



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180

Robson José de Oliveira Júnior

Orientador: Prof^a. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Uberlândia – MG

Junho – 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180

Robson José de Oliveira Júnior

Orientador: Prof^a. Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos à
obtenção do título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética).

Uberlândia – MG

Junho - 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180

ALUNO: Robson José de Oliveira Júnior

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dra. Sandra Morelli

Examinadores : Prof. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro

Prof. Dra. Catarina Satie Takahashi

Data da Defesa: 30/06/2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Profa. Dr^a. Sandra Morelli

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- O48a Oliveira Júnior, Robson José de, 1984-
 Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180
 / Robson José de Oliveira Júnior. - 2008.
 73 f. : il.
- Orientadora: Sandra Morelli.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
 grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Câncer - Teses. I. Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de
 Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 III. Título.

CDU: 616-006.6

“Se eu soubesse o que eu estava fazendo, não seria chamada pesquisa.” (Albert Einstein).

“Pesquisar é ver o que outros viram, e pensar o que nenhum outro pensou.” (Albert Szent-Gyorgyi).

Dedico aos meus pais, à minha
irmã e a todos aqueles que me
apoiam em todos os momentos,
me incentivando e demonstrando
amor e carinho;

Agradecimentos

De uma forma ou de outra, muitas pessoas contribuíram para a realização deste projeto e fazem parte de mais esta etapa de minha formação, dentre elas:

Primeiramente agradeço a Deus por permitir e me guiar a realização de minhas pesquisas;

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Sandra Morelli por sempre me apoiar e acreditar em meus projetos e propostas. Obrigado por ajudar em minha formação como pesquisador, porque sem a ajuda de uma mãe para nos guiar não chegamos a lugar nenhum. Obrigado pela Amizade, paciência e compreensão; Pelos momentos descontraídos nas festinhas em sua casa e em nossas viagens aos congressos.

Aos meus pais por depositarem sua confiança e incentivo em minha carreira. Obrigado pelo estímulo e por não medirem esforços para que eu consiga realizar meus objetivos. Obrigado pelo amor e carinho;

A minha irmã, exemplo de pessoa, pela amizade e companheirismo. Obrigado por me compreender e por me ajudar em diversos momentos de minha vida.

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

À CAPES pela concessão da bolsa e pelo financiamento da Pós-graduação;

Ao Prof Dr. Luiz Ricardo Goulart por aceitar ser meu co-orientador e por abrir as portas de seu laboratório, depositando confiança e acreditando em meu trabalho;

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

especial à Prof^a. Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pelo apoio quando precisei e por também acreditar em meu trabalho;

Ao Prof Dr José Roberto Mineo por permitir uso de seus equipamentos referentes à manutenção da cultura celular;

Obrigado Dâmaso e Deise pela ajuda nos momentos que precisei. Obrigado pelo suporte técnico e pelas dicas relacionadas à manutenção da cultura celular. A ajuda de vocês foi muito importante;

À Prof^a Dr^a Denise Garcia de Santana por ajudar nas análises estatísticas com grande disposição e simpatia;

À amiga Sabrina pela grande amizade e paciência. Obrigado por me ensinar as primeiras técnicas de citogenética e pelo companheirismo nos congressos e festas. Obrigado pelas discussões e muitas risadas. Obrigado por me escutar e me acompanhar quando preciso, em momentos sérios e em copos. Você foi exemplo em diversos aspectos de minha vida;

Ao Rodrigo, obrigado pelo companheirismo. Obrigado por me escutar e compartilhar momentos importantes e decisivos em minha formação, tanto pessoal quanto acadêmica;

À amiga Luciana Machado Bastos por sempre me apoiar e acreditar em minhas idéias. Obrigado pelos momentos de conversa, discussão, descontração e risadas. Obrigado pelas palavras amigas e pelos “happy hours”;

À amiga Mirian Machado por me estimular em minhas pesquisas e pela ajuda nos momentos que precisei. Obrigado pela ajuda na estatística. Aprendi muito com você, em todos os sentidos;

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

Aos amigos do Laboratório: Alessandra, Luana, Roberto, Ana Carolina, Naiara, Danyelle, Luiz Guilherme, Sabrina, William, José Clidenor. Obrigado pela amizade e pelos momentos felizes compartilhados;

