”	“stress fibres” e clusters	“stress fibres” e pontos
Microtúbulos	rede citoplasmática com maior concentração perinuclear	filamentos radiais	rede citoplasmática com maior concentração perinuclear
Vimentina	rede citoplasmática com maior concentração perinuclear	rede citoplasmática com maior concentração perinuclear	rede citoplasmática com maior concentração periférica
Citoqueratina	—	rede citoplasmática	rede citoplasmática
Lamina B	fibras contornando o núcleo	fibras contornando o núcleo	fibras contornando o núcleo

4.3. Alterações nucleares

As alterações nucleares foram analisadas em células plaqueadas em placas de 35 mm com lamínula e que após 48 horas de cultivo foram fixadas e submetidas à reação de Feulgen ou coradas com corantes nucleares fluorescentes (Iodeto de propídio, SYTOX[®] green ou TOTO[®]1). Para definir as alterações nucleares as células coradas pelo Feulgen foram observadas ao microscópio de luz (Figura 23). As estruturas analisadas tiveram sua morfologia confirmada ao microscópio confocal de varredura a laser, obtendo-se reconstruções 3D de superfície a partir das secções óticas

adquiridas. As alterações nucleares observadas tanto ao microscópio de luz como ao microscópio confocal de varredura a laser nas linhagens HK2 e A549 estão resumidos na [Tabela 2](#). As linhagens HK2 e A549 apresentaram quase todos os tipos de alterações nucleares propostas por [TOLBERT et al. \(1992\)](#): micronúcleos, “broken egg”, cromatina condensada e células binucleadas e multinucleadas, ([Figura 19](#)). Além destas pode-se observar alterações que não se encaixam nestes critérios ([Figura 20](#)).

Como a classificação de [TOLBERT et al. \(1992\)](#) foi proposta para células esfoliadas de mucosa oral, a análise foi estendida também para essas células. As alterações nucleares em células de mucosa oral foram estudadas em preparações coradas pelo método de Feulgen, de indivíduos considerados como não expostos a genotóxicos e não fumantes. Nessas células também pode-se observar quase todos os tipos de alterações propostos por [TOLBERT et al. \(1992\)](#) ([Figura 21](#)). Entretanto as estruturas não classificadas, e já observadas nas células tumorais, foram também detectadas nessas células ([Figura 22](#)). As imagens das [Figuras 21 e 22](#) mostram reconstruções 3D de superfície, obtidas a partir do microscópio confocal, de figuras representativas de cada uma das alterações encontradas.

Na análise ao microscópio de luz, o que parecia ser micronúcleo ([Figura 23-A e B](#)), quando visto em imagens de cortes ortogonais e reconstrução 3D obtidos a partir do microscópio confocal, possuía uma ponte cromatínica ligando-o ao núcleo principal ([Figura 21-B](#)). Em muitos casos, tanto nas células de mucosa oral como na linhagem HK2, estruturas classificadas como micronúcleos na verdade correspondiam a brotos

nucleares. Portanto a análise somente ao microscópio de luz pode induzir uma superestimativa da frequência de micronúcleos. A análise ao microscópio confocal possibilitou elucidar a classificação das alterações, principalmente no que diz respeito aos micronúcleos.

TABELA 2 - Frequência de alterações nucleares nos tipos celulares estudados (2000 células analisadas).

Alteração nuclear	HK2 (%)	A549 (%)
micronúcleo	0,2	0,2
broken egg	0,25	0,1
cariorrexis	-	-
cromatina condensada	0,1	0,2
cariólise	-	-
binucleada	0,9	1,5
multinucleada	2,5	0,5
broto nuclear	?	?
núcleos interligados	0,25	0,15
núcleo com estrangulamento	0,55	0,25

4.4. Alterações nucleares e padrão de distribuição dos filamentos do citoesqueleto

Dentre os elementos do citoesqueleto estudados destaca-se a lamina B, a qual contribuiu para a visualização de alterações nucleares ([Figura 18](#)). A intensidade de fluorescência em estruturas como micronúcleos e brotos nucleares é semelhante a do núcleo principal. Em estruturas ligadas ao núcleo, aparentemente as pontes cromatínicas parecem envolvidas por uma rede mais tênue de lamina B.

Os filamentos citoplasmáticos do citoesqueleto (actina, microtúbulos, vimentina e citoqueratina-8) apresentaram mesmo padrão de organização

tanto em células com alterações nucleares como em células vizinhas com núcleo normal ([Figura 24](#)). Deste modo, este padrão foi considerado como normal. Na [Figura 24-C](#) pode-se observar o que parece ser a formação de um micronúcleo durante a mitose.

5. DISCUSSÃO

O mecanismo de formação e origem das alterações nucleares ainda é pouco conhecido, sendo o micronúcleo a mais estudada. A frequência elevada de micronúcleos pode ser resultante da ação genotóxica de agentes ambientais sobre as células. Efeitos como mutações, que alteram o DNA, associados a fatores epigenéticos podem induzir a transformação celular maligna. Esse processo está relacionado à instabilidade genética e as células tumorais normalmente apresentam muitos tipos de anormalidades no número e arranjo dos cromossomos, e também frequência elevada de alterações nucleares.

