

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização Citogenética da Linhagem de células

Tumorais Sarcoma 180 (*Mus musculus*)

Robson José de Oliveira Júnior

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG

Abril - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização Citogenética da Linhagem de células

Tumorais Sarcoma 180 (*Mus musculus*)

Robson José de Oliveira Júnior

Sandra Morelli

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia - MG

Abril - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização Citogenética da Linhagem de células

Tumorais Sarcoma 180 (*Mus musculus*)

Robson José de Oliveira Júnior

Sandra Morelli

Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do

Curso de Ciências Biológicas em

__/__/__

Cecília Lomônaco de Paula

Coordenadora do Curso

Uberlândia - MG

Abril - 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

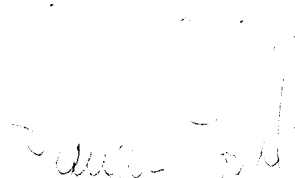
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Caracterização Citogenética da Linhagem de células

Tumorais Sarcoma 180 (*Mus musculus*)

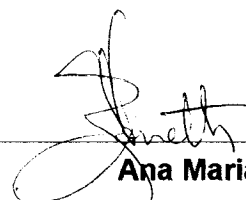
Robson José de Oliveira Júnior

Aprovado pela Banca Examinadora em: 07/04/2006 Nota: 100,0



Sandra Morelli

Elisângela de Paula Silveira-Lacerda



Ana Maria Bonetti

Uberlândia, 24 de abril de 2006

Dedico aos meus pais e à minha irmã
que me apoiaram em todos os momentos, me
incentivando e demonstrando amor e carinho:

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma”.

(John Ruskin)

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas, de uma maneira ou outra, contribuíram para que este trabalho pudesse ser concretizado, dentre elas agradeço:

A Deus por permitir que meus sonhos se realizem;

À minha orientadora Dr. Sandra Morelli pela oportunidade e confiança. Obrigado por acreditar no meu trabalho, pois sem sua orientação nada poderia ter sido feito. Obrigado pela Amizade, paciência e compreensão; pela ajuda nos congressos da vida e pelos momentos descontraídos nas festinhas em sua casa. Sandra, muito obrigado pelo grande enriquecimento profissional durante estes anos.

Aos meus pais por depositarem sua confiança e incentivo em minha carreira. Obrigado pelo amor e carinho;

A minha irmã, exemplo de pessoa, pela amizade e companheirismo;

À Universidade Federal de Uberlândia, em particular ao Instituto de Genética e Bioquímica:

À Dr. Elisângela de Paula Silveira-Lacerda pela ajuda e por ceder a linhagem celular. Obrigado por sua confiança e credibilidade. Obrigado pelas oportunidades, pois através delas pude crescer como pesquisador;

Ao professor Paulo Eugênio por permitir o uso das dependências de seu laboratório;

Ao Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais pela manutenção da linhagem celular e por fornecer os animais experimentais;

À amiga Miriam Machado pela ajuda e companheirismo. Durante nossa convivência pude aprender muito com você;

À amiga Carla Menezes pelos ensinamentos e apoio. Muito obrigado por sua ajuda e pela oportunidade que me deu durante seu mestrado;

À amiga Sabrina pela grande amizade e paciência. Obrigado por me ensinar as primeiras técnicas de citogenética e pelo companheirismo nos congressos e festas;

À grande companheira e mãe de laboratório Alessandra Ribeiro Torres-Mariano. Obrigado pela paciência e pelo enriquecimento científico;

Às amigas Ana Carolina Humanes e Juliana Cheschine pela amizade e ajuda nos experimentos;

Aos amigos do Laboratório: Roberto, Roosevelt, Luiz guilherme, Leticia e José Clidenor. Obrigado pela amizade e pelos momentos felizes compartilhados;

À grande amiga Elaine por seu companheirismo, paciência e compreensão;

Aos amigos do curso de Biologia, em especial às amigas Beatriz, Flaviana, Juliana, Liliane, Renata e Regina. Obrigado pelo apoio e incentivo;

RESUMO

O câncer é a segunda causa principal de óbito no mundo, sendo responsável por mais de 60 milhões de mortes anualmente. Esta doença é resultado de mutações genéticas cumulativas, que ao longo do tempo permitem que as células se proliferem descontroladamente, causando a patologia. Muitas alterações genéticas que ocorrem na carcinogênese podem ser visualizadas citogeneticamente, e esta área do conhecimento pode fornecer dados importantes sobre diagnóstico, prognóstico e direcionamento do tratamento de diversos tipos de tumores. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar citogeneticamente a linhagem de células tumorais de camundongos Sarcoma 180. Foram utilizadas técnicas convencionais de citogenética como coloração por Giemsa, banda C, banda G e identificação das Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs). Também foram utilizados tratamentos com diferentes enzimas de restrição e fluorocromos Cromomicina A₃ e Hoechst 33258. Foi definido um número modal de 68 cromossomos para a linhagem celular sarcoma 180. Também foram encontrados alguns cromossomos marcadores, sendo eles três cromossomos metacêntricos e quatro “microcromossomos”. Foi observado um aumento na atividade das NORs. Alguns estudos de genética e citogenética molecular podem esclarecer algumas características genéticas desta linhagem celular.

Palavras Chave: Sarcoma 180; Citogenética; *Mus musculus*.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	1
1.2 Citogenética do câncer	4
1.3 Heterocromatina constitutiva	5
1.4 Regiões organizadoras de nucléolos – NORs	6
1.5 Sarcoma 180	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos gerais	11
2.2 Objetivos específicos	11
3. JUSTIFICATIVA	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Animais experimentais	13
4.1.1 Manutenção das células tumorais	13
4.1.2 Células normais de camundongos	14
4.2 Obtenção de cromossomos mitóticos	15
4.3 Montagem dos cariótipos	16
4.4 Detecção da heterocromatina constitutiva	16
4.4.1 Banda C	16
4.4.2 Coloração diferencial por hoechst 33258	17
4.4.3 Técnica de coloração com cromomicina	17
4.4.4 Técnica de bandamentos por endonucleases de restrição	18
4.5 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)	18
4.6 Banda G	19
5. RESULTADOS	20
5.1 O número modal de cromossomos de Sarcoma 180	20
5.2 Cariótipo do Sarcoma 180	22
5.3 Localização da heterocromatina constitutiva	24
5.3.1 Banda C	25
5.3.2 Endonucleases de restrição	26
5.4 Fluorocromos base-específicos	31
5.4.1 Cromomicina A ₃	31
5.4.2 – Hoechst 33258	33

5.5 Banda G	33
5.6 Regiões organizadoras do nucléolo (NORs).....	35
6. DISCUSSÃO	38
7- CONCLUSÕES	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

cópias de um ou mais genes, mudança na expressão gênica ou mudança na estrutura dos genes, alterando a sequência da proteína correspondente. Estas mudanças genéticas podem causar um aumento ou diminuição da atividade protéica ou pode criar uma proteína alterada com uma nova função (SAUNDERS et al., 2000).

À medida que as células neoplásicas permanecem agrupadas numa única massa celular, o tumor é considerado benigno. Um tumor é denominado câncer somente se for maligno, ou seja, se suas células tiverem a habilidade de escapar da massa inicial através de vasos sanguíneos ou linfáticos, invadindo tecidos vizinhos e formando tumores secundários ou metástases (ALBERTS et al., 1994).

Todo o câncer maligno apresenta, pelo menos, seis habilidades especiais: (1)- crescimento mesmo na ausência de sinais de “avance” normais. A maior parte das células esperam por uma mensagem antes de iniciar a divisão, enquanto as células cancerígenas simulam suas próprias mensagens pró-crescimento (2)- crescimento apesar dos comandos de “pare” emitidos pelas células vizinhas. Ao se expandir, o tumor comprime o tecido adjacente que emite mensagens químicas as quais levariam a um bloqueio da divisão celular. Células malignas ignoram os comandos. (3)- Evasão de mecanismos autodestrutivos (apoptose). (4)- habilidade para estimular a construção de vasos sanguíneos (angiogênese). À medida que o tumor se distancia da fonte de nutrientes, a massa de células necessita dos vasos para fornecer os nutrientes necessários para sua sobrevivência. (5)- imortalidade efetiva, se dividindo constantemente sem entrar em senescência. Para conseguir essa habilidade, as células neoplásicas trabalham em torno de sistemas, como os telômeros, forçando o limiar reprodutivo. (6)- poder invadir tecidos e se espalhar por outros órgãos formando metástases (GIBBS, 2003).

As alterações genéticas mais importantes nas células cancerígenas ocorrem nos genes que controlam a proliferação celular (proto-oncogenes e genes supressores tumorais),

características histológicas de um tumor coincidem com as características de outros tumores, impossibilitando sua diferenciação com métodos histológicos. Por exemplo, é difícil diferenciar o liposarcoma “myxoid” de outros tipos de liposarcomas. A descoberta da translocação t(12;16) facilitou a diagnose deste tipo de sarcoma. Alguns tipos de leucemias, particularmente as do tipo agudas, são freqüentemente caracterizadas por eventos cromossômicos específicos, possibilitando a diferenciação em subtipos distintos (CASARTELLI, 1993).

1.3 Heterocromatina constitutiva

Heterocromatina constitutiva é a heterocromatina que ocorre em porções homólogas do par cromossômico, que apresentam heteropiconose, composta, em grande parte, por DNA altamente repetitivo. Acredita-se que esse DNA não seja codificante. A heterocromatina constitutiva é permanentemente não transcrita e não um caso de repressão da atividade gênica. Este tipo de heterocromatina também é chamado de DNA satélite, pois se apresenta em uma banda diferenciada da eucromatina quando centrifugada em gradiente diferencial de cloreto de céσιο (PIECZARKA; MATTEVI, 1998). As regiões heterocromáticas ou de DNA satélite em camundongos (*Mus musculus*) são localizadas próximo a regiões centroméricas em todos os cromossomos autossômicos e no X. O cromossomo Y possui pouca ou não detectável banda-C (MILLER, 1975; BALDEV; WILLCOURT, 1998).

Através do método de banda-C, o DNA é, preferencialmente, eliminado das regiões eucromáticas, portanto estas não se apresentam tão fortemente marcadas como a heterocromatina após a coloração com Giemsa (COMINGS, 1973). Como a composição da heterocromatina constitutiva é bastante variável e a banda-C não revela a composição de bases nitrogenadas, é necessário que se utilize outras técnicas que identifiquem as diferentes classes de heterocromatina (MANTOVANI et al., 2004).

As técnicas de coloração por fluorescência têm fornecido dados sobre a composição das heterocromatinas, alguns deles são capazes de se ligar especificamente a certos pares de bases do DNA. A utilização de fluorocromos G-C específicos, tal como Mitramicina e Cromomicina A₃, permitem informações sobre a localização das seqüências de DNA “ricas” nestes pares de bases. Já os fluorocromos DAPI, quinacrina e Hoechst 33258 produzem informações sobre seqüências de DNA “ricas” em bases A-T, uma vez que se ligam preferencialmente a essas regiões. As regiões heterocromáticas associadas às NORs foram constatadas como sendo regiões “ricas” em bases G-C (SCHMID, 1988). Em peixes, fluorocromos têm sido frequentemente utilizados para a análise das regiões organizadoras do nucléolo, uma vez que estas regiões estão associadas à heterocromatina constitutiva (ARTONI; BERTOLLO, 1999).

Cromossomos metafásicos, fixados com metanol / ácido acético e secados ao ar, são susceptíveis à enzimas de restrição (DNAses). Estudos feitos por Miller (1983 apud VERMA; BABU, 1995) utilizando um número de endonucleases de restrição revelaram que cromossomos tratados com algumas enzimas reconhecem seqüências específicas no cromossomo, que ao ser corado com Giemsa apresenta um padrão de coloração diferencial, característico para cada cromossomo. O padrão de coloração produzido por cada enzima de restrição é muito característico e facilmente reprodutível, fornecendo a oportunidade de usar essas enzimas para entender a natureza e características da porção de heterocromatina constitutiva do genoma (VERMA; BABU 1995)

1.4 Regiões organizadoras de nucléolos – NORs

NORs são regiões que estão associadas aos nucléolos e têm a responsabilidade de reorganizá-los ao final da divisão celular. Abrigam o DNA ribossômico (DNAr), a partir do qual é transcrito o RNA ribossômico - RNAr (Heitz, 1931 apud BICUDO, 1985). Em

eucariotos, regiões organizadoras de nucléolos são formadas por cístrons repetidos em *tandem*. Esses genes, chamados ribossômicos, apresentam uma região responsável pela transcrição do RNA ribossômico precursor, o qual possui 3 segmentos que formarão os RNAr 18S, 5.8S e 28S. Os segmentos estão intercalados por uma região chamada espaçador intergênico (IGS), que transcreve um RNA instável e por isso é abortado. Os espaçadores são eliminados durante a organização das moléculas precursoras de RNAr, em função disso tamanho e a organização das seqüências de bases desses segmentos variam inter e intraespecificamente. As regiões que codificam o RNAr 18S, 5.8S e 28S são mais conservadas (MESTRINER, 1993). O gene 5S é transcrito em sítios independentes, não possuindo um sítio constante para sua transcrição (GUERRA, 1988).