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

Obrigado a todos a que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1 – Núcleos de sarcoma 180 indicando polimorfismo de tamanho.	43
Figura 2 – Distribuição do número cromossômico de sarcoma 180 de acordo com o tipo de manutenção da linhagem celular.....	45
Figura 3 – Distribuição do número cromossômico de sarcoma 180 de acordo com o tempo de progressão do tumor ascítico	45
Figura 4 – Distribuição do número cromossômico de sarcoma 180 de acordo com o tempo de progressão do tumor sólido.....	46
Figura 5 – Cariótipo representativo de sarcoma 180 corado com Giemsa.....	46
Figura 6 – Metáfases de sarcoma 180 mantidas em cultura.	47
Figura 7 – Foto micrografia da expansão clonal realizada em sarcoma 180.	48
Figura 8 – Distribuição do número cromossômico em células de sarcoma 180.....	48
Figura 9 – Metáfases de sarcoma 180 demonstrando poliploidização via endoreduplicação.	49
Figura 10 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à banda C.	49
Figura 11 – Metáfase de sarcoma 180 corada com Cromomicina A ₃	50
Figura 12 – Metáfase de sarcoma 180 corada com Hoechst 33258.	51
Figura 13 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à digestão com a enzima de restrição <i>Dde</i> I.....	52
Figura 14 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à digestão com a enzima de restrição <i>Bam</i> HI.....	52
Figura 15 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à impregnação com nitrato de Prata.....	53
Figura 16 – Núcleos interfásicos de sarcoma 180 (a) e células da medula óssea (b) corados com nitrato de Prata.....	54
Figura 17 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à digestão com tripsina.	54
Figura 18 – Gel de agarose dos produtos de RT-PCR dos genes telomerase e actina do sarcoma 180 e dos outros tecidos de camundongos analisados.	55
Figura 19 – Análise semi-quantitativa por RT-PCR da expressão do gene da telomerase.....	55
Figura 20 – Possíveis translocações que deram origem aos cromossomos metacêntricos marcadores de sarcoma 180.	63
Tabela 1 – Distribuição do número cromossômico de acordo com o tempo de progressão tumoral em tumores ascíticos e sólidos de sarcoma 180.	44

Sumário

1	Apresentação.	1
2	Dados da Literatura	3
2.1	Introdução	3
2.1.1	A utilização de modelos animais como ferramenta para o entendimento da biologia tumoral.	3
2.1.2	A instabilidade genética e o câncer	3
2.1.3	Citogenética do câncer	5
2.1.4	Telômeros e Câncer	7
2.1.5	Poliploidia	10
2.1.6	Aneuploidia: causa ou consequência da tumorigênese?	13
2.1.7	Células-tronco e células-tronco tumorais	17
2.1.8	Informações citogenéticas que podem auxiliar na caracterização cromossômica	19
2.1.9	Sarcoma 180	23
2.2	Referências Bibliográficas	25
3	Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180	35
3.1	Introdução	37
3.2	Materiais e Métodos	39
3.2.1	Manutenção dos animais e da linhagem tumoral	39
3.2.2	Cultura celular	39
3.2.3	Expansão Clonal	40
3.2.4	Caracterização citogenética convencional	40
3.2.5	Extração do RNA total e reação de transcrição reversa	41
3.2.6	RT-PCR semi-quantitativa	41
3.2.7	Níveis relativos de expressão gênica avaliados por densitometria	42
3.2.8	Análise estatística	42
3.3	Resultados	43
3.3.1	Distribuição do número cromossômico de acordo com o tipo de manutenção da linhagem celular e tempo de progressão tumoral	43
3.3.2	Expansão clonal	47
3.3.3	Banda C	49
3.3.4	Coloração com fluorocromos base-específicos	50
3.3.5	Bandamentos por enzimas de restrição	51
3.3.6	Regiões Organizadoras do Nucléolo – NORs	53
3.3.7	Banda G	54
3.3.8	Expressão da Telomerase por RT-PCR	55
3.4	Discussão	56
3.5	Conclusão	69
3.6	Referências Bibliográficas	69