As duas linhagens tumorais utilizadas neste trabalho foram derivadas de carcinoma de pulmão, sendo a HK2, estabelecida em nosso laboratório e a A549, uma linhagem comercial, já descrita por [LIEBER et al. \(1976\)](#). A linhagem BRL3A, utilizada como controle normal para critério de comparação dos elementos do citoesqueleto, também com características epiteliais, foi estabelecida a partir de fígado de rato.

A linhagem HK2 foi estabelecida a partir de tumor induzido em ratos “nude” por células da linhagem HK1. Tanto as linhagens HK1 como HK2 apresentaram características como: número de cromossomos anormal, presença de cromossomos marcadores, conteúdo de DNA do núcleo não-diploide, crescem em monocamada e têm capacidade de crescer em ágar semi-sólido ([BONALDO et al., 1991](#)). Outro aspecto importante observado nessas linhagens foi a expressão do oncogene N-myc, que estaria associado ao alto grau de indiferenciação destes tumores, sem que tenha sido detectada amplificação gênica ([OLIVEIRA, 1992](#)).

As células HK2 apresentaram bom crescimento sob as condições de cultura utilizadas. Embora tenha morfologia pleiomórfica e comportamento “in vitro” compatível com o fenótipo tumorigênico, a curva de crescimento mostra a presença de “plateau” após 10 dias de cultura, sugerindo que a HK2 manteria uma densidade de saturação, característica relacionada a células normais. Outro aspecto interessante é a presença constante de uma população de células gigantes ($\varnothing > 60 \mu\text{m}$) nestas culturas, mantendo as características descritas por [BONALDO et al. \(1991\)](#).

Na linhagem A549, embora presentes, as células gigantes estão em proporção muito menor.

Os tipos de filamentos intermediários expressos por HK2 confirmam a positividade encontrada anteriormente por [BONALDO et al. \(1991\)](#). Esses autores utilizaram imunoperoxidase para mostrar que tanto vimentina como citoqueratina estavam presentes nos cortes histológicos dos tumores e nas linhagens HK1 e HK2.

A vimentina é considerada um bom marcador de células mesenquimais e pode ser expressada de forma transiente por muitas células durante o desenvolvimento embrionário e em células em cultura, enquanto as citoqueratinas são características de células epiteliais ([ALBERS & FUCHS, 1992](#)). Os filamentos intermediários têm sido utilizados como critério na caracterização de diferentes tipos celulares e em diagnóstico, na identificação da origem de células tumorais. Considerando, entretanto, que células tumorais possam coexpressar esses dois tipos de filamentos, a classificação de tumores com base nesses filamentos fica pouco confiável.

A coexpressão de vimentina e citoqueratina-8 nas linhagens estudadas deve ser consequência do processo de transformação maligna, uma vez que, pelo menos no tumor que deu origem a HK1, já estava presente.

A modulação na expressão de filamentos intermediários tem sido descrita em diferentes células tumorais. Células epiteliais derivadas de tumor de mama passam a expressar um diferente conjunto de citoqueratinas quando comparadas com células normais de mama ([TRASK et al., 1990](#)). Em vários tipos de células tumorais a coexpressão de vimentina e citoqueratina foi proposta estar associada a maior potencial metastático. A transfecção de genes de citoqueratinas 8 e 18 em células L de “mouse” (fibroblasto) conferiu a estas células uma maior capacidade migratória e invasiva em filtros recobertos com matriz extracelular ([CHU et al., 1993](#)). Concordam com esta proposta os dados de [PAGAN et al. \(1996\)](#) que mostram a expressão de vimentina induzida por EGF em hepatócitos e associada à perda de contato entre as células e aquisição de morfologia migratória. O tratamento dessas células com colcemide por 1 hora causou a desorganização na rede de filamentos de vimentina, mantendo os de citoqueratina inalterados. Nessas células os filamentos de vimentina colocalizaram com os de citoqueratina preexistentes e os microtúbulos poderiam ser responsáveis pela distribuição dos filamentos de vimentina.

O padrão de distribuição dos filamentos de vimentina concorda com o encontrado por [PALLADINI et al. \(1996\)](#) em células endoteliais em cultura. Esses autores mostram que os filamentos de vimentina aparecem organizados como uma rede distribuída por todo citoplasma, sendo que

esses filamentos formam um tipo de anel perinuclear. [SAFIEJKO & BELL Jr. \(1998\)](#) também encontraram padrão de distribuição de vimentina semelhante em fibroblastos humanos normais.

A marcação dos filamentos de actina do tipo “stress fibres”, característica deste tipo de filamento, foi observada nas células das três linhagens estudadas, sendo mais marcante na BRL3A. Essas fibras são longos cabos que podem contrair e então exercer tensão, formam o córtex celular, por isso podem ser visualizadas no perímetro da célula ([RIDLEY, 1999](#)). As marcações que aparecem como “clusters” e de modo pontual podem representar fibras mais curtas que estão aglomeradas no citoplasma. Esse tipo de organização de actina foi mais marcante em HK2, o que é coerente com a morfologia celular mais irregular. Como esse tipo de marcação só foi encontrada nas células tumorais, acredita-se que elas possam apresentar um certo grau de alteração nesses filamentos. [SAFIEJKO & BELL Jr. \(1998\)](#) também encontrou esse tipo de marcação pontual distribuída pela lamela de fibroblastos humanos tratados com neomicina.