As regiões organizadoras de nucléolos são facilmente evidenciadas pela técnica de impregnação com o nitrato de Prata. Por ser uma técnica simples, rápida e barata, ela tem sido amplamente utilizada pelos citogeneticistas. A Prata se liga, preferencialmente, às regiões 18S e 28S dos cístrons ribossômicos. Estudos citoquímicos mostram que a Prata pode se ligar no DNAr ou no RNAr transcrito, mas tem preferência por proteínas especiais associadas ao RNAr recém transcrito nos sítios de DNAr. Tais proteínas são não-histônicas, de natureza ácida (Moreira-Filho, 1983 apud TORRES-MARIANO, 2003).

Essa técnica pode ser utilizada na visualização da atividade do gene no sítio de DNAr. A impregnação pela Prata não acontece em todos os sítios de DNAr, apenas nos que estão transcricionalmente ativos ou que já estiveram ativos e ainda tem resíduos de RNAr associado à proteínas, presos em torno de cístrons de DNAr condensados. A não impregnação pela Prata em torno da NOR pode indicar que o cístron de DNAr não transcreveu RNAr e, por isso, não há RNAr associado àquelas proteínas. Para confirmar esse fato, foram feitos tratamentos com DNase e/ou RNase e os resultados não apresentaram alterações quanto à presença da

marcação pela Prata, porém quando o tratamento é feito com proteases, a marcação é completamente bloqueada (SCHWARZACHER et al., 1978).

As NORs apresentam variabilidade, permitindo diferenciar espécies, linhagens e, às vezes, até indivíduos de uma mesma linhagem. Entre os aspectos variáveis das NORs estão incluídos o número, a localização, a atividade, o tamanho e a organização das seqüências do DNA ribossômico. Cada espécie apresenta um número de cromossomos portadores de NOR característico (BICUDO, 1985). Quando a impregnação pela Prata está presente em apenas um par de cromossomos, dizemos que a NOR é simples, sugerindo atividade gênica anterior à divisão celular, em apenas um sítio, porém, se mais de um par cromossômico a apresenta ela é chamada múltipla. A variação de tamanho pode ser explicada pela alteração na quantidade de DNAr presente, por sua atividade transcricional diferenciada em intérfases precedentes ou pelos dois casos. A variação numérica das NORs, também, pode ser explicada por diferença na atividade dos cístrons ribossômicos, por redução nessa atividade ou mesmo pela falta de DNAr (Moreira-Filho, 1983 apud TORRES-MARIANO, 2003).

Os nucléolos presentes em uma célula podem indicar o número de regiões que os organizam. No entanto, observa-se, às vezes, uma quantidade de nucléolos inferior as suas regiões organizadoras, devido à possíveis associações entre elas ou à desativação de algumas delas (Moreira-Filho, 1983 apud TORRES-MARIANO, 2003). Durante o processo de divisão celular, enquanto os cromossomos duplicados vão se condensando, o nucléolo vai desaparecendo, porque os genes ribossômicos estão interrompendo sua atividade. Assim, em metáfase, os nucléolos não são evidenciados, apenas as NORs podem ser visualizadas sob impregnação pela Prata (MESTRINER, 1993).

Os genes que codificam para RNA ribossômico (DNAr) de camundongos possuem de 100 a 200 cópias no genoma e as regiões organizadoras do nucléolo (NORs) são distribuídas em diversos cromossomos (Winking et al., 1980 apud SUZUKI, 1990). Segundo Dev et al.

(1977) *Mus musculus*, com 40 cromossomos acrocêntricos, possui NORs nos menores cromossomos autossômicos 12, 15, 16, 17, 18 e 19, no entanto Suzuki et al. (1990) encontrou NORs em cinco novos loci nos cromossomos 4, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 e 19 perto das regiões centroméricas. Essas diferenças são explicadas por eventos envolvidos na homogeneização de DNAr intra- e intercromossômica e pelo fato dos camundongos (*M. musculus*) possuírem alta heterogeneidade genética, caracterizada pelo desenvolvimento de populações parcialmente isoladas.

1.5 Sarcoma 180

O Sarcoma 180 (S-180) ou Tumor de Crocker é um tumor indiferenciado que foi encontrado em camundongos machos, em 1914. Estudos de microscopia eletrônica mostram contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando ser esta neoplasia, um carcinoma. No entanto, outros estudos demonstraram que suas células não produzem laminina, o que não permite sua caracterização como de origem epitelial. O nome Sarcoma 180 ficou consagrado na literatura. Histologicamente, apresenta-se como massa sólida formada por células poliédricas de citoplasma basófilo e núcleo central, arranjadas em ninhos ou cordões (ZUCKERBERG, 1973).

O pleomorfismo é acentuado. Há estroma conjuntivo vascularizado, circundando e permeando o tumor, freqüentemente, há necrose central. Após sucessivos implantes subcutâneos, o padrão histológico torna-se misto apresentando aspecto tanto de carcinoma como de sarcoma. O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

Pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados, havendo regressão natural em

8% a 10% destes. Em geral ocorre ulceração da pele ao redor do 28º dia após a inoculação subcutânea e os animais morrem, em geral, entre o 28º e o 30º dia. Dependendo da forma de inoculação das células de sarcoma 180 no animal, esse tumor pode se desenvolver como um tumor sólido (subcutânea ou intramuscular) ou tumor ascítico (intraperitoneal) (ZUCKERBERG, 1973).

Estudos anteriores demonstraram número modal de cromossomos igual a 73. Também foram encontrados três cromossomos resultantes de translocações, os quais foram denominados marcadores A, B e C. O marcador A é um cromossomo com dois braços. Através do padrão de banda-G, foi verificado que o braço maior deste marcador é derivado do cromossomo 6 e o braço menor, provavelmente, do cromossomo 9. A técnica de banda-C revelou dois blocos heterocromáticos, próximos um do outro, localizados na região central do cromossomo (GHOSH; CHAUDHURI, 1984).

No marcador B, foram encontrados dois blocos heterocromáticos nas regiões terminais do cromossomo. Provavelmente, os cromossomos 9 ou 10 e 13 estão envolvidos nesta translocação. O marcador C, também, apresentou dois blocos heterocromáticos, um na região terminal e outro na região intersticial, próximo ao fim do cromossomo. O padrão de banda-G indica que os cromossomos 14 e 19 podem estar envolvidos nesta translocação (GHOSH; CHAUDHURI, 1984).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo fazer a análise da evolução cariotípica da linhagem de células tumorais sarcoma 180. Foi realizada a comparação cromossômica destas células tumorais com as células normais de camundongos, para verificar a ocorrência de alterações citogenéticas nessa linhagem celular.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção de cromossomos metafásicos de sarcoma 180 e de células normais de camundongos;
- Determinar o número modal de cromossomos desta linhagem celular;
- Identificar as regiões organizadoras do nucléolo (NORs), através da técnica de impregnação com nitrato de prata;
- Identificar a heterocromatina constitutiva com o auxílio das técnicas que evidenciam este tipo de heterocromatina;
- Comparar os cromossomos destas células neoplásicas com as células normais de camundongo.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente o câncer é a segunda causa de morte por doenças, perdendo apenas para as doenças cardíacas. O surgimento das células cancerígenas está intimamente relacionado com mutações e mudanças na estrutura cromossômica, o que viabiliza seu estudo citogenético. Estudos citogenéticos auxiliam no entendimento da origem e evolução de um tipo de tumor. Os dados citogenéticos podem ser utilizados na classificação e diagnóstico de um tumor, além de fornecer informações sobre o desenvolvimento da doença (prognóstico). O sarcoma 180 é muito utilizado em diversas áreas biomédicas que trabalham com cultura de células, porém, não foram encontradas informações citogenéticas no banco de dados do American Type Culture Collection (ATCC) sobre esta linhagem celular. É muito importante o acompanhamento da evolução cariotípica de uma linhagem celular, com o propósito de verificar se a mesma está mantendo suas características iniciais ou se está passando por um processo de mutação e seleção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises foram desenvolvidos no Laboratório de Citogenética Animal, do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia.

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, fornecidos gentilmente pela Pentapharm Brasil, com aproximadamente 3 semanas de idade e massa variando de 20 a 30g. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal, da Universidade Federal de Uberlândia com ração e água filtrada fornecida *ad libitum*, à temperatura ambiente.

4.1.1 Manutenção das células tumorais

O tumor líquido ascítico denominado Sarcoma 180 (ATCC – TIB66) foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais (INGEB), da Universidade Federal de Uberlândia. Para inocular o tumor nos animais, as células de sarcoma 180 são descongeladas e centrifugadas a 700rpm, por 5min, a 4°C. Uma alíquota do sedimento celular é utilizada para contagem e teste de viabilidade celular com o corante vital Azul de Tripam. O teste consiste em misturar iguais quantidades de suspensão contendo células tumorais e de corante. A mistura é colocada na Câmara de Neubauer e levada ao microscópio óptico para a contagem celular total e das células coradas em azul, que são as células não viáveis. De acordo com a contagem, a concentração de células viáveis é ajustada com solução de NaCl 1mM estéril, tamponada (PBS), para 5×10^7 células por ml. Somente as soluções cuja viabilidade celular é acima de 95% são utilizadas. O volume de 0,1 ml é, então, inoculado por via intraperitoneal (i.p.) em cada camundongo.

Os camundongos foram mantidos em diferentes tempos de progressão do tumor, com o intuito de verificar se existe alguma diferença citogenética nestes diferentes estágios. A medida que as células vão se dividindo, provocam uma dilatação na cavidade intraperitoneal dos animais (Figura 1), pressionando os órgãos do animal, muitas vezes causando hemorragia. Os camundongos inoculados não foram mantidos por mais de 21 dias para evitar o sofrimento dos mesmos. Os animais foram sacrificados com 7, 14 e 21 dias depois do inóculo do tumor e as células de sarcoma 180 foram coletadas.

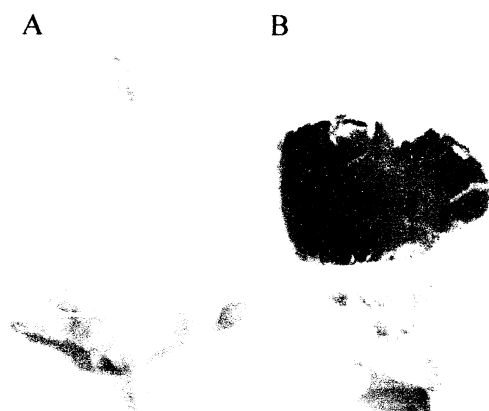


Figura 1 – Fotografia de camundongos Swiss machos inoculados com sarcoma 180. (A) - A região demarcada em laranja demonstra uma dilatação da cavidade intraperitoneal, causada pelo aumento progressivo de células tumorais. (B) - Fotografia de um animal com a pele dissecada, evidenciando o aumento no abdome.

4.1.2 Células normais de camundongos

As células normais utilizadas na análise comparativa com células tumorais foram retiradas de camundongos Swiss machos. As células eram retiradas da medula de ossos longos do animal, como o Fêmur e a Tíbia ou do baço. Estes órgãos foram escolhidos, por

possuírem um alto índice de divisões celulares, facilitando a obtenção de células em metáfases.

4.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

A técnica apresentada foi descrita por Guerra (2002) com algumas modificações.