1 Apresentação.

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. Muitos estudos são realizados para entender o mecanismo pelo qual as células tumorais adquirem todas as características necessárias para a malignização. Existem duas vertentes teóricas que tentam explicar a oncogênese a teoria da mutação pontual e a teoria cromossômica do câncer. Segundo a teoria da mutação pontual, no decorrer da tumorigênese as células neoplásicas adquirem diversas mutações gênicas que conferem características essenciais para o desenvolvimento do câncer. De acordo com esta teoria são necessárias seis mutações para que uma célula normal se torne tumoral. A aneuploidia, apesar de ter sido observada há aproximadamente um século e até 1960 ser considerada a causa da transformação maligna, permaneceu esquecida por cerca de 25 anos. No entanto, diversos estudos comprovam o papel da aneuploidia como suporte genético para o desenvolvimento do câncer e este evento é base da teoria cromossômica do câncer. O modelo genético convencional e os eventos epigenéticos não podem esclarecer algumas propriedades da carcinogênese, sendo estas explicadas pela teoria cromossômica do câncer. A utilização de células animais como modelo para o entendimento da patogênese de diversas doenças humanas é essencial para muitos tipos de pesquisas biomédicas. O sarcoma 180 é uma linhagem tumoral proveniente de camundongos, está disponível no banco de células da ATCC e é muito utilizada em diversos estudos biomédicos. Este banco de células possui diversos tipos celulares de diferentes animais, fornecendo também as informações citogenéticas de muitos deles. No entanto, não são disponibilizadas as informações cariotípicas referentes a Sarcoma 180. Desta forma, o presente trabalho caracterizou citogeneticamente a linhagem celular, utilizando a mesma como modelo para tentar entender alguns aspectos da oncogênese e biologia tumoral. O presente trabalho foi escrito sob as normas vigentes no programa de Pós-Graduação em Genética e

Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e está dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo é referente à fundamentação teórica ou revisão bibliográfica necessária para situar o leitor no tema abordado. O segundo capítulo consiste em um artigo científico a ser enviado para publicação.

2 Dados da Literatura

2.1 Introdução

2.1.1 A utilização de modelos animais como ferramenta para o entendimento da biologia tumoral.

A utilização de camundongos como modelos animais para o entendimento da patogênese de diversas doenças humanas é essencial para muitos tipos de pesquisas biomédicas. O camundongo de laboratório é o modelo experimental de mamífero mais acessível, compartilhando genes, sistemas orgânicos e sistemas fisiológicos com os seres humanos (RANGARAJAN; WEINBERG, 2003)

Diversas linhagens de camundongos e de células cultiváveis são utilizadas como modelo na tentativa de entender a biologia do câncer. Muitos modelos animais são instrumentos importantes para validar o papel etiológico de candidatos a oncogenes e genes supressores tumorais na iniciação e progressão de tumores. São particularmente úteis na descoberta de como estas lesões genéticas contribuem para a biologia dos tumores. Algumas linhagens celulares possuem características interessantes, que as tornam importantes ferramentas para o estudo do câncer. Uma característica muito útil de algumas linhagens celulares é que além de serem cultivadas *in vitro* existe a possibilidade de estudar seu comportamento *in vivo* por meio da inoculação destas células em modelos animais (BLASCO et al., 1997; CHANG et al. 2001; RABBITTS et al., 2001; HINGORANI et al. 2003)

2.1.2 A instabilidade genética e o câncer

Na maioria dos casos, o câncer é derivado de uma única célula somática e sua progênie. Todas as células resultantes do primeiro clone neoplásico acumulam uma série de mudanças genéticas e epigenéticas que causam modificações na atividade gênica, alterando seu fenótipo que passa por um processo de seleção (PONDER, 2001). A instabilidade genética ou mudanças no número e estrutura cromossômica são fatores de grande importância na oncogênese. A consequência da instabilidade genética pode

ser uma alteração no número de 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, suas células tiverem a capacidade de escapar da massa inicial pelos vasos sanguíneos ou linfáticos, invadindo tecidos vizinhos e formando tumores secundários ou metástases (ALBERTS et al., 1994), mas para que isso ocorra é necessário que estas células adquiram uma série de características.

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), todo o câncer apresenta, pelo menos, seis capacidades especiais:

(1) Crescimento mesmo na ausência de sinais de “avance” normais. A maior parte das células espera 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 auto-destrutivos (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 capacidade, as células neoplásicas trabalham em torno de sistemas, como os telômeros, forçando o limiar reprodutivo.

(6) Poder de invadir outros tecidos e de espalhar-se por outros órgãos levando a metástase.