A disposição das “stress fibres” em A549 é mais parecida com a observada nas células BRL3A, que são células normais de fígado de rato. Nas células HK2 gigantes as fibras se dispõem de modo concêntrico quando se observa a projeção de todas as secções óticas em um único plano. Observando individualmente as secções ao MCVL verificou-se que a organização básica parece ser triangular e esta se compõe em vários níveis formando o arcabouço da célula.

Na mitose ocorre um arredondamento da célula e esta movimentação citoplasmática evidencia fibras periféricas, sugerindo que prolongamentos citoplasmáticos permanecem aderidos ao substrato, sendo sua estrutura mantida pelos feixes de actina.

Os filamentos de tubulina apresentaram padrão de distribuição normal tanto na intérfase como na mitose, pois durante a intérfase é comum eles ficarem concentrados junto ao núcleo devido ao centro organizador de microtúbulos (MTOC) ([SAFIEJKO & BELL Jr., 1998](#)). Nas células gigantes da linhagem HK2 eles aparecem mais evidentes e com um padrão radial, o que poderia estar relacionado a alterações decorrentes do fato da linhagem HK2 ser tumoral. [MATSUI et al. \(1997\)](#) também encontraram esse padrão radial quando marcaram os filamentos de tubulina com anti- β -tubulina em células da linhagem Hs-578T, cultivadas na presença de altas ou baixas concentrações de cálcio, enquanto que células MDCK apresentavam esse padrão só em presença de altas concentrações de cálcio. Hs-578T é uma linhagem de carcinoma de mama humano com alto grau de agressividade, que é negativa para receptores de estrógeno. A concentração de cálcio no meio de cultura parece afetar a organização dos microtúbulos somente em células não transformadas.

As células tumorais apresentam um aumento na proliferação celular, o que eleva o risco de danos genéticos de vários tipos, tais como a perda de material genético e erros na polaridade do fuso durante a divisão celular. Esses erros na polaridade podem levar a alterações na ploidia das células.

Invaginações no núcleo são causadas em células SW-13 pela ausência ou pelo padrão de organização da vimentina. Quando o gene para

vimentina mutante foi transfectada nessas células, o padrão de organização dos filamentos mudou e o núcleo passou a apresentar invaginações, característica que também foi observada quando se aboliu a vimentina das células ([SARRIA et al., 1994](#)). No presente trabalho, as células apresentaram padrão morfológico normal de organização do citoesqueleto mesmo quando continham alterações nucleares. Isso significa que os tipos de alterações nucleares encontradas nas células HK2 e A549 não estariam associados com os filamentos de vimentina. Não se pode descartar que alterações mais delicadas no citoplasma, possam não ser evidenciadas pelas técnicas utilizadas.

Invaginações nucleares foram também atribuídas a ação de microtúbulos, no início da prófase, em eventos que precedem a desintegração do envoltório nuclear. [GEORGATOS et al. \(1997\)](#), estudando células de adenocarcinoma endometriais e de rim de rato, mostraram que, durante a divisão celular, ocorre uma deformação do núcleo no início da prófase na região que se delimita aos ásteres (microtúbulos). A fragmentação do envoltório nuclear, por sua vez, independe da presença de microtúbulos, mas envolve a fosforilação das laminas. Deste modo, a presença da lamina B evidencia a integridade do envoltório nuclear, facilitando a análise de alterações nucleares morfológicas durante toda a intérfase e mesmo início da mitose

Pode-se propor a utilização da lamina B para a classificação das alterações nucleares. Por esse filamento estar associado à membrana nuclear pode-se dizer que onde ele é encontrado a membrana nuclear está presente, e se ele delimita o núcleo é porque a membrana está íntegra, isto

é, tem continuidade física. Nas células tumorais estudadas (HK2 e A549) esse filamento marcou bem o contorno das alterações nucleares encontradas, deixando claro que essas alterações possuem membrana nuclear íntegra. Não pode-se dizer que ocorreu uma alteração na distribuição da lamina B, pois ela apenas acompanha a forma do núcleo e a análise ao MCVL não permite o estudo detalhado da proteína. Nesse caso seria interessante analisar sua ultraestrutura, como [GEORGATOS et al. \(1997\)](#) fizeram em seu trabalho. A imunofluorescência para lamina B não contribuiu para a classificação das figuras apoptóticas, pois durante este processo, essas proteínas sofrem proteólise e aparecem dispersas no citoplasma ([DUBAND-GOULET e al., 1998](#)).

O estudo do citoesqueleto nas linhagens tumorais (HK2 e A549) e no controle (BRL3A) permitiu a caracterização do padrão de organização dos filamentos do citoesqueleto, para analisar se alterações nessa organização poderiam induzir as alterações nucleares.

As alterações nucleares não puderam ser associadas às alterações dos elementos do citoesqueleto, pois todos os que foram estudados apresentaram um padrão normal de morfologia quando comparou-se células normais com células que continham alterações nucleares.

A análise das alterações nucleares com o auxílio da reconstrução 3D foi um aspecto importante, pois essa ferramenta permitiu sua identificação inequívoca.

As alterações nucleares foram analisadas em tipos celulares diferentes: as células de mucosa oral, que representam células “in vivo” utilizadas como sistema para a análise de genotóxicos e as células tumorais

estabelecidas “in vitro”, HK2 e A549. Analisando as alterações nesses tipos celulares pretendeu-se comparar os tipos das alterações nucleares encontradas nas células tumorais com aqueles classificados por [TOLBERT et al. \(1992\)](#) em células de mucosa oral.