1. Injetar, intra-peritonealmente, colchicina a 0,2%, na proporção de 1 ml/100g de peso do animal;
2. Deixar o animal na gaiola por 2 horas;
3. Dissecar o animal e retirar as células desejadas. Para obter as células de sarcoma 180, foi utilizada uma seringa hipodérmica e aspirou-se as células do tumor ascítico, localizado no peritônio do camundongo. Para obter células de camundongos normais, a medula óssea foi retirada cortando-se a epífise de ossos longos e injetando meio de cultura. Células do baço também foram utilizadas;
4. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 8 a 10 ml de solução hipotônica de KCl a 0,075M;
5. Colocar a suspensão obtida a 36-37 °C, durante 20 minutos;
6. Ressuspender o material com bastante cuidado, com auxílio de uma pipeta Pasteur, e transferir a suspensão obtida para um tubo de centrifuga;
7. Acrescentar 1 ml de fixador (álcool metílico: ácido acético- 3:1) recém preparado. Ressuspender novamente o material e centrifugar por 10 minutos a 900 rpm, descartando o sobrenadante com pipeta Pasteur;
8. Adicionar, vagarosamente, 5-7 ml de fixador recém preparado, deixando escorrer através das paredes do tubo;
9. Suspender novamente o material, cuidadosamente, com auxílio da pipeta Pasteur;

8. Incubar as lâminas numa solução salina de 2x SSC, aquecida por 45 minutos a 60°C;
9. Lavar em água deionizada e secar ao ar;
10. Corar com Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH 6,8, durante 30 minutos;
11. Lavar em água deionizada e secar ao ar.

4.4.2 Coloração diferencial por Hoechst 33258

A técnica a seguir foi descrita por Verma e Babu (1995).

1. Corar as lâminas contendo os cromossomos mitóticos com uma solução de Hoechst 33258 (0,5 µg/ml) por 10 minutos no escuro, em estufa 37 °C.
2. Lavar as lâminas com água destilada e secar ao ar livre.
3. Colocar a solução de montagem da lamínula (fosfato de sódio Na₂HPO₄ 0,2M, pH 7,5)
4. Analisar as lâminas em microscópio de fluorescência Zeiss com comprimento de onda de 360 a 400 nm.

4.4.3 Técnica de coloração com cromomicina

A técnica apresentada foi descrita por Schmid (1980).

1. Sobre a lâmina, preparada segundo a técnica descrita por Guerra (2002) para cromossomos mitóticos, colocar cerca de 100µl de solução de distamicina, 0,3mg/ml, utilizando uma micropipeta;
2. Cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina em água corrente e deixar a lâmina em tampão McIlvaine por 5 minutos. Deixar secar ao ar;
3. Colocar 100µl da solução de cromomicina A3 (dissolver 0,5mg de cromomicina em 1ml de tampão McIlvaine e adicionar 5mM de Cloreto de magnésio, deixar a cromomicina dissolver lentamente na geladeira por alguns dias), com auxílio de uma micropipeta, sobre a lâmina, cobrir novamente com uma lamínula e deixar corando por 60 minutos no escuro;

4. Escorrer a lamínula e lavar a lâmina, em água corrente, em jatos fortes, 1 minuto e depois deixá-la em tampão McIlvaine por 5 minutos;
5. Deixar a lâmina secar ao ar e montá-la com uma nova lamínula, utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso;
6. Deixar a lâmina guardada à temperatura ambiente, no escuro, por no mínimo 15 dias antes de analisá-la (para aumentar a estabilidade do fluorocromo) em fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss, com filtro 450-490nm (zona de excitação do azul).

4.4.4 Técnica de bandamentos por endonucleases de restrição

A técnica utilizada foi descrita por Mezzanotte et al. (1983) com algumas modificações.

1. Estabelecer a concentração desejada da enzima. Foi utilizado 0,8 U/ μ l para a enzima *Dde* I (5'...C \downarrow TNAG...3'); 2,0 U/ μ l para *Bam* HI (5'...G \downarrow GATCC); 0,6 U/ μ l para a enzima *Taq* I (5'...T \downarrow CGA...3'); 2,0 U/ μ l para a enzima *Hinf* I (5'...AG \downarrow CT...3') e 0,3 U/ μ l para a enzima *Alu* I (5'...AG \downarrow CT...3');
2. Colocar em tubo Eppendorf, no gelo, 27 μ l de água destilada, 3 μ l de tampão da enzima e o volume necessário de enzima para atingir a concentração desejada (para cada lamina a ser tratada);
3. Usar lâminas pingadas no dia anterior ou preparadas a mais tempo, mantidas no freezer e descongeladas na véspera; dar preferência às preparações que estejam mais limpas e livres de citoplasma;
4. Pingar 30 μ l da solução da enzima em cada lâmina, cobrir com lamínula e incubar a 37°C.

4.5 Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (NORs)

Técnica de impregnação por nitrato de Prata (HOWELL; BLACK, 1980).

1. Pingar sobre a lâmina, preparada conforme a técnica adotada para cromossomos mitóticos, 25µl de solução aquosa de gelatina a 2% (acrescida de ácido fórmico na proporção de 1ml para cada 100ml de solução);
2. Adicionar 50µl de solução aquosa de nitrato de Prata a 50% e 25µl de água deionizada . Misturar bem e cobrir com lamínula;
3. Incubar em estufa a 60oC, por um período de, aproximadamente, 5 minutos, dependendo de um monitoramento de coloração da lâmina e dos cromossomos ao microscópio;
4. Após o tempo apropriado, quando os cromossomos assumem uma tonalidade amarelada e as NORs e os nucléolos uma coloração preta ou marrom, lavar em água deionizada, possibilitando que a lamínula seja retirada naturalmente pela própria água.

4.6 Banda G

1. Tratar a lâmina com solução de tripsina a 0,05% de 1 a 3 segundos;
2. Corar com Giemsa 10% por 10 minutos.

5. RESULTADOS

5.1 O número modal de cromossomos de Sarcoma 180

Cada espécie possui um número cromossômico característico, sendo que em camundongos (*Mus musculus*) o número de cromossomos é 40. Células tumorais apresentam números cromossômicos diferentes do organismo onde se encontra (Figura 2), uma vez que são resultantes de mudanças genéticas. Para determinar o número modal de cromossomos de Sarcoma 180, foram analisadas 354 metáfases. As células foram coletadas em diferentes estágios de progressão tumoral: 7, 14 e 21 dias após a inoculação das células tumorais nos animais. Há uma pequena variação no número modal de cromossomos de um estágio de desenvolvimento para outro. Enquanto células coletadas ao 7º dia de desenvolvimento do tumor apresentam número modal de 70 cromossomos, as células retiradas no 14º e 21º dias apresentam número modal de 68 cromossomos (Figura 3).

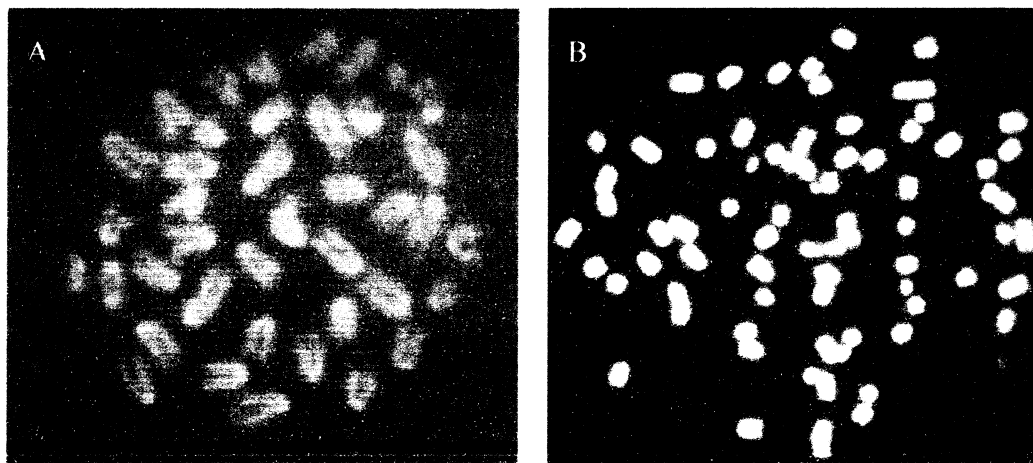


Figura 2 – (A) – Metáfase normal de camundongo apresentando 40 cromossomos acrocêntricos. (B) – Metáfase de sarcoma 180 com número anormal de 66 cromossomos.

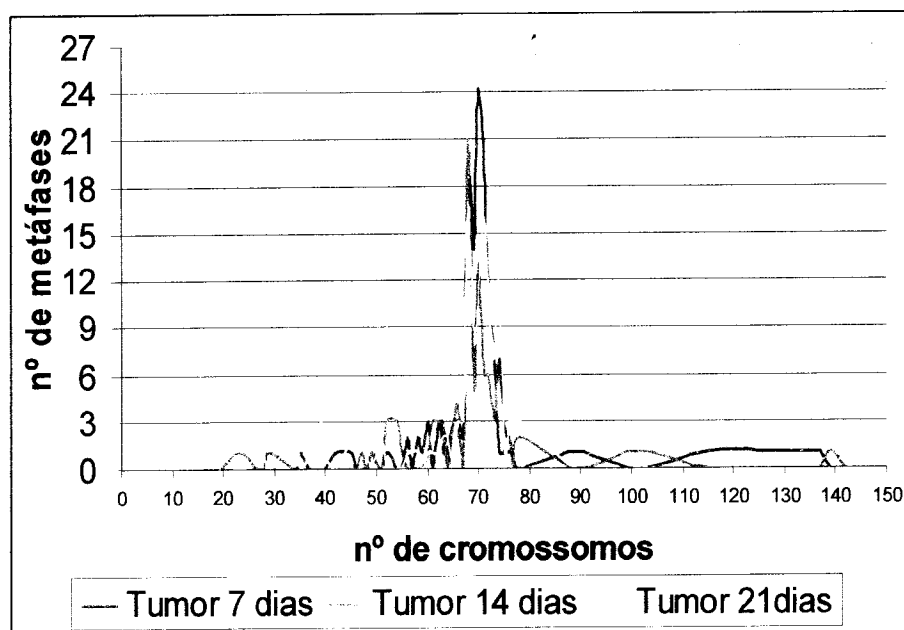


Figura 3 – Gráfico das frequências do número modal dos cromossomos de Sarcoma 180 em diferentes estágios de progressão do tumor.

A diferença entre os números cromossômicos mais frequentes é muito pequena em todos os estágios de progressão do tumor, variando de 68 a 74 cromossomos que, juntos, representam 68,7 % das metáfases analisadas. No entanto, o teste estatístico de Kruskal-Wallis, com nível de confiança de 95 %, indica que não há diferença significativa entre 68 e 70, para o número modal de cromossomos de tumores com 7 dias de desenvolvimento.

Quando todos os dados são agrupados, desconsiderando-se o estágio de desenvolvimento tumoral, o número modal de cromossomos é 68, que representa 16,5% das metáfases analisadas (figura 4).

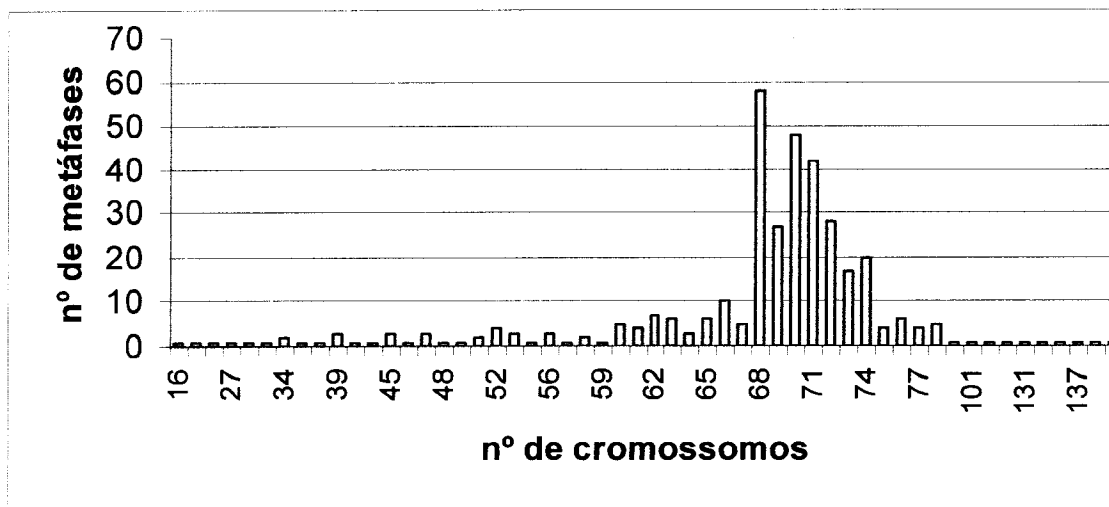


Figura 4 - Gráfico das frequências do número modal dos cromossomos da linhagem de células tumorais Sarcoma 180, desconsiderando os estágios de progressão tumoral.