As alterações genéticas mais importantes nas células cancerosas ocorrem nos genes que controlam a proliferação celular (proto-oncogenes e genes supressores tumorais), resultando no crescimento descontrolado, característico da doença. Além disso, há, ainda, o envolvimento de genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, os quais, quando inativos, podem elevar a taxa de mutação das células, causando, eventualmente, a alteração de genes importantes para a carcinogênese. Os genes supressores tumorais têm funções celulares diversas, geralmente relacionadas com o controle da proliferação celular, porém eles são definidos como inativos nas células tumorais, enquanto os oncogenes apresentam mutações ativadoras (OJOPI; NETO, 2002).

2.1.3 Citogenética do câncer

O surgimento das células cancerígenas está intimamente relacionado com mutações e mudanças na estrutura cromossômica, tornando importante seu estudo citogenético. Cada alteração genética observada em células neoplásicas, associada ao evento de iniciação ou proliferação de um tumor, pode ser mediada por grandes mudanças cromossômicas e, conseqüentemente, é visível citogeneticamente (CASARTELLI, 1993).

Os rearranjos citogenéticos encontrados em neoplasias se dividem em três categorias, baseadas no mecanismo pelo qual promovem o crescimento do tumor (CASARTELLI, 1993):

(a) translocações, inversões e inserções – esses eventos afetam genes em uma limitada distância do ponto de quebra cromossômica e pode resultar na desregulação de genes celulares normais ou formação de oncogenes quiméricos;

(b) deleções e monossomias cromossômicas - mostram que a perda da função de alguns genes é importante para a iniciação ou progressão do tumor;

(c) polissomias, ampliações, isocromossomos, extra-cromossomos, micro-cromossomos, dentre outros cromossomos marcadores – tais alterações citogenéticas podem modificar a expressão de centenas ou milhares de genes, sendo que os efeitos fisiológicos variam de acordo com a dosagem de genes com expressão alterada .

Uma série de fusões gênicas, resultantes de translocações cromossômicas, foram identificadas em leucemias, linfomas e sarcomas. Alguns exemplos são as fusões entre BCR-ABL1 encontrada em leucemia mielóide crônica e ETV6-NTRK3 encontrada em fibrosarcoma congênito. Estas translocações justapõem porções de dois genes, gerando produtos de genes quiméricos e/ou alterando a expressão gênica (BARR, 1998).

Diversas observações clínicas demonstraram que tumores com uma mesma classificação possuem comportamento metastático altamente variável. Alguns autores demonstraram uma correlação entre a capacidade invasiva e características citogenéticas das células tumorais. A presença ou ausência de determinados cromossomos do lote, o aumento do número de cópias cromossômicas ou a presença de alguns cromossomos marcadores podem determinar se uma linhagem celular é mais ou menos invasiva que outra, direcionando assim o tipo de tratamento a ser adotado. Mesmo células que possuam ploidia semelhante, podem apresentar rearranjos característicos que aumentam sua capacidade metastática (BERTRAND et al., 1999).

Os dados citogenéticos indicam que mudanças cromossômicas em um tumor podem ser utilizadas para classificação, diagnose e prognóstico do mesmo. Algumas vezes, as 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; HAHN; FLETCHER, 2005).

2.1.4 Telômeros e Câncer

Os telômeros finalizam os cromossomos lineares, mantendo a integridade cromossômica. Eles são essenciais para garantir uma adequada estrutura e função cromossômica, mantendo assim a estabilidade genética da célula. Nos mamíferos, assim como em todos os vertebrados, os telômeros consistem de muitos quilobases de repetições em *tandem* da sequência TTAGGG e das proteínas associadas telômero-específicas. Dentre muitas proteínas associadas ao telômero temos TRF1 e TRF2, sendo que TRF1 regula o comprimento do telômero e TRF2 mantém sua integridade (KARLSEDER et al., 1999). O comprimento das repetições TTAGGG varia de uma espécie para a outra. Por exemplo, em células germinativas humanas os telômeros possuem de 15-20 Kb, enquanto em camundongos (*Mus musculus*) os telômeros são muito mais longos, variando de 30 a 50 Kb. Além desta variação inter-específica, o comprimento dos telômeros pode variar intra-específica e individualmente, dependendo do genótipo, tipo celular analisado ou história replicativa da célula. Os telômeros são responsáveis pelo controle da divisão celular, fazendo com que depois de um determinado número de divisões a célula entre em senescência replicativa (LEJNINE et al., 1995; BLACKBURN; GREIDER, 1995).