[TOLBERT et al. \(1992\)](#) propuseram um critério de classificação para outras alterações nucleares que não micronúcleos. Nesse trabalho eles relacionam picnose, cromatina condensada e cariorrexis como estágios de apoptose e necrose. Se isso está correto, estruturas que são estágios de um mesmo processo estariam sendo classificadas como diferentes. O que está sendo classificado como cromatina condensada é uma estrutura clássica de apoptose.

Embora descrita inicialmente por [SARTO et al. \(1987\)](#), “broken egg” foi incluído em uma classificação geral de aberrações nucleares por [TOLBERT et al. \(1992\)](#). Estes autores descreveram esta estrutura como um núcleo com uma cinta Feulgen negativa separando dois lóbulos. Em seu esquema um deles seria menor que o outro: não fica claro se a relação de tamanho deve ser levada em conta. Os dados do presente trabalho colocaram nessa categoria apenas figuras exatamente iguais a do esquema proposto.

Como brotos nucleares classificamos apenas protuberâncias bem definidas na superfície do núcleo. Esse tipo de estrutura foi também descrita por [SHIMIZU et al. \(1998\)](#) como broto nuclear, embora ele coloque “broken egg” como broto também.

Num estudo em células humanas de tumor neuroendócrino e de fibroblastos de pele, [SHIMIZU et al. \(1998\)](#) sugerem que os brotos nucleares

são estágios para a formação de micronúcleos, e que esses micronúcleos contêm cromossomos “Double minutes” (DMs) em seu interior, que apresentam o oncogene c-myc. Esses autores propõem um novo mecanismo de micronucleação que ocorre durante a fase S e não na mitose, relacionando-o com a eliminação de sequências específicas de DNA. Para verificar se este tipo de micronucleação ocorreu, nos micronúcleos encontrados nas células tumorais estudadas, seriam necessárias análises adicionais, como por exemplo da sequência de DNA contida nos micronúcleos, brotos nucleares e “broken egg”.

Algumas estruturas não puderam ser classificadas pelos critérios de [TOLBERT et al. \(1992\)](#) mas, como parecem ter sido originadas por uma separação incompleta dos núcleos durante a divisão celular seguida pela ausência de citocinese, foram chamadas de núcleos interligados.

A cariólise foi uma alteração nuclear só encontrada em células de mucosa oral, provavelmente, devido ao fato de estarem relacionadas com a diferenciação dos queratinócitos. As demais alterações foram encontradas em todas as linhagens estudadas.

As células bi e multinucleadas foram as alterações mais freqüentes nas linhagens HK2 e A549, devido ao fato de estarem relacionadas com a poliploidia, evento normalmente encontrado em células tumorais, o que é compatível com os resultados encontrados por [BONALDO et al. \(1991\)](#) para a linhagem HK2.

A freqüência dos micronúcleos é semelhante a encontrada por outros autores em células normais. [CERQUEIRA et al. \(1998\)](#) estudando células de mucosa cervical encontraram uma freqüência de 0,02% de micronúcleos nas

células normais; [TITENKO-HOLLAND et al. \(1994\)](#) encontraram uma média de 0,15% de micronúcleos em células de mucosa oral de indivíduos considerados controle, o que é semelhante aos dados de [MACHADO-SANTELLI et al. \(1994\)](#) que encontraram frequência média de 0,16%. A frequência de micronúcleos em células em cultura foi estudada por [LOTFI et al. \(1996\)](#), que encontraram frequências de 0,09% em fibroblastos de pele humana, 0,17% em fibroblastos de bexiga bovina e não encontraram ocorrência de micronúcleos em células de pele bovina e células epiteliais de pele humana.

A padronização do uso do microscópio confocal de varredura a laser, através de ferramentas que possibilitam a visualização ortogonal nos 3 eixos e reconstruções em 3D, possibilitou a associação das alterações nucleares com possíveis alterações dos elementos do citoesqueleto, sendo uma ferramenta importante para a descoberta de pontes cromatínicas entre o núcleo e estruturas que ao microscópio de luz pareciam ser micronúcleos.

Com os resultados obtidos neste trabalho, a partir do uso da microscopia confocal, propõem-se um novo critério de classificação das alterações nucleares: **(1) micronúcleos** - estruturas constituídas por material cromatínico contido por um envoltório nuclear e menores que o núcleo principal; **(2) brotos nucleares** – protuberâncias bem definidas na superfície do núcleo que podem se projetar e ficar ligadas somente por uma delgada ponte cromatínica; **(3) núcleos interligados** – aparecem lóbulos com aproximadamente o mesmo tamanho; **(4) apoptose** - desintegração nuclear envolvendo perda de integridade do núcleo.

As células binucleadas não foram incluídas dentre as alterações por serem consideradas eventos normais em algumas populações celulares, e as células multinucleadas por aparecem em populações celulares transformadas, porém ambas não estariam relacionadas com genotoxicidade. Dados prévios do nosso laboratório mostram que a frequência de células binucleadas foi exatamente a mesma antes e após a exposição a raios-X, em células de mucosa oral (LOURENÇO et al., submetido a publicação).