5.2 Cariótipo do Sarcoma 180

Como o número modal de cromossomos desta linhagem celular varia de 68 a 72 e a grande maioria das células é aneuploide, não existe um padrão cariotípico estável para todos os pares de cromossomos. Alguns são, mais frequentemente, encontrados em condições de diploidia ou tetraploidia que os demais.

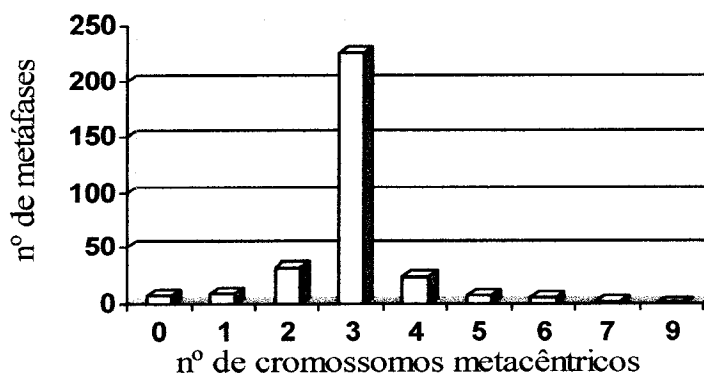


Figura 5 - Gráfico da frequência dos números de cromossomos metacêntricos observados em Sarcoma 180 inoculado em camundongos Swiss.

Em todas as metáfases analisadas foram encontrados alguns tipos de cromossomos que foram denominados marcadores desta linhagem celular. Na maioria delas verificou-se o aparecimento de três cromossomos metacêntricos (Figura 5) de tamanhos diferentes. Ocorrem, também, nas metáfases, cromossomos com tamanho inferior aos menores pares cromossômicos do complemento. Estes cromossomos foram denominados “microcromossomos”, uma vez que os resultados de banda C e fluorocromos confirmam a presença de um centrômero, sendo mais frequentemente visualizados em número de três a quatro (figura 6).

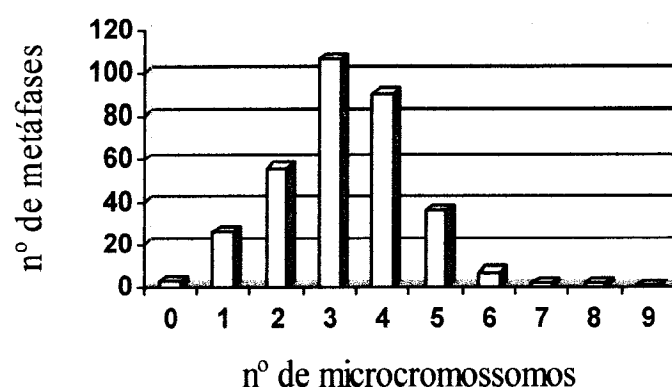


Figura 6 – Gráfico da freqüência dos números de “microcromossomos” observados em Sarcoma 180 inoculado em camundongo Swiss.

Apesar do fato de a linhagem de células tumorais Sarcoma 180 não possuir um número cromossômico constante e o número de homólogos variar de uma célula para outra, foi montado um cariótipo representativo para estas células neoplásicas (figura 7).

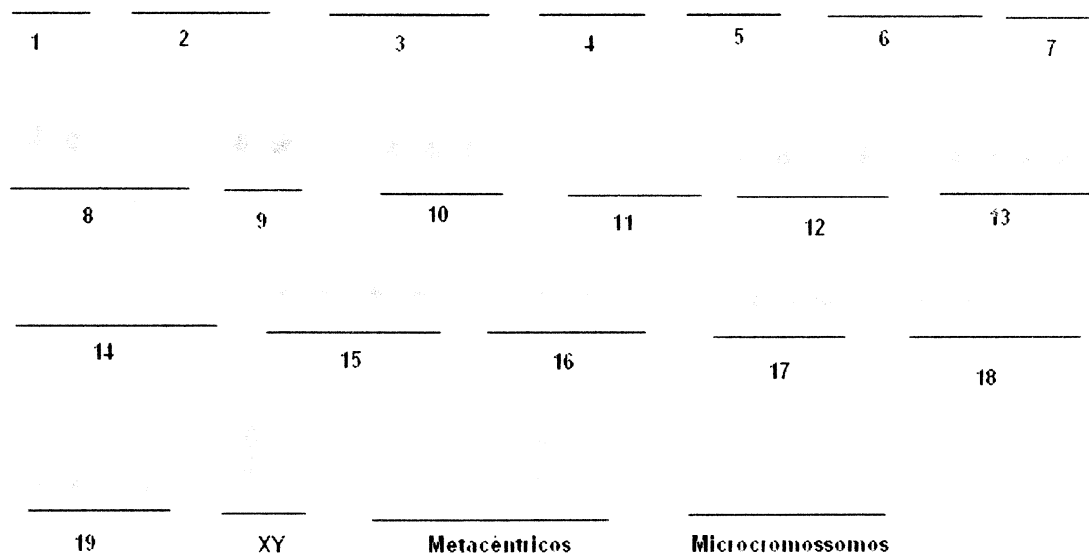


Figura 7 – Cariótipo representativo da linhagem de células tumorais de camundongo (*Mus musculus*) Sarcoma 180 com coloração Giemsa convencional.

5.3 Localização da heterocromatina constitutiva

5.3.1 Banda C

A técnica de banda C revelou blocos de heterocromatina constitutiva localizados em regiões pericentroméricas de todos os cromossomos acrocêntricos, exceto o cromossomo Y, que possui pouca ou não detectável quantidade de heterocromatina constitutiva.

A linhagem tumoral Sarcoma 180 também apresentou o mesmo padrão de localização pericentromérica da heterocromatina constitutiva, no entanto, os cromossomos metacêntricos apresentaram grandes blocos heterocromáticos centroméricos. Apesar de algumas regiões heterocromáticas não serem facilmente visualizadas na figura, foi montado um cariótipo evidenciando este tipo de heterocromatina (Figura 8).

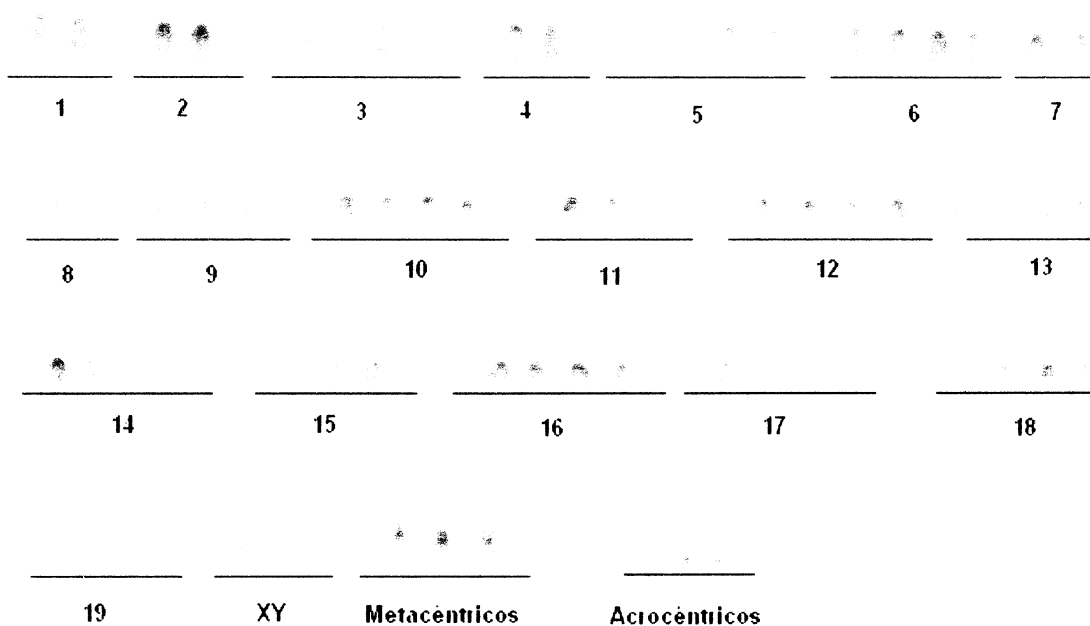


Figura 8 – Cariótipo da linhagem de células tumorais de camundongos (*Mus musculus*) Sarcoma 180 submetido à técnica de banda C. As regiões mais intensamente coradas correspondem aos blocos de heterocromatina constitutiva pericentromérica.

5.3.2 Endonucleases de restrição

As endonucleases são enzimas que “cortam” o DNA em regiões específicas, as seqüências palindrômicas, que variam de uma enzima para outra. O tratamento dos cromossomos com estas enzimas produz um padrão de bandas claras e escuras característico. As regiões cromossômicas mais claras são ricas na seqüência de bases nitrogenadas correspondente ao sítio de restrição da enzima utilizada, mostrando regiões mais digeridas. As regiões mais conservadas (menos digeridas) são coradas mais fortemente, pois não houve perda de DNA naquela região já que são regiões pobres na seqüência da enzima ou regiões “protegidas” por heterocromatina constitutiva.

***Dde* I**

A Enzima de restrição *Dde* I, extraída da bactéria *Desulfovibrio desulfuricans*, corta o DNA na seguinte seqüência específica: ...C|T N A G...



As lâminas contendo os cromossomos metafásicos de sarcoma 180 foram tratadas com *Dde* I e revelaram um padrão de bandas característico para cada cromossomo homólogo do complemento, facilitando o pareamento dos mesmos e a montagem de um cariótipo (Figura 10). Metáfases provenientes de células de camundongos normais, também, foram submetidas à digestão com *Dde* I (Figura 9), apresentando o mesmo padrão de digestão dos cromossomos de sarcoma 180. Foram encontradas marcações teloméricas, intersticiais e pericentroméricas em todas as metáfases, tanto de células normais quanto de Sarcoma 180.

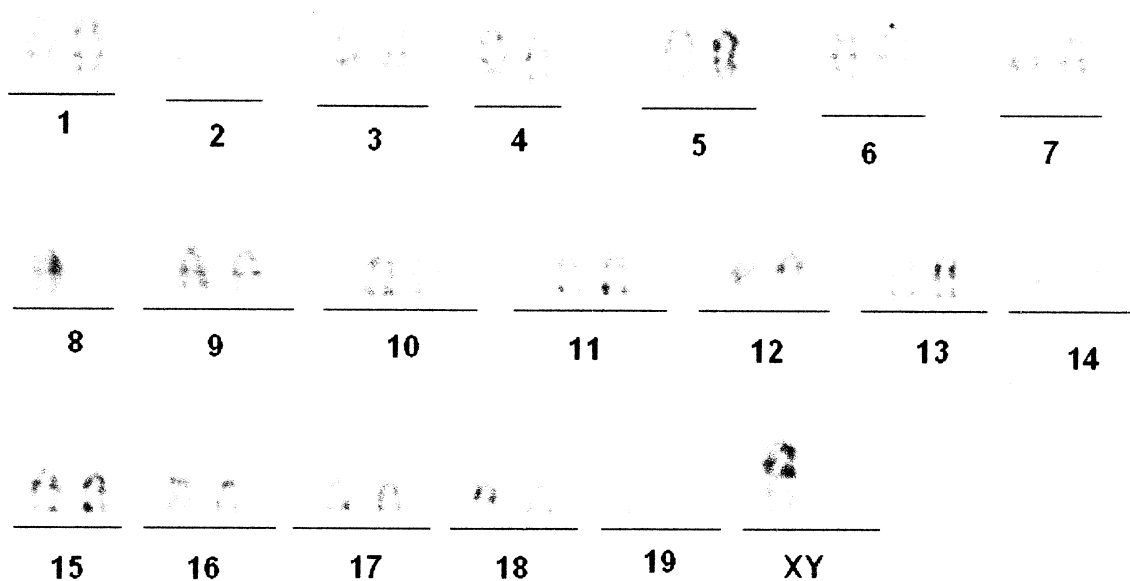


Figura 9 – Cariótipo de células normais de *Mus musculus* tratadas com *Dde* I.