A replicação dos cromossomos lineares apresenta uma dificuldade, que é a incapacidade da DNA polimerase em completar a síntese ao final dos cromossomos. Uma vez que a síntese só ocorre no sentido 5' → 3', e requer um *primer* para sua iniciação, os telômeros não são completamente replicados pelo complexo de DNA polimerase convencional. Desta maneira, quando a célula se divide, esse problema de replicação do final do cromossomo resulta em uma eventual redução dos telômeros (GILLEY, 2005). Quando os telômeros atingem um comprimento crítico, induzem a ativação de pontos de checagem não muito diferentes daqueles provocados por danos no DNA. Em células humanas, telômeros curtos resultam na ativação da senescência e a célula não se replica mais (MASER; DEPINHO, 2002).

O encurtamento progressivo dos telômeros implica em senescência, morte celular ou instabilidade genética. Diversas evidências sugerem que os

telômeros contribuem para a iniciação e progressão de tumores malignos de diversas maneiras. A instabilidade genética causada pela disfunção telomérica é um dos principais fatores que predispõe as células à transformação neoplásica. (CAMPISI, 2001). Uma hipótese proeminente é que a disfunção telomérica é um dos processos chave por trás da instabilidade genômica observada nas lesões malignas primárias. A hipótese da disfunção dos telômeros diz que a proteção telomérica é rompida em um pequeno grupo de células precursoras normais. Esta perda da proteção telomérica resulta então na fusão telomérica entre diferentes cromossomos, causando instabilidade genética via ciclos de fusão, ponte e quebras cromossômicas. Desta maneira a disfunção telomérica pode gerar diversas alterações citogenéticas, fazendo que as células adquiram as combinações de material genético necessárias para iniciar a carcinogênese. A instabilidade genética dota as células cancerígenas iniciais com alterações que desativam a repressão do crescimento e a apoptose, permitindo o engajamento em vias metabólicas essenciais para o crescimento imortal (MASER, R.S.; DEPINHO, R.A., 2002). A disfunção telomérica pode ser ocasionada pelo comprimento aberrante da sequência de DNA telomérico (encurtamento telomérico) e/ou perda da função de alguma proteína associada ao telômero, apesar do fato de que o encurtamento dos telômeros não é observado em alguns casos (GILLEY, 2005).

Quando células são mantidas em cultura seus telômeros atingem um comprimento crítico, o que resulta na ativação do limite de Hayflick (estágio de mortalidade 1 ou senescência) e as células param de se dividir. No entanto, o limite de Hayflick pode ser facilmente rompido pela inativação de algumas vias inibidoras de crescimento, como as vias do gene p53 e Rb. A proliferação continuada das células após o limite de Hayflick causa a erosão exacerbada dos telômeros e alta instabilidade genômica, culminando em um período de grande morte celular ou crise celular (estágio de mortalidade 2).

Embora a crise desempenhe uma importante barreira para a imortalização das células, a grande instabilidade genética observada neste estágio pode ser o mecanismo pelo qual poucas células sobreviventes da crise adquirem o enorme número de alterações genéticas necessárias para a

transformação maligna. Depois de adquirir as alterações necessárias para a oncogênese, algumas raras células emergem da crise e estabilizam seus cromossomos pela ativação de mecanismos de manutenção telomérica, mais comumente pelo aumento da expressão da telomerase (MASER, R.S.; DEPINHO, R.A., 2002).

Uma importante diferença entre células de roedores e humanos é derivada da biologia dos telômeros. Células de roedores apresentam atividade da telomerase e possuem telômeros mais longos que nas células humanas correlacionadas (HAHN et al., 1999). Uma explicação para este fato pode ser devido à ausência de vias regulatórias para a expressão da telomerase em roedores, o que já é presente em células humanas.

Células humanas primárias raramente se imortalizam de forma espontânea, o que já é observado em culturas de células de roedores. Espécies de vida longa podem ter mais mecanismos de controle da divisão celular do que espécies de vida curta, uma vez que o envelhecimento aumenta a probabilidade do surgimento de células com as mutações necessárias para a transformação neoplásica. Desta maneira, estudos com a telomerase de camundongos podem servir como modelo para o entendimento do papel que o comprimento dos telômeros e a telomerase desempenham no envelhecimento e imortalização das células (PROWSE; GREIDER, 1995).