Como o mecanismo de formação de brotos nucleares e núcleos interligados não é conhecido, fica também a dúvida quanto a serem

estruturas distintas. Na verdade poderiam representar etapas diferentes de um mesmo processo. Dentre as alterações mencionadas, as que possivelmente estão relacionadas à genotoxicidade são os micronúcleos, brotos nucleares e núcleos interligados.

Para confirmar a origem e o significado biológico das alterações nucleares, estudos adicionais mais aprofundados devem ser realizados. O estudo de proteínas associadas ao citoesqueleto e das moléculas que conectam os FI aos microtúbulos, envoltório nuclear e outras organelas poderia esclarecer a associação dessas estruturas com as alterações nucleares. Um completo conhecimento do citoesqueleto seria importante para determinar funções adicionais desses filamentos e investigar a sua conexão a várias atividades celulares, e talvez às alterações nucleares. Outro aspecto importante é o estudo das sequências de DNA contidas nessas estruturas, isso poderia relacionar as alterações nucleares umas às outras como etapas de um mesmo processo ou mostrar que são realmente estruturas diferentes. O presente trabalho é apenas um início para o entendimento dessas alterações.

6. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos concluímos que:

- a) o citoesqueleto da linhagem HK2 apresenta-se mais alterado do que o da linhagem A549, o que está de acordo com a morfologia das células;
- b) a abordagem metodológica utilizada permite a classificação segura das alterações nucleares tanto em células tumorais como células normais esfoliadas de mucosa oral;
- c) não foi possível mostrar alterações do citoesqueleto associadas às alterações nucleares;
- d) estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo de formação das alterações nucleares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERS, K & FUCHS, E. The molecular biology of intermediate filament proteins. **International Review of Cytology**, **134**: 243-279, 1992.
- BONALDO, MF; PESTANA, CB; RIBEIRO, MCM; MACHADO-SANTELLI, GM; MORI, L & OLIVEIRA, AR. Comparative characterization of a human large cell lung carcinoma cell line and the xenograft derived cell line. **Cell Biology International Reports**, **15(3)**:229-241, 1991.
- BROOKS, AL; NEWTON, GJ; SHYR, LJ; SEILER, FA; SCOTT, BR. The combined effects of α -particles and X rays on cell killing and micronucleo induction in lung epithelial cells. **Int. J. Radiat. Biol.**, **58(5)**: 799-811, 1990.
- BURRIDGE, K; FATH, K; KELLY, T; NUCKOLLS, G & TURNER, C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. **Annual Review in Cell Biology**, **4**: 487-526, 1988.
- CARY, RB; KLYMKOWSKY, MW; EVANS, RM; DOMINGO, A; DENT, JA & BACKHUS, LE. Vimentin's tail interacts with actin-containing structures in vivo. **The Journal of Cell Science**, **107**: 1609-1622, 1994.
- CASSIMERIS, L. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. **Current Opinion in Cell Biology**, **11**: 134-141, 1999.
- CERQUEIRA, EMM; SANTORO, CL; DONOZO, NF; FREITAS, BA; de BRAGANÇA PEREIRA, CA; BEVILACQUA, RG & MACHADO-SANTELLI, GM. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix:

association and interaction between cigarette smoking and the progression to malignant transformation? **Acta Cytologica**, **42**: 619-649, 1998.

CHOU, YH; SKALLI, O & GOLDMAN, RD. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. **Current Opinion in Cell Biology**, **9**: 49-53, 1997.

CHU, YW; RUNYAN, RB; OSHIMA, RG & HENDRIX, MJC. Expression of complete keratin filaments in mouse L cells augments cell migration and invasion. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **90**: 4261-4265, 1993.

COLE, NB & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. **Current Opinion in Cell Biology**, **7**: 55-64, 1995.

COMPTON, DA. Focusing on spindle poles. **The Journal of Cell Science**, **111**: 1477-1481, 1998.

COOK, P. Perspectives: Nuclear structure. **Science**, **281**: 1466-1467, 1998.

DINGWALL, C & LASKEY, R. The nuclear membrane. **Science**, **254**: 942-947, 1992.

DUBAND-GOULET, I; COURVALIN, JC & BUENDIA, B. LBR, a chromatin and lamin binding protein from the inner nuclear membrane, is proteolyzed at late stages of apoptosis. **The Journal of Cell Science**, **111**: 1441-1451, 1998.

GEIGER, B & AYALON, O. Cadherins. **Annual Review in Cell Biology**, **8**: 307-332, 1992.

GEORGATOS, SD; MEIER, J & SIMOS, G. Lamins and lamin-associated proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, **6**: 347-353, 1994.

GEORGATOS, SD; PYRPASOPOULOU, A & THEOOROPOULOS, PA. Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. **Journal of Cell Science**, **110**: 2129-2140, 1997.

GERACE, L. Functional organization of the nuclear envelope. **Annual Review in Cell Biology**, **4**: 335-74, 1988.

HEINS, S & AEBI, U. Making heads and tails of intermediate filament assembly, dynamics and networks. **Current Opinion in Cell Biology**, **6**: 25-33, 1994.

HIROKAWA, N. Organelle transport along microtubules – the role of KIFs. **Trends in Cell Biology**, **6**: 135-141, 1996.