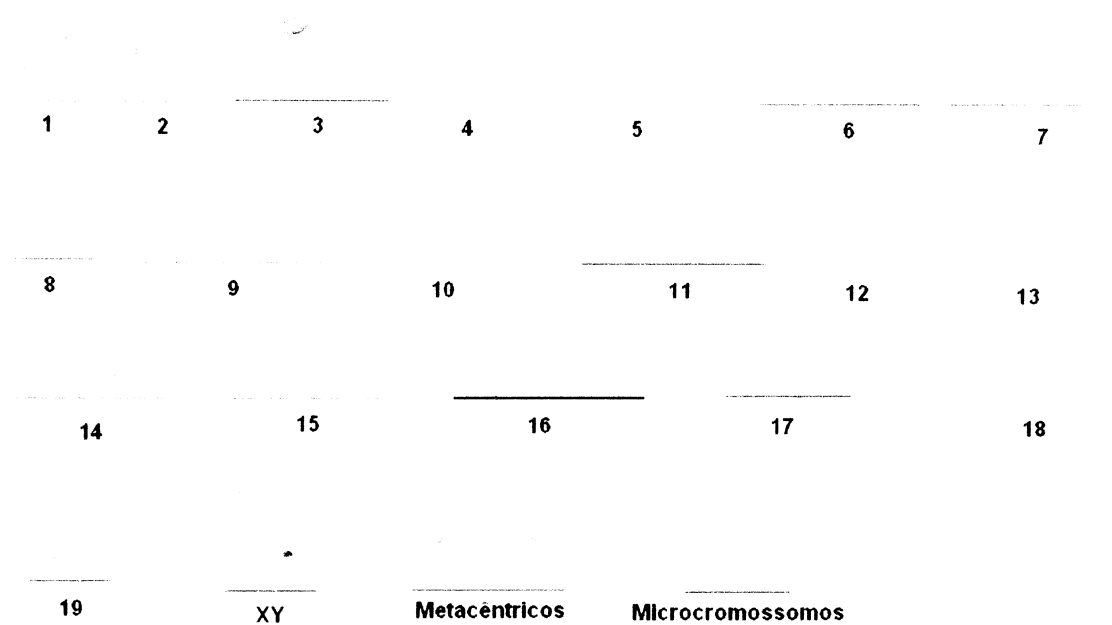


Figura 10 - Cariótipo da linhagem de células tumorais de camundongos (*Mus musculus*)

Sarcoma 180 tratado com a enzima de restrição *Dde* I.

EcoRI

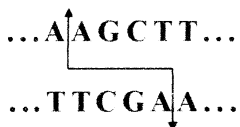
A enzima de restrição *EcoRI*, extraída da bactéria *Escherichia coli*, corta o DNA na seguinte seqüência específica: ...G|AATTC...



As lâminas contendo os cromossomos metafásicos de sarcoma 180 foram submetidas ao tratamento com essa enzima, produzindo blocos heterocromáticos localizados especificamente nas regiões pericentroméricas (Figura 11A). Os cromossomos metacêntricos, característicos desta linhagem celular, apresentaram grandes blocos centroméricos.

Hind III

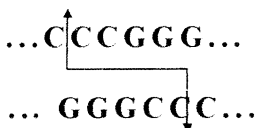
A Enzima de restrição *Hind III*, extraída da bactéria *Haemophilus influenzae*, corta o DNA na seguinte seqüência específica: ...A|AGCTT...



Os cromossomos metafásicos de Sarcoma 180 foram tratados com *Hind III* (Figura 11B), também produzindo alguns blocos heterocromáticos pericentroméricos. Em um dos cromossomos metacêntricos foram encontradas regiões teloméricas conservadas (mais fortemente coradas).

Apa I

A Enzima de restrição *Apa I*, extraída da bactéria *Acetobacter pasteurianus*, corta o DNA na seguinte seqüência específica: ...C|CCGGG...



Os cromossomos metafásicos de Sarcoma 180 foram tratados com *Apa I* (Figura 11C), produziu o mesmo padrão de marcação que a enzima *Hind III*.

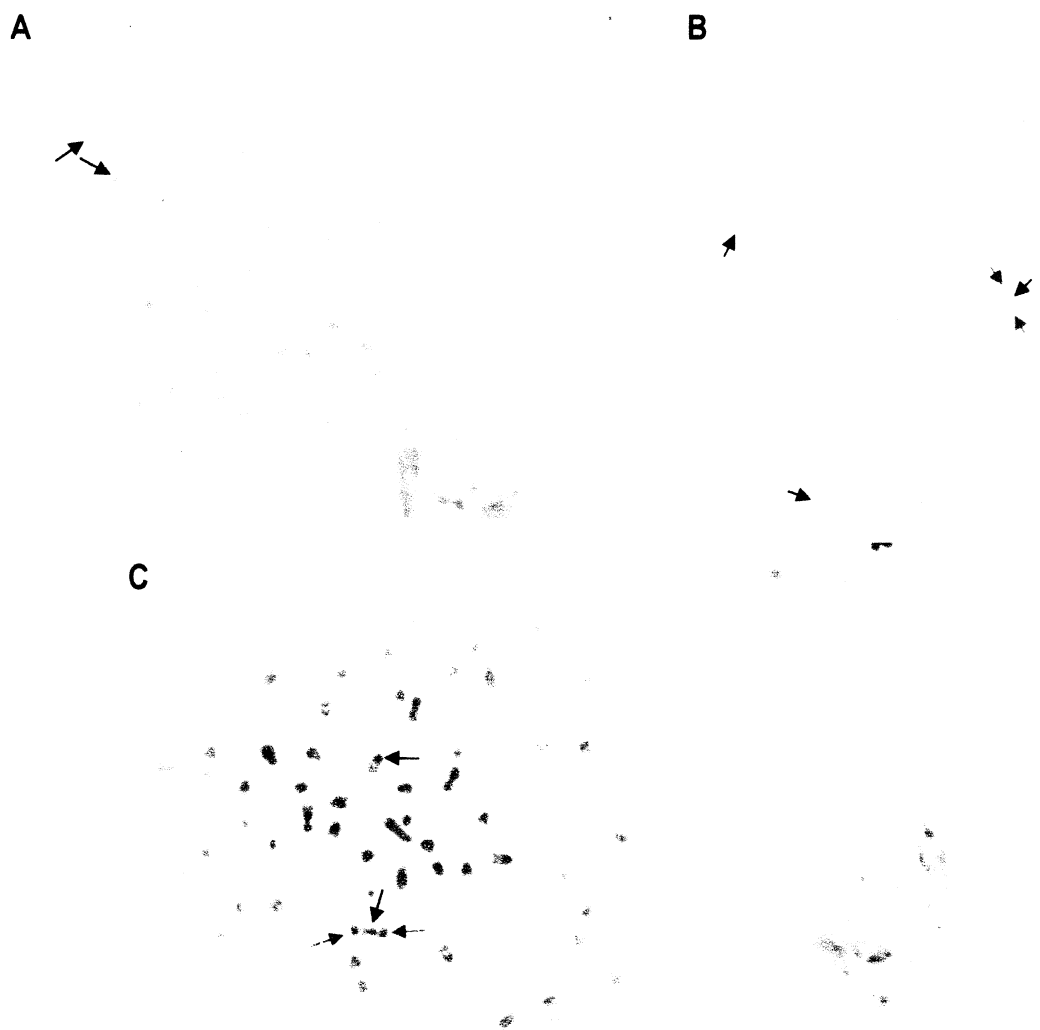


Figura 11 – Metáfases de Sarcoma 180 submetida ao tratamento com diferentes enzimas de restrição. (A) - *Eco* RI. As setas indicam regiões cromossômicas mais conservadas, compostas por heterocromatina constitutiva pericentromérica. (B) - *Hind* III. As setas pretas indicam regiões heterocronáticas pericentroméricas. As setas verdes idicam regiões teloméricas pobres na seqüência AAGCTT, característica de *Hind* III. (C) - *Apa* I. As setas pretas indicam regiões heterocronáticas pericentroméricas. As setas verdes idicam regiões teloméricas pobres na seqüência GGGCCC, característica de *Apa* I.

Bam HI

A Enzima de restrição *Bam* HI, extraída da bactéria *Brevibacterium albidum*, corta o DNA na seguinte seqüência específica: ...G|GATCC...



As lâminas contendo os cromossomos metafásicos foram submetidas a um tratamento com esta enzima de restrição, produzindo um padrão de bandas característico para cada cromossomo (Figura 14), facilitando assim a montagem do cariótipo. Assim como ocorreu no tratamento com *Dde* I, a digestão com *Bam* HI revelou marcações intersticiais, teloméricas e pericentroméricas.

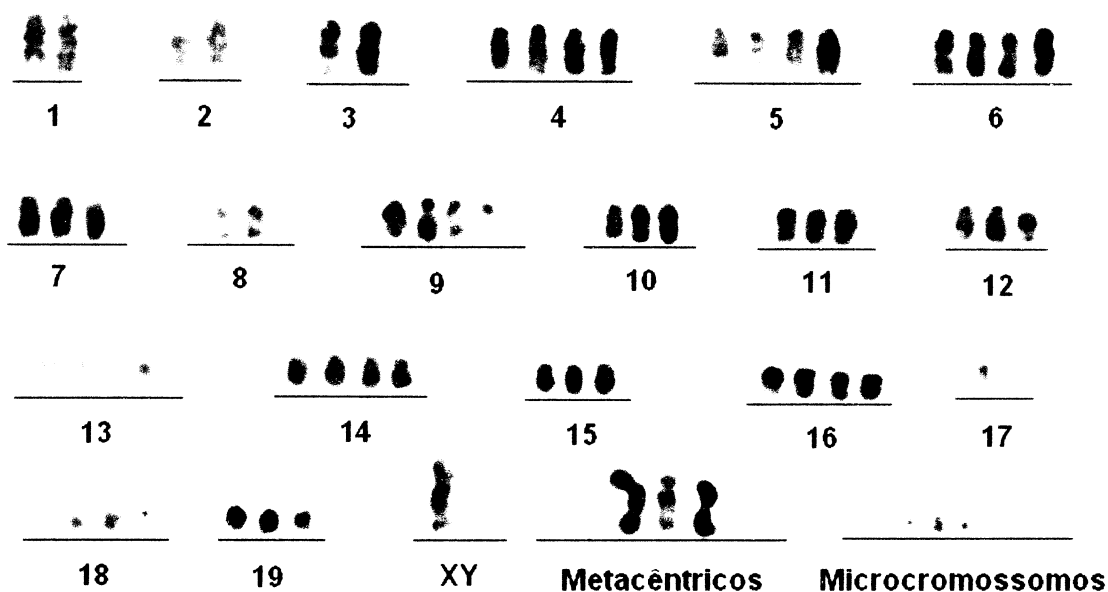


Figura 14 - Cariótipo da linhagem de células tumorais de camundongos (*Mus musculus*)

Sarcoma 180 tratado com a enzima de restrição *Bam* HI.

5.4 Fluorocromos base-específicos

5.4.1 Cromomicina A₃

Os cromossomos metafásicos de Sarcoma 180 e cromossomos de células normais de camundongos Swiss (*Mus musculus*) foram corados com o fluorocromo Cromomicina A₃ (CMA₃), que é um corante fluorescente específico para as bases nitrogenadas Guanina e Citosina (G-C). Tanto as metáfases de células normais quanto as metáfases de sarcoma 180 não apresentaram nenhuma marcação quando corados com CMA₃ (Figura 12 A e B, respectivamente). Mesmo quando contracorados com Distamicina (Figura 12 C), os cromossomos não apresentaram nenhuma região corada mais intensamente que as demais.