A telomerase é uma ribonucleoproteína complexa que consiste em uma subunidade catalítica (TERT) que possui ação de transcriptase reversa, sendo que sua presença regula a atividade da enzima, uma fita de RNA (TR) que fornece o molde para adicionar a seqüência telomérica (TTAGGG) no final dos cromossomos e alguns outros componentes protéicos associados (GILLEY et al., 2005). Em humanos a telomerase é expressa somente em algumas células, como células embriogênicas e linfócitos ativos, enquanto nos tumores, esta enzima possui atividade detectável em 90% dos casos, sendo que os outros 10% mantêm seus telômeros eficientemente por meio de um mecanismo alternativo de alongamento telomérico (ALT) (KIM et al., 1994).

A telomerase desempenha um importante papel no crescimento de tumores e na imortalização de células. A reativação desta enzima parece ser um evento crítico que promove a sustentação da proliferação tumoral removendo a barreira do encurtamento telomérico (CHANG et al., 2001). Segundo Takahashi et al. (2003), a translocação, que ocorre entre os cromossomos 11 e 22 no sarcoma de Ewing, provoca a fusão dos genes EWS e ETS, produzindo uma proteína quimérica. Tanto a atividade da telomerase quanto a produção do RNAm da transcriptase reversa se demonstraram aumentadas na presença desta fusão, indicando que a proteína quimérica resultante é responsável pela ativação da expressão da telomerase neste sarcoma. Chang et al. (2005) conseguiram provocar a imortalização de uma linhagem de células endoteliais por meio da transfecção e expressão ectópica da subunidade catalítica da telomerase hTERT. Estas observações, junto com a frequência e intensidade de expressão da telomerase em tumores humanos, sugerem que a manutenção telomérica é essencial para a imortalização celular e que pode ser possível inibir o crescimento do câncer interferindo na ação da telomerase (LI et al., 2005). Desta maneira, muitas estratégias têm sido desenvolvidas para inibir a telomerase, como os nucleotídeos antisense, ribozimas e RNA de interferência (GUO, 2005).

2.1.5 Poliploidia

Organismos eucarióticos geralmente possuem um número diplóide de cromossomos. O estado diplóide é preferido e evolutivamente mantido, pois possibilita a reprodução sexuada e facilita a recombinação genética. No entanto, existe um surpreendente número de exceções. Existem organismos que possuem mais do que um complemento cromossômico diplóide, ou até menos do que o complemento diplóide. Além do mais, o complemento cromossômico pode diferir dentro de um mesmo organismo, dependendo do tipo celular e o aumento de lotes cromossômicos é amplamente observado em células tumorais (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Existem duas classes diferentes de poliplóides, os aloploplóides que combinam dois ou mais genomas relacionados, mas não idênticos e os

autopoliploides que combinam dois ou mais genomas idênticos. As células poliploides podem ser formadas por três mecanismos diferentes: ciclo celular abortivo, fusão celular e por endoreduplicação. O ciclo celular abortivo é resultado de uma variedade de defeitos em diferentes aspectos da divisão celular: Replicação do DNA, dissolução da coesão entre as cromátides irmãs, funções do fuso mitótico e citocinese. Estas falhas no processo de divisão desencadeiam algumas respostas celulares que bloqueiam a mitose e em alguns casos levam a apoptose. No entanto, as respostas resultantes dos pontos de checagem do ciclo celular podem resultar apenas em um atraso transitório na progressão mesmo. Desta forma, mesmo que os danos iniciais persistam algumas células podem escapar desta checagem e produzir células tetraploides (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Segundo Larizza e Schirrmacher (1984) as células tumorais que possuem propriedades metastáticas freqüentemente possuem uma maior dosagem gênica do que seus progenitores. Este fato é observado pelo aumento do nível de ploidia, duplicação cromossômica e amplificação gênica. A aquisição de um elevado número cromossômico observado nas células tumorais pode ser resultado de endoreduplicação ou hibridação somática (fusão celular).

Em alguns tipos celulares a fusão celular faz parte do desenvolvimento normal, produzindo células terminalmente diferenciadas como as células musculares e os osteoclastos. A fusão celular também pode ocorrer durante infecções virais e espontaneamente em células cultivadas. Algumas células-tronco também modificam seu curso e adquirem características de outros tipos celulares após fundirem com células presentes no tecido alvo. A fusão celular causa uma desordem intracelular com alterações na estrutura genética da célula e conseqüente instabilidade. Este fato pode causar a emergência de clones aneuploides. Estes clones podem apresentar características neoplásicas e ter um complemento cromossômico instável ou relativamente estável, variando de triploide para tetraploide (HESELMAYER et al., 1997; STORCHOVA, PELLMAN, 2004; DUELLI; LAZEBNIK, 2007).