HOUSEWEART, MK & CLEVELAND, DW. Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. **Current Opinion in Cell Biology**, **10**: 93-101, 1998.

JANEVSKI, J, PARK, P.C. & DE BONI, U Organization of centromeric domains in hepatocyte nuclei: rearrangement associated with de novo activation of vitellogenin gene family in *Xenopus laevis*. **Experimental Cell Research**, **217**: 227-239, 1995.

JORDAN, MA & WILSON, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. **Current Opinion in Cell Biology**, **10**: 123-130, 1998.

- KLYMKOWSKY, MW. Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. **Current Opinion in Cell Biology**, **7**: 46-54, 1995.
- KRISHNA, G. Immunofluorescence and confocal laser cytometric analysis of centromeres in V79 cells. **Mutation Research**, **328**: 1-9, 1995.
- KRYSTOSEK, A. Repositioning of human interphase chromosomes by nucleolar dynamics in the reverse transformation of HT1080 fibrosarcoma cells. **Experimental Cell Research**, **241**:202-209, 1998.
- LIEBER, M; SMITH, B; SZAKAL, A; NELSON-REES, W & TODARE, G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **International Journal of Cancer**, **17**: 62-70, 1976.
- LOTFI, CFP & MACHADO-SANTELLI, GM. Comparative analysis of colchicine induced micronuclei in different cell types in vitro. **Mutation Research**, **349**(1): 77-83, 1996.
- LOURENÇO, D; BALÃO, AD. Micronuclei analysis in cells of oral mucosa of xylene exposed individuals. Submetido à publicação.
- MACHADO-SANTELLI, GM; CERQUEIRA, EM; OLIVEIRA, CT & PEREIRA, CA de B. Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. **Mutation Research**, **322**: 203-208, 1994.
- MAISON, C; HORSTMANN, H & GEORGATOS, SD. Regulated docking of nuclear membrane vesicles to vimentin filaments during mitosis. **The Journal of Cell Biology**, **123**(6): 1491-1505, 1993.

MATSUI, DH & MACHADO-SANTELLI, GM. Alterations in F-actin distribution in cells treated with melatonin. **Journal of Pineal Research**, **23**: 169-175, 1997.

McCORMICK, MB; KOUKLIS, P; SYDER, A & FUCHS, E. The roles of the rod end and the tail in vimentin IF assembly and IF network formation. **The Journal of Cell Biology**, **122**: 395-407, 1993.

MERETO, E.; BRAMBILLA-CAMPART, G.; GHIA, M.; MARTELLI, A. & BRAMBILLA, G. Cinnamaldehyde-induced micronuclei in rodent liver. **Mutation Research**, **322**: 1-8, 1994.

MICAL, TI & MONTEIRO, MJ. The role of sequences unique to nuclear intermediate filaments in the targeting and assembly of human lamin B: evidence for lack of interaction of lamin B with its putative receptor. **The Journal of Cell Science**, **111**: 3471-3485, 1998.

OLIVEIRA, A. **Estudo comparativo de duas linhagens de carcinoma de célula grande de pulmão estabelecidas “in vitro”**. São Paulo. 1992. [Tese de Doutorado: Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo].

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

PAGAN, R; MARTÍN, I; ALONSO, A; LLOBERA, M & VILARÓ, S. Vimentin filaments follow the preexisting cytokeratin network during epithelial-mesenchymal transition of culture neonatal rat hepatocytes. **Experimental Cell Research**, **222**: 333-344, 1996.

- PALLADINI, G; FINARDI, G & BELLOMO, G. Modifications of vimentin filament architecture and vimentin-nuclear interactions by cholesterol oxides in 73/73 endothelial cells. **Experimental Cell Research**, **223**: 83-90, 1996.
- RIDLEY, AJ. Stress fibres take shape. **Nature Cell Biology**, **1 (3)**: 64-66, 1999.
- ROBERTS, DM. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. **Acta Cytologica**, **41(4)**:1008-1014, 1997.
- RODILLA, V. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. **Mutation Research**, **300(3-4)**: 281-291, 1993.
- ROLLS, MM; STEIN, PA; TAYLOR, SS; HA, E; McKEON, F & RAPOPORT, TA. A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. **The Journal of Cell Biology**, **146 (1)**: 29-43, 1999.
- RUSSO, A; PRIANTE, G & TOMMASI, AM. PRINS localization of centromeres and telomeres in micronuclei indicates that in mouse splenocytes chromatid non-disjunction is a major mechanism of aneuploidy. **Mutation Research**, **372**: 173-180, 1996.
- SAFIEJKO-MROCZKA, B & BELL Jr, PB. Distribution of cytoskeletal proteins in neomycin-induced protrusions of human fibroblasts. **Experimental Cell Research**, **242**: 495-514, 1998.
- SARRIA, AJ; LIEBER, JG; NORDEE, SK & EVANS, RM. The presence or absence of a vimentin-type intermediate filamen network affects the