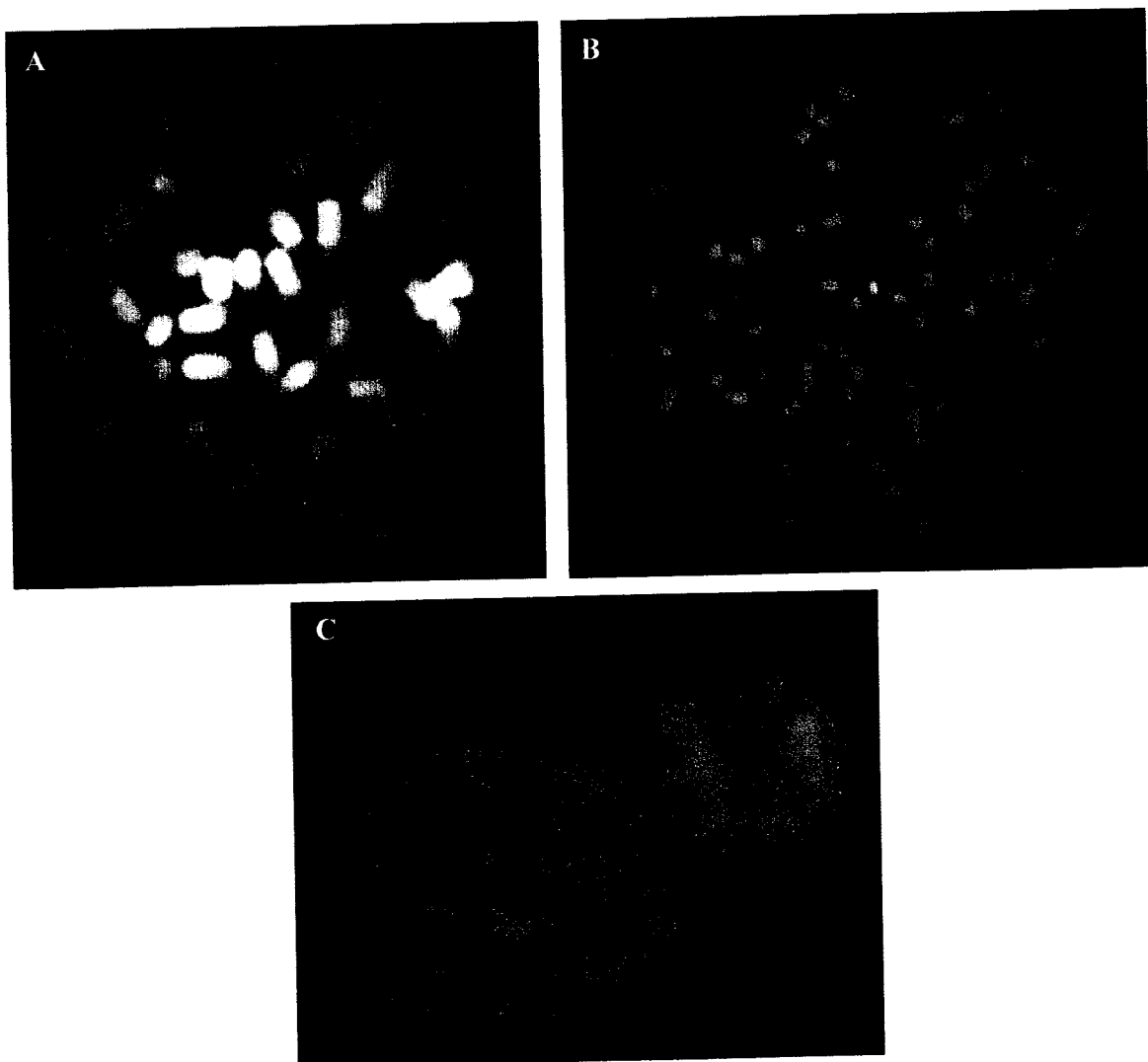


Figura 12 – (A) – Metáfase normais de *Mus musculus* corados com Cromomicina A₃. (B) – Metáfase de Sarcoma 180 corada com CMA₃. (C) – Metáfase de Sarcoma 180 coradas com CMA₃ e contra-coradas com Distamicina.

5.4.2 Hoechst 33258

As metáfases de Sarcoma 180 foram coradas com Hoechst 33258, que é um corante fluorescente que tem afinidade pelas bases nitrogenadas Adenina e Timina (A-T), revelando regiões “ricas” nestes pares de bases. Tanto as metáfases de células de camundongos normais (Figura 13 A) quanto metáfases de Sarcoma 180 (Figura 13B), tiveram suas regiões pericentroméricas marcadas.

5.5 Banda G

As lâminas contendo metáfases de Sarcoma 180 foram tratados com a enzima tripsina, produzindo bandas transversais em seus cromossomos. Cada cromossomo produz bandas G características, sendo que cromossomos homólogos apresentam um mesmo padrão de bandeamento. A partir da observação das bandas G em cada cromossomo, foi montado um cariótipo representativo (Figura 14). Muitas regiões de banda G (bandas mais escuras) foram encontradas perto da região pericentromérica onde se encontra a heterocromatina constitutiva. Os cromossomos metacêntricos também apresentaram suas regiões centroméricas fortemente coradas.

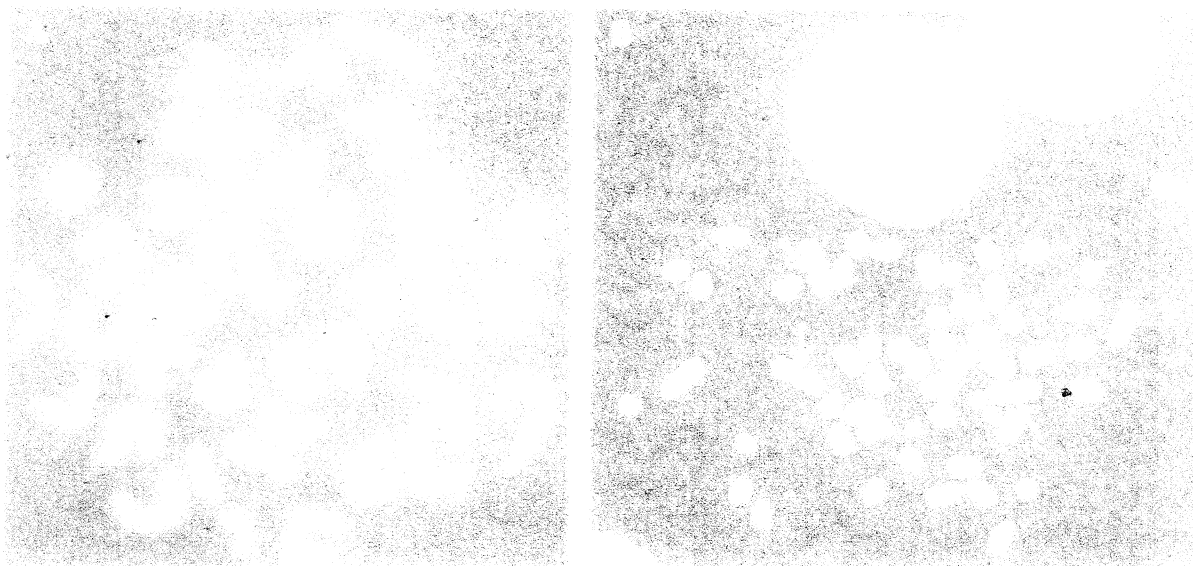


Figura 13 –Metáfases de células normais de *Mus musculus* (A) - e de Sarcoma 180 (B) - coradas com Hoechst 33258. As regiões mais fortemente coradas são blocos heterocromáticos “ricos” em A-T. A seta branca indica grandes blocos de heterocromatina localizados na região centromérica dos cromossomos metacêntricos.

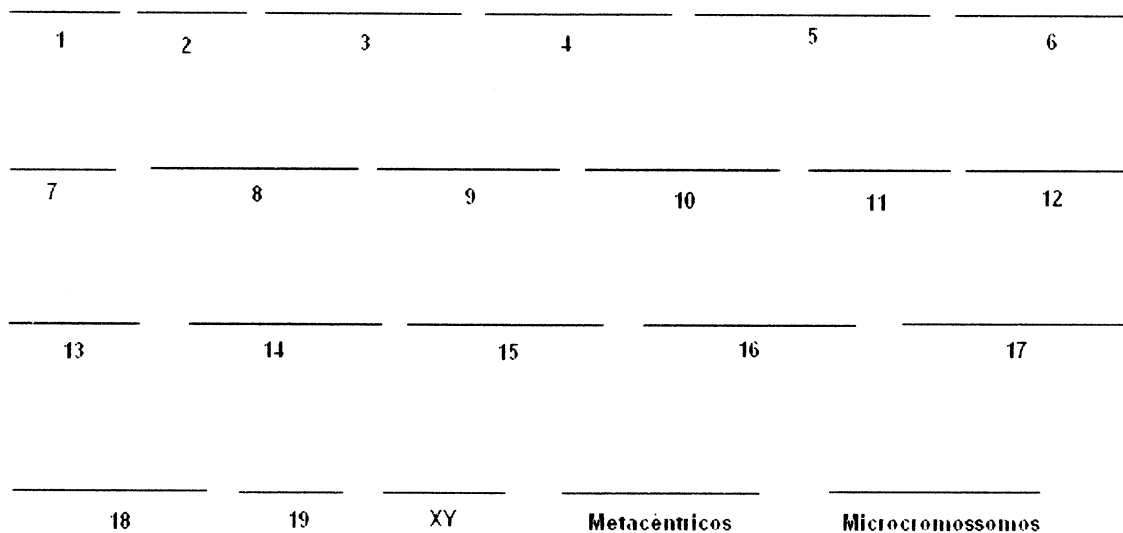


Figura 14 – Cariótipo da linhagem de células tumorais de camundongos (*Mus musculus*) Sarcoma 180 tratado com a enzima tripsina (Banda G).

5.6 Regiões organizadoras do nucléolo (NORs)

As NORs de camundongos são muito variáveis. Devido a esse fato, estas regiões foram detectadas em animais normais para que pudessem ser comparadas com a localização das NORs de Sarcoma 180. As metáfases provenientes de células normais dos camundongos utilizados nos experimentos apresentaram 6 cromossomos portadores de NORs (Figura 15 A e 16), sendo eles, os cromossomos 12, 15, 16, 17, 18 e 19.

As metáfases de Sarcoma 180 apresentaram NORs nos cromossomos 2, 4, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 e 19 (Figura 15 C e 17). Além destes cromossomos, dois cromossomos metacêntricos apresentaram marcações quando corados com nitrato de prata, no entanto, as NORs encontradas nos cromossomos metacêntricos não se encontram nas regiões centroméricas destes cromossomos. Foi observado, na maioria das metáfases, que o segundo cromossomo possui uma grande amplificação da região organizadora do nucléolo em sua região telomérica (figura 17).

Comparando-se os nucléolos de células normais (Figura 15 B) com os nucléolos de células do Sarcoma 180 (Figura 15 D), observa-se que há grande desorganização nos nucléolos das células tumorais, além de aparentarem ter um maior número de regiões e maior atividade dessas regiões.

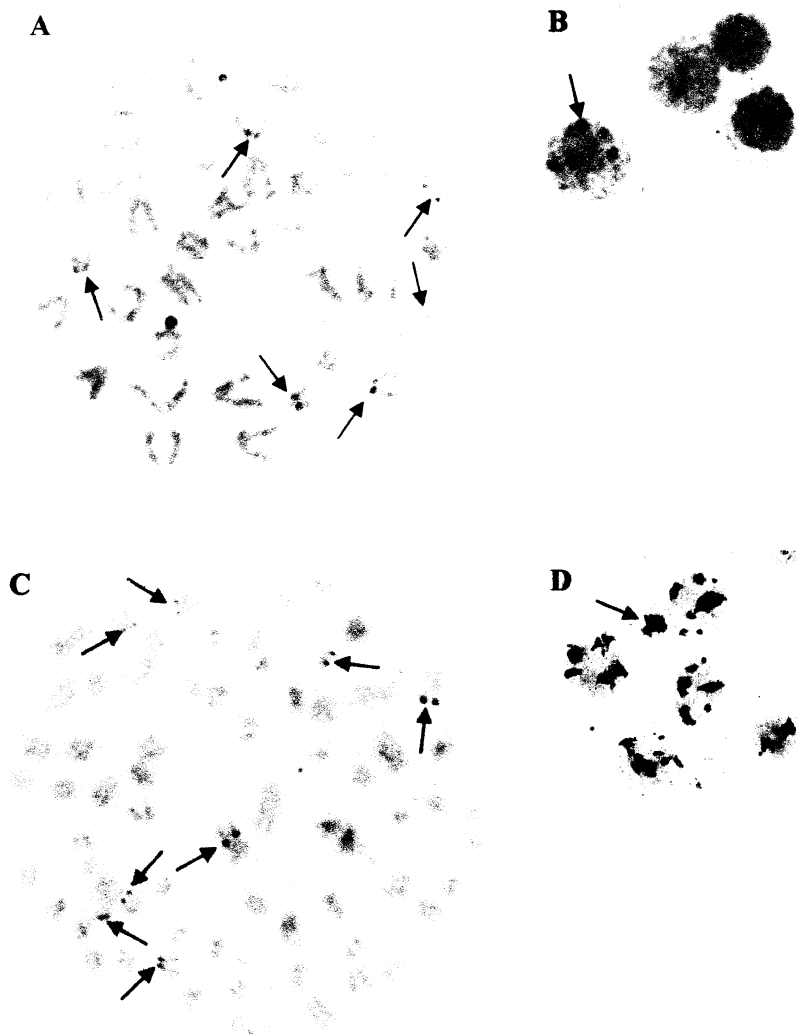


Figura 15 – (A) - Metáfase de Células normais de *Mus musculus* impregnadas com nitrato de Prata. (B) – Núcleos de células normais evidenciando os nucléolos. (C) - Metáfase de Célula Tumoral Sarcoma 180 submetida a impregnação com nitrato de Prata. (D) – Núcleos evidenciando os nucléolos. As regiões coradas mais fortemente representam as NORs. As setas indicam a localização das NORs.