A endoreduplicação é comum em artrópodes e é bem caracterizada nas glândulas salivares de drosófilas, formando os cromossomos politênicos

e em megacariócitos, que são células de mamíferos responsáveis pela formação das plaquetas (STORCHOVA; PELLMAN, 2004). O processo de endoreduplicação resulta em diplocromossomos, que consistem de quatro cromátides agrupadas lado a lado, no lugar de duas. A endoreduplicação ocorre quando as células passam por dois ciclos de replicação de DNA sem a separação das cromátides (SUMNER, 1998). Para que ocorra a endoreduplicação alguns mecanismos que dirigem a progressão seqüencial de G_1 , S, G_2 e fase mitótica (M) do ciclo celular são modificados. Normalmente os cromossomos só se replicam uma vez por ciclo celular e a progressão da mitose (fase M) é requerida para que ocorra a liberação de outros pontos de origem de replicação iniciando o próximo processo de duplicação cromossômica (LARKINS et al., 2001).

O ciclo mitótico normal consiste em períodos de síntese de DNA (fase S) e a separação cromossômica (fase M), precedida por intervalos: G_1 e G_2 respectivamente. Durante o ciclo celular, a progressão ordenada de eventos que causam a duplicação e separação cromossômica é regulada pelas kinases ciclina dependentes (CDKs). As CDKs foram encontradas em todos os eucariotos estudados e são codificadas por um número variado de genes. Em humanos CDK_1 interage com as ciclinas mitóticas A e B e promove a transição de G_2 para a fase M (também é chamada de fator promotor de mitose). CDK_2 interage com as ciclinas D, E, A e funções na fase G_1 e S. Em ciclos celulares normais a progressão da fase S necessita de uma fase M completa, mas no processo de endoreduplicação esta dependência é desligada e a cromatina é re-licenciada mesmo que não ocorra mitose completa. Estes mecanismos são regulados pela concentração de CDKs e o uso de inibidores destas proteínas resulta em poliploidia (LARKINS et al., 2001).

Uma consequência fisiológica da poliploidia é o aumento no tamanho da célula, pois o volume da célula aumenta linearmente com cada complemento cromossômico extra. Este fato é explicado pela maior dosagem gênica encontrada nas células poliplóides, o que acarreta uma elevação na síntese de proteínas (STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

Em muitas células cancerosas o número e a estrutura dos cromossomos podem ser altamente variáveis, o que é denominado aneuploidia, que geralmente é consequência de uma poliploidia inicial. A aneuploidia é a situação em que o número de cromossomos não é um múltiplo exato do número haplóide característico da espécie. A aneuploidia é observada frequentemente em células tumorais, principalmente em tumores sólidos. A correlação entre aneuploidia e câncer é conhecida por décadas, no entanto a resposta à questão central ainda não foi respondida: a aneuploidia é uma causa contribuinte ou uma mera consequência secundária da transformação? (LENGAUER, 1997; STORCHOVA; PELLMAN, 2004).

2.1.6 Aneuploidia: causa ou consequência da tumorigênese?

Duas visões conflitantes sobre a tumorigênese são amplamente discutidas, a de que mutações gênicas específicas iniciam e mantêm o fenótipo alterado das células tumorais e a outra que diz que a aneuploidia é necessária e suficiente para a iniciação e progressão da transformação maligna. A aneuploidia, apesar de ter sido observada há aproximadamente um século e até 1960 ser considerada a causa da transformação maligna, permaneceu esquecida por cerca de 25 anos, pois a tecnologia da época não conseguiu identificar padrões de rearranjos cromossômicos específicos para diferentes tipos de câncer. No entanto, uma crescente lista de artigos comprova o papel da aneuploidia como suporte genético para o desenvolvimento do câncer (STOCK; BIALY, 2003).

O papel das mutações pontuais intra-gênicas no câncer está bem estabelecido. No entanto, a contribuição das grandes mudanças genômicas coletivamente conhecidas como aneuploidias é menos certa. Recentes trabalhos sugerem que a aneuploidia é necessária para a carcinogênese em camundongos e que a mesma pode colaborar com mutações intra-gênicas durante a tumorigênese. A plasticidade genômica proporcionada pela aneuploidia poderia facilitar mudanças na dosagem gênica que