- shape of the nucleus in human SW-13 cells. **The Journal of Cell Science**, **107**: 1593-1607, 1994.
- SARTO, F; FINOTTO, S; GIACOMELLI, L; MAZZOTTI, D; TOMANIN, R & LEVIS, AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, **2**:11-17, 1987.
- SCHIEBEL, E. Two new tubulins differ in a split decision. **Nature Cell Biology**, **2 (1)**: 3-4, 2000.
- SCHOENWAELDER, SM & BURRIDGE, K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. **Current Opinion in Cell Biology**, **11**: 274-286, 1999.
- SHIMIZU, N.; KANDA, T. & WAHL, G.M. Selective capture of acentric fragments by micronuclei provides a rapid method for purifying extrachromosomally amplified DNA. **Nature Genetics**, **12**: 65-71, 1996.
- SHIMIZU, N; ITOH, N; UTIYAMA, H & WAHL, GM. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, **140(6)**: 1307-1320, 1998.
- SULLIVAN, KF. Structure and utilization of tubulin isotypes. **Annual Review in Cell Biology**, **4**: 687-716, 1988.
- SULLIVAN, T; ESCALANTE-ALCALDE, D; BHATT, H; ANVER, M; BHAT, N; NAGASHIMA, K; STEWART, CL & BURKE, B. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. **The Journal of Cell Biology**, **147 (5)**: 913-919, 1999.

- TITENKO-HOLLAND, N; MOORE, LE & SMITH, MT. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutation Research**, **312**: 39-50, 1994.
- TOLBERT, PE; SHY, CM & ALLEN JW. Micronuclei and others nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**, **271**: 69-77, 1992.
- TORRES-BUGARÍN, O.; De ANDA-CASILLAS, A.; RAMÍREZ-MUÑOZ, M.P.; SÁNCHEZ-CORONA, J.; CANTÚ, J.M. & ZÚÑIGA, G. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. **Mutation Research**, **413**: 277-281, 1998.
- TRASK, DK; BAND, V; ZAJCHOWSKI, DA; YASWEN, P; SUH, T & SAGER, R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 2319-2323, 1990.
- VILLA, R.; ZAFFARONI, N; GORNATI, D.; COSTA, A SILVESTRINI, R. Lack of a correlation between micronucleus and radiosensitivity in established and primary cultures of human tumors. **British J. Cancer**, **70** (6):1112-1117, 1994.
- VUORI, K & RUOSLAHTI, E. Connections count in cell migration. **Nature Cell Biology**, **1** (4): 85-87, 1999.

WATERMAN-STORER, CM & SALMON, ED. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. **Current Opinion in Cell Biology**, 11: 61-67, 1999.

YE, Q & WORMAN, HJ. Primary structure analysis and lamin B and DNA binding of human LBR, na integral protein of the nuclear envelope inner membrane. **The Journal of Biological Chemistry**, 269(15): 11306-11311, 1994.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus Bethesda: NLM, 1987.

ABSTRACT

The origin and mechanism of formation of the nuclear alterations is largely unknown, with the micronucleus being the most well studied alteration. Tumor cells generally present various types of nuclear alterations which can be associated with genetic instability. The purpose of this study was to analyze the possible association between nuclear alterations and the cytoskeleton in the human lung carcinoma cells HK2 and A549. The method of LSM was optimized to redefine the nuclear alterations and to characterize the principal cytoskeletal filaments in preparations stained with Feulgen's reagent or submitted to immunofluorescent methods. The HK2 cells presented actin fibres arranged either concentrically or in clusters and tubulin filaments arranged radially, while in the A549 cells the distribution pattern was similar to that of normal cells (BRL3A). The lamin B filaments were the most important to identify nuclear alterations, as these alterations could not be related to cytoskeletal alterations.

FIGURA 1 - Interface do software "Zeiss LSM 510". O módulo "Expert Mode" (A) é o menu principal, contendo os módulos básicos de controle do microscópio, dos lasers e de aquisição de imagem. O módulo "Axiovert Control" (B) controla as objetivas, a intensidade da luz transmitida e os filtros de fluorescência do microscópio. O módulo "Scan Control" (C) possui vários comandos de resolução da imagem adquirida, bem como o modo de varredura das mesmas (número de secções óticas no eixo Z). O módulo "Configuration Control" (D) controla os filtros utilizados para a aquisição da imagem em 1 ou mais canais. A configuração desse conjunto de filtros permite selecionar a faixa de emissão desejada, e também escolher a cor para cada canal independente do fluorocromo utilizado. O módulo "Laser Control" (E) controla a intensidade de laser emitida e permite selecionar o canhão de laser desejado. A imagem adquirida (F) aparece em outro módulo, onde pode ser salva e passar por outros tratamentos e análises.

FIGURA 3 - O módulo "Profile" (A) produz um gráfico que mostra a relação entre distância (μm) e intensidade luminosa do pixel (0-255) para cada canal. Já o módulo "Pseudo 3D" (B e C) mostra um gráfico para o canal escolhido que permite uma visualização "3D" do espécimen em função de um código de profundidade obtido através da luminosidade do pixel, onde o azul mais escuro corresponde a zero e o vermelho mais intenso a 255. Essas funções do software foram utilizadas para elucidar a distribuição espacial das estruturas estudadas.

FIGURA 5 - Interface do software "3D for Zeiss LSM 510" (A e B) que permite a reconstrução 3D de superfície (C) a partir das secções óticas adquiridas com o software "Zeiss LSM 510".

FIGURA 6 - Interface do software "Imaris" (Bitplane) que, além de permitir a reconstrução 3D de superfície (A) através do módulo "Isosurface" (B), também permite a visualização da imagem 3D com projeção de sombra (C) através do módulo "Shadow projection" (D).