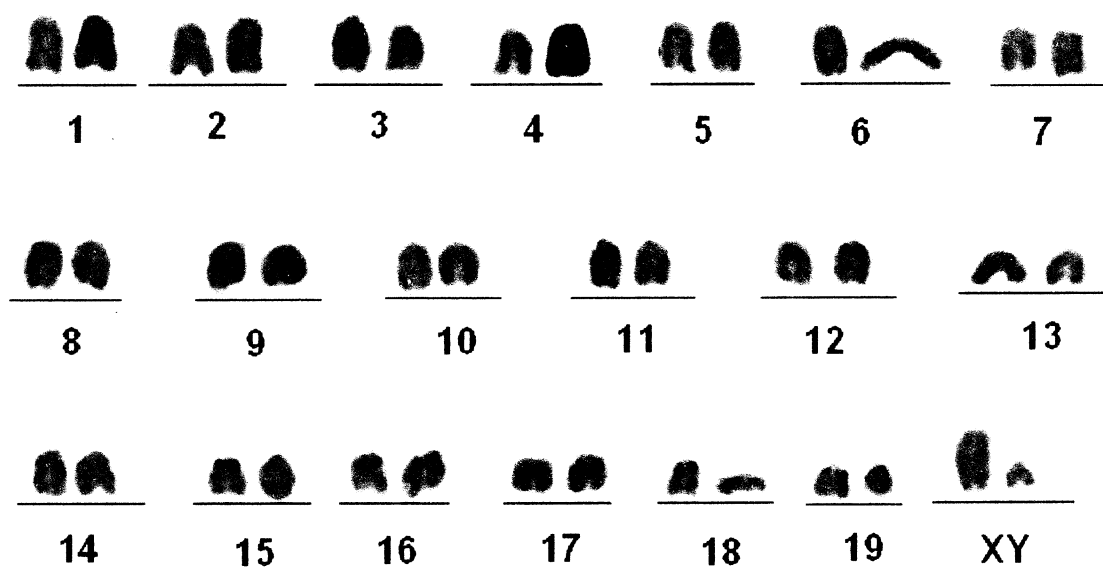


Figura 16 – Cariótipo de células normais de *Mus musculus* impregnadas com nitrato de Prata.

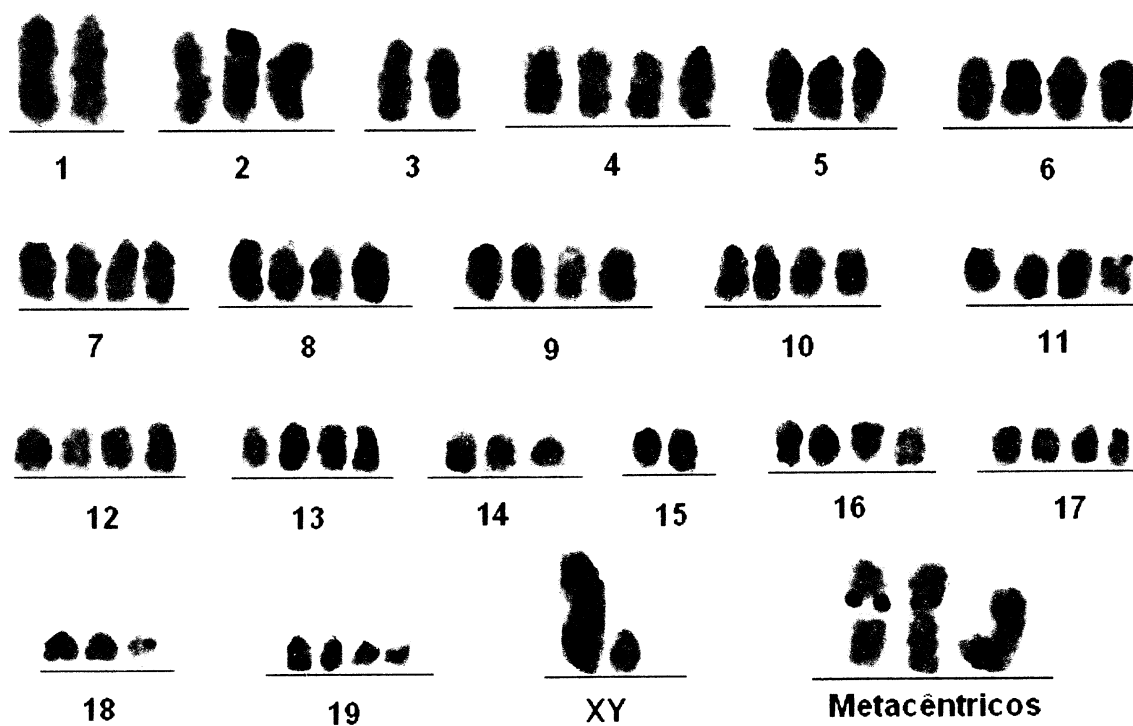


Figura 17 – Cariótipo de Sarcoma 180 submetido a impregnação com nitrato de prata.

6. DISCUSSÃO

A linhagem de células tumorais provenientes de camundongos Sarcoma 180 é muito utilizada em estudos genéticos e bioquímicos. Esta linhagem está disponível para compra no banco de células da ATCC, onde recebe o código TIB-66. O site deste banco de células (www.atcc.com) possui inúmeras linhagens celulares, de diferentes organismos, disponibilizando informações acerca das características das células a serem oferecidas, inclusive a caracterização citogenética de muitas delas. Ao consultar o site, foi verificado que não estão disponíveis as características citogenéticas de Sarcoma 180. Deste modo o presente trabalho analisou citogeneticamente esta linhagem celular.

O câncer é uma doença resultante de múltiplas mutações genéticas (CASARTELLI, 1993). Segundo Saunders et al. (2000), a instabilidade genética e mudanças no número e na estrutura dos cromossomos são fatores importantes da oncogênese. A maioria dos tumores apresenta mudanças genéticas drásticas e muitas delas podem ser visualizadas citogeneticamente. Muitos estudos apresentam a ocorrência de alterações no número dos cromossomos de células tumorais, descrevendo cariótipos complexos, os quais apresentam aneuploidias, células “quase triplóides” dentre outras poliploidias (DUESBERG, et al., 2001; SAUNDERS et al., 2000; CASARTELLI, 1993;). Algumas alterações foram, também, observadas em Sarcoma 180, o qual apresentou um cariótipo complexo.

O número de cromossomos observados em sarcoma 180 é variável em todos os estágios de desenvolvimento do tumor. Foram encontradas metáfases com números cromossômicos variando entre 16 e 142 cromossomos, o que indica que a linhagem celular Sarcoma 180 é composta por uma população heterogênea de células. Observou-se que no início do desenvolvimento do tumor (7 dias), as células apresentavam um número modal de 70 cromossomos, o qual foi reduzido para 68 nos estágios posteriores (14 dias e 21 dias de

tumor). No entanto, a variação encontrada não é significativa, uma vez que a diferença entre os números modais de 68, 70 e 71 cromossomos é muito pequena. As células de sarcoma 180 com 7 dias de desenvolvimento, que possuem número modal de 70 cromossomos representam 18,3 % das metáfases analisadas. As células com número modal de 68 e 71 cromossomos, nesse mesmo estágio, apresentam um valor muito próximo, ambas representando 15,2 % das metáfases analisadas. A presença de células que mostram variabilidade genotípica pode ser interessante para a manutenção de uma linhagem celular, pois ao ocorrer algum tipo de pressão seletiva, ela possuirá material genético diversificado.

A diminuição de cromossomos no número modal das células de 14 e 21 dias de progressão tumoral, em comparação com o tumor de 7 dias, pode ser explicada por uma seleção de células que possuem menos cromossomos. Chakrabarti e Roychowdhury, (1980) analisaram o cariótipo de Sarcoma 180 e verificaram um número modal de 75 cromossomos. Comparando-se os dados verifica-se que, também, houve perdas cromossômicas no decorrer dos anos.

Segundo Casartelli (1993) a perda de cromossomos causa um desbalanço gênico, afetando a concentração de proteínas celulares. Stanbridge e colaboradores, estudando híbridos feitos por meio de fusão de linhagens celulares tumorais humanas e fibroblastos humanos normais, confirmaram que os híbridos que retinham ambos os grupos de cromossomos parentais eram supridos, com variantes tumorigênicas raras, surgindo após perdas cromossômicas. Além disso, eles demonstraram que a perda de cromossomos específicos (contendo oncogenes) e não simplesmente a perda cromossômica geral, estava relacionada com a reversão da malignidade (Stanbridge; Cavenee, 1989 apud OJOPI E NETO, 2002). Os cromossomos perdidos durante a progressão de Sarcoma 180 podem conter genes supressores de tumor e a perda dos mesmos pode aumentar a proliferação e

agressividade do tumor. Somente células com os cromossomos adequados sobrevivem e são selecionadas.

A identificação de perdas ou ganhos de cromossomos específicos é muito importante para se fazer o prognóstico de um tumor. Detectando a presença ou ausência de um determinado cromossomo, pode-se mensurar a agressividade de um tumor, definindo o tratamento com maior eficiência para o tumor em questão (CASARTELLI, 1993).

Desconsiderando-se os estágios de desenvolvimento do tumor, foi estabelecido um número modal de 68 cromossomos para esta linhagem celular, uma vez que células com este número modal representam 16,5 % das metáfases analisadas. Este "cariótipo padrão" é, possivelmente, resultante de uma tetraploidia inicial com posterior perda de alguns cromossomos do lote. A tetraploidia é confirmada por meio de técnicas de bandamentos cromossômicos como banda G e emprego de algumas enzimas de restrição. Observando o padrão de bandamento produzido em cada cromossomo, chega-se a conclusão de que muitos cromossomos possuem quatro homólogos com o mesmo padrão de bandas cromossômicas.

Existe uma variação na composição cromossômica das células, sendo que alguns "pares" são mais freqüentemente conservados do que os demais. Um exemplo é o 3º cromossomo do complemento, que foi encontrado sob a forma diplóide, triplóide e tetraplóide. No entanto, o 1º e 18º pares cromossômicos do complemento, apresentam uma ploidia mais conservada, pois na maioria das metáfases analisadas foram encontrados sob a forma diplóide e tetraplóide, respectivamente. Estes dados sugerem que a linhagem de células sarcoma 180 passou por uma evolução cariotípica, selecionando células com balanços cromossômicos específicos que favorecessem seu desenvolvimento.

Chakrabarti e Roychowdhury, (1980) descreveram algumas características citogenéticas de Sarcoma 180. Em seus estudos observaram muitas variações no número de cromossomos, determinando um número modal de 75 cromossomos. No entanto, os autores

transcrito, o pré-RNA resultante possui éxons e íntrons dos dois genes, que ao sofrer splicing gera um RNA quimérico que, posteriormente, será traduzido em uma proteína quimérica. Em leucemias agudas e sarcomas, a maioria dos genes translocados codificam fatores de transcrição os quais são normalmente envolvidos na regulação do desenvolvimento.

Os rearranjos estruturais observados em Sarcoma 180 podem ser resultantes de uma redução inicial no tamanho dos telômeros. Os telômeros são estruturas responsáveis pela manutenção da integridade cromossômica. Quando a célula passa por um determinado número de divisões, há um encurtamento dos telômeros. Esse evento provoca a ativação de alguns mecanismos de controle celular, fazendo com que as células entrem em crise e em posterior processo de senescência replicativa (GILLEY et al., 2005).