FIGURA 7 - Reconstrução 3D de uma célula HK2 em mitose vista em diferentes ângulos. A tubulina (azul) foi evidenciada por anticorpo primário monoclonal anti- α -tubulina (FITC) e o DNA (vermelho) foi corado por Iodeto de Propídio. $\cong 3750 \times$

FIGURA 8 – Esquema do padrão de classificação de alterações nucleares estabelecido por TOLBERT et al. (1992).

A

B

C

D

FIGURA 9 - Fotomicrografias em microscopia de fase das linhagens Hk2 (A e B) e A549 (C e D) em cultura. Em A e C fase exponencial de crescimento e B e D fase de confluência. Aumento de 1400x em A e B e 700x em C e D.

FIGURA 10 – Curva de crescimento da linhagem HK2. Inóculo inicial de 3×10^4 células.

A

B

C

FIGURA 11 - Imagens ao MCVL de filamentos de actina evidenciados por faloidina-TRITC e núcleos corados com SYTOX® green em células HK2. Pode-se observar o padrão de distribuição dos filamentos de actina na galeria de imagens (A) e na projeção dessas imagens em uma única (B). Em (C) pode-se observar em projeção ortogonal os cromossomos mitóticos dentro da célula.

FIGURA 12 - Imagens ao MCVL de filamentos de actina evidenciados por faloidina-TRITC em células HK2 (A), BRL3A (B e C) e A549 (D a F). Em D e F os núcleos foram corados com SYTOX® green. As setas em F apontam as células mitóticas.

FIGURA 13 - Imagens ao MCVL de filamentos de tubulina evidenciados por anticorpo anti- α -tubulina (FITC) em células BRL3A (A a C) e A549 (D a F). A concentração perinuclear dos filamentos está bem visível em A . Em C e D aparecem células gigantes. Os núcleos foram corados com Iodeto de Propídio em C e F.

FIGURA 15 - Imagens ao MCVL de filamentos de tubulina evidenciados por anticorpo anti- α -tubulina (FITC) e núcleos corados com Iodeto de Propídio em células HK2 em mitose. Pode-se observar as seguintes fases da mitose: prófase (A), metáfase (B e C), anáfase (D) e telófase (E). Em F observa-se uma metáfase anormal com três pólos.

FIGURA 14 - Imagens ao MCVL de filamentos de tubulina evidenciados por anticorpo anti- α -tubulina (FITC) em células HK2. Pode-se observar o padrão radial dos filamentos em células gigantes (A e B). Em C aparecem duas células em fase final de divisão onde ainda se observa a finalização da citocinese. Os núcleos foram corados com Iodeto de Propídio em A e D.

FIGURA 16 - Imagens ao MCVL de filamentos de vimentina evidenciados por anticorpo anti-vimentina (FITC) em células HK2 (A e B), A549 (C e D) e BRL3A (E e F). Pode-se observar a presença de células gigantes em todas as imagens. Em A observa-se uma célula gigante multinucleada e em F uma binucleada. Em B reconstrução 3D de superfície com projeção de sombra.

FIGURA 17 - Imagens ao MCVL de filamentos de citoqueratina evidenciados por anticorpo anti-citoqueratina-8 (FITC) em células HK2 (A a D) e A549 (E e F). Pode-se observar células gigantes com um (C e E) ou mais núcleos (B e D). Em C os núcleos foram corados com TOTO[®]1.

FIGURA 18 - Imagens ao MCVL de filamentos de lamina B evidenciados por anticorpo anti-lamina B (FITC) em células HK2 (A e B), A549 (C e D) e BRL3A (E e F). Em D pode-se observar um broto nuclear (seta) e em F um micronúcleo (seta).

FIGURA 19 - Imagens obtidas ao MCVL de núcleos de células HK2 corados por Feulgen (A a D) e Iodeto de Propídio (E): A- célula binucleada com micronúcleo , B- micronúcleo, C e D- “broken-egg”, E- cromatina condensada.

FIGURA 20 - Imagens obtidas ao MCVL de núcleos de células HK2 corados por Feulgen. Em A, B e C observam-se brotos nucleares e em D um núcleo com estrangulamento.

FIGURA 21 - Reconstruções 3D de superfície (A a E) e projeção das secções óticas (F) de núcleos de células de mucosa oral coradas por Feulgen: A- micronúcleo , B- “broken egg”, C- broto nuclear, D- cromatina condensada, E- cariorrexis e F- cariólise. Imagens obtidas ao MCVL.

FIGURA 22 - Reconstruções 3D de superfície de núcleos de células de mucosa oral coradas por Feulgen: A- núcleo com estrangulamento central , B- núcleos interligados, C- binucleada. Imagens obtidas ao MCVL.

A

B

C

D

FIGURA 23 - Fotomicrografias de alterações nucleares (setas) coradas por Feulgen em células de mucosa oral. A - micronúcleo, B e C - "broken egg" e D - cromatina condensada. Aumento $\cong 600\times$.

FIGURA 24 - Imagens obtidas ao MCVL de de núcleos de células Hk2 (A a C) e A549 (D) onde podem ser observados micronúcleos. A a C evidenciam filamentos de tubulina (azul) e núcleos corados com Iodeto de Propídio. Em D observam-se núcleos corados com SYTOX® green (azul) e filamentos de actina (amarelo).