De acordo com Maser e DePinho (2002) o estado de crise é uma importante barreira para a imortalização das células, no entanto as maciças alterações genéticas observadas neste estágio pode ser o mecanismo pelo qual algumas células adquiram a constelação de alterações genéticas necessárias para sua transformação em células malignas. Estas células emergem da crise ativando mecanismos de manutenção dos telômeros – mais comumente pela ativação da telomerase.

Alguns estudos citogenéticos e de hibridação genômica comparativa, em tumores epiteliais de camundongos com disfunção telomérica, revelaram um alto índice de aberrações genômicas, dentre elas algumas translocações não recíprocas, amplificações regionais e deleções. Estas alterações não são frequentes em cânceres de camundongos que possuem a função telomérica intacta (MASER; DEPINHO, 2002). As translocações cromossômicas não recíprocas observadas em Sarcoma 180 podem ser resultantes de um período de crise celular e posterior estabilização e malignização das células através do aumento da expressão da telomerase. Algumas técnicas de genética molecular que analisem a expressão da telomerase nesta linhagem celular podem fornecer dados importantes para a confirmação desta teoria.

Através da impregnação com nitrato de prata foi observada uma amplificação das seqüências de DNAr no segundo par cromossômico do complemento a qual pode de ser resultante da instabilidade genética causada pela disfunção dos telômeros, uma vez que as regiões organizadoras do nucléolo estão localizadas próximas à região telomérica.

Segundo Segundo Dev et al., (1977), as NORs de camundongos estão localizadas nos cromossomos 12, 15, 16, 17, 18 e 19, que foi observado, também, nas células normais dos camundongos utilizados nos experimentos. No entanto, nas células tumorais foi observada a ativação de NORs em outros cromossomos, que coincidem com as NORs descritas por Suzuki et al. (1990), nos cromossomos 2, 4, 8, 10 e 11. Provavelmente, a ativação destas regiões se deve à intensa atividade metabólica das células tumorais. Como estas células estão em constante processo replicativo e, conseqüentemente, intensa síntese protéica, estas células necessitam de grandes quantidades de RNAr para constituírem os ribossomos.

É muito comum que ocorram translocações cromossômicas através de associações das NORs de camundongo. Este fato não foi observado nesta linhagem celular, uma vez que as marcações de NORs estão visivelmente fora da região centromérica. Provavelmente, as translocações observadas são resultantes da associação entre as regiões teloméricas dos cromossomos, hipótese que pode ser confirmada com a técnica de hibridação *in situ* fluorescente, utilizando-se sondas para seqüências teloméricas específicas.

A técnica de banda C revelou grandes blocos de heterocromatina localizados na região pericentromérica dos cromossomos, assim como observado por Baldev e Willcourt (1998) e Miller (1975). A grande banda de heterocromatina constitutiva observada nos cromossomos metacêntricos é resultante da fusão entre dois cromossomos acrocêntricos na região centromérica que, conseqüentemente, funde as heterocromatins pericentroméricas de cada um deles. Este grande bloco heterocromático confirma a classificação destes cromossomos, pois facilita a visualização do centrômero localizado no centro do cromossomo.

Ghosh e Chaudhuri (1984), além de um cromossomo metacêntrico, descreveram outros dois cromossomos marcadores. Estes dois cromossomos também seriam resultantes de translocações, no entanto apresentavam dois centrômeros quando submetidos à banda C. Esses cromossomos marcadores não foram encontrados no presente estudo, uma vez que a banda C não revelou nenhum cromossomo portador de dois telômeros.

A heterocromatina pericentromérica dos cromossomos de camundongos (banda C) é rica em A-T (aproximadamente 69% AT) e composta por seqüências de pares de bases repetidas, as quais contêm sítios de restrição para a enzima *Eco RI* GAATTC. O fluorocromo Hoechst 33258 tem a propriedade de revelar regiões cromossômicas ricas em A-T (STOCKERT, 2005). Quando metáfases de Sarcoma 180 foram submetidas ao tratamento com Hoechst 33258 e com a endonuclease de restrição *Eco RI*, os cromossomos apresentaram o mesmo padrão de marcação da banda C. Nenhuma destas duas técnicas revelou cromossomos que possuem dois centrômeros (duas regiões heterocromáticas), confirmando a ausência dos cromossomos marcadores observados por Ghosh e Chaudhuri (1984). É provável que esses cromossomos tenham sido negativamente selecionados durante a evolução cariotípica desta linhagem de células tumorais, talvez pela instabilidade de cromossomos portadores de dois centrômeros.

O fluorocromo Cromomicina A₃ se liga, preferencialmente, à regiões cromossômicas “ricas” em G-C. Quando as metáfases foram tratadas com este composto não se evidenciou nenhuma região cromossômica, o que indica que a heterocromatina constitutiva de camundongos não possui seqüências repetitivas de Guanina e Citosina.

7- CONCLUSÕES

1. O estudo citogenético de sarcoma 180 conclui que esta linhagem celular é constituída por uma população heterogênea de células, com número modal de 68 cromossomos. Não existe diferença significativa no número modal de cromossomos nos diferentes estágios de desenvolvimento tumoral;
2. O cariótipo desta linhagem celular é resultante de uma tetraploidia inicial com posterior perda de alguns cromossomos do lote, gerando células aneuplóides;
3. Três cromossomos metacêntricos ocorrem exclusivamente nesta linhagem celular.
4. Existem também alguns “microcromossomos” que podem ser considerados marcadores desta linhagem celular;
5. Houve ativação de algumas regiões organizadoras do nucléolo nos cromossomos desta linhagem celular, com amplificação desta região no segundo cromossomo do complemento. Alguns cromossomos portadores de NORs estão envolvidos nas translocações que formaram os cromossomos metacêntricos;
6. A heterocromatina de Sarcoma 180 mantém sua localização pericentromérica, formando grandes blocos nos cromossomos metacêntricos;

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. Câncer. In: **Biologia molecular da célula**, ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. 3ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994, p. 1255-1291.
- ARTONI, R. F; BERTOLLO, L. A. C. Nature and distribution of heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, v. 106, p. 209-214, 1999.
- BARR, F. G. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. **Nature Genetics**, v.19, p.121-124 1998.
- BALDEV, K.V.; WILLCOURT, M. Decondensation of pericentromeric heterochromatin alters the sequence of centromere separation in mouse cells. **Chromosoma**, v.107, p.417-423, 1998.
- BICUDO, H. E. M. C. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos em eucariotos. **Ciência e Cultura**, v.37, n.3, p.440-447, 1985.
- BLASCO, M. A.; LEE, H.W.; HANDE, M.P.; SAMPER, E.; LANSDORP, P.M.; DEPINHO, R.A.; GREIDER, C.W. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. **Cell**, v.91, p.25-34, 1997.
- CASARTELLI, C. Câncer and cytogenetics. **Revista Brasileira de Genética**, v.4, n.16, p. 1109-1131, 1993.

- CHAKRABARTI, A.; ROYCHOWDHURY, J. Chromosome analysis with special reference to centromeric heterochromatin na ploidy variation in mouse Sarcoma – 180 cells. **Cytologia**, v.45, p.177-184, 1980.
- COMINGS, D. E.; AVELINO, E.; OKADA, T.; WYANDT, E. H. The mechanism of C- and G – banding of chromosomes. **Experimental Cell Research**, v.77, p. 469-493, 1973.
- DEV, V.G.; TANTRAHAHI, R.D.A.; MILLER, O.J. Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line. **Genetics**, v.86, p.389-398, 1977.
- DUESBERG, P; STINDL, R.; HEHLMANN, R. Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: Chromosomes reassortments catalyzed by aneuploidy. **PNAS**, v.98, p.11283-11288, 2001.
- GHOSH, S.; CHAUDHURI, A. Analysis of three whole-arm translocations in a mouse sarcoma cell line. **Cytogenetics and cell genetics**, v.38, n.3, p.161-164, 1984.
- GIBBS, W. W. Desvendando as raízes do cancer. **Scientifica American Brasil**, v.2, n.15, p. 38-47, agosto, 2003.
- GILLEY, D.; TANAKA, H.; HERBERT, B.S. Telomere dysfunction in aging and cancer. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.37, p.1000-1013, 2005.
- GUERRA, M. **Como observar cromossomos**, Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 131p.
- GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**, Ribeirão Preto: Guanabara, 1988. 142p.
- HAHN, H.P.; FLETCHER, C.D.M. The role of cytogenetics and molecular genetics in soft tissue tumor diagnosis – a realistic appraisal. **Current diagnostic pathology**, v.11, p.361-370, 2005.

HAHN, W.C.; COUNTER, C.M.; LUNDBERG, A.S.; RODERICK, L.B.; BROOKS, M.W.; WEINBERG, R.A. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. **Nature**, v.400, p.464-468, 1999.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

INCA. http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em 20/05/2005.

KARLSEDER, J.; BROCCOLO, D.; DAI, Y.; HARDY, S.; LANGE, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. **Science**, v. 283, p.1321-1324, 1999.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v.73, p.85-90, 1982.

MEZZANOTTE, R.; BIANCHI, U.; VANNI, R.; FERRUCCI, L. Chromatin organization and restriction endonucleases activity on human metaphase chromosomes. **Cytogenetic and cell genetics**. v.3, p.562-566, 1983.

MANTOVANI, M; ABEL, L. D. S; MESTRINER, C.A. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.536-542, 2004.

MASER, R.S.; DEPINHO, R.A. Connecting chromosomes, crisis, and câncer. **Science**, v. 297, p.565-569, 2002

MESTRINER, C. A. **Análises das regiões organizadoras de nucléolos e investigação do sistema XX/XY descrito para *Leporinus lacustris* (Pisces, Anostomidae)**, Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP), 1993.

- MILLER, O. J. Cytogenetics of the mouse. **Annual review of genetics**, v.9, 285-303, 1975.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2005, 94p.
- OJOPI, E. P. B; NETO, E. D. Genes e câncer. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 27, julho/agosto, 2002.
- PIECZARKA, J. C.; MATTEVI, M. S. Heterocromatina constitutiva In: **Série Monografias / Sociedade Brasileira de Genética**, DUARTE, F. A. M. 7ª edição. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. v.7, p.185-225, 1998.
- PONDER, B. A. J. Câncer genetics. **Nature**, V.411, p.336-341, 2001.
- RABBITTS, T.H.; APPERT, A.; CHUNG, G.; COLLINS, E.C.; DRYNA, L.; FOSTER, A.; LOBATO, M.N.; MCCORMACK, M.P.; PANNELL, R.; SPANDIDOS, A.; STOCKS, M.R.; TANAKA, T.; TSE, E. Mouse models of human chromosomal translocation and approaches to cancer therapy. **Blood cells, molecules and diseases**, v.27, p.249-259, 2001.
- SAUNDERS, W. S.; SHUSTER, M.; HUANG, X.; GHARAIBEH, B.; ENYENIHI, A. H.; PETERSEN, I.; GOLLIN, S. M. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **PNAS**, v.97, n.1, p.303-308, 2000.
- SCHMID, M. Chromosome banding in amphibia – XII Restriction endonuclease banding. **Chromosoma**, v.96, p.283-290, 1988.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT- rich chromosome regions in anura. **Chromosoma**, v.77, p.83-103, 1980.

SCHWARZACHER, H. G.; MIKELSAAR, A. V. & SCHNEDL, W. The nature of the Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron and light microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis. **Cytogenetic and Cell Genetics**, v.20, p.24-39, 1978.

STOCKERT, J.C.; PINNA-SENN, E.; BELLA J.L.; LISANTI J.A. DNA-binding fluorochromes: correlation between C-banding of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine-thymine base pairs. **Acta histochemica**, v.106, p.413-420, 2005.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.74, p.304-306, 1972.

SUZUKI, H.; KURIHARA, Y.; KANEHISA, T.; MORIWAKI, K. Variation in the distribution of silver-staining Nucleolar Organizer Regions on the chromosomes of the wild mouse, *Mus musculus*. **Molecular Biology and Evolution**, v.7, p.271-282, 1990.

TORRES-MARIANO, A. R. **Descrição citogenética de três espécies do gênero *Astyanax* (Pisces, characidae) da bacia do rio Araguari – Uberlândia (MG)**, 61p. Dissertação (mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

VERMA, R. S.; BABU, A. **Human chromosomes**, New York: McGraw-Hill, 1995. 419p.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v.33, p.2278-2282, 1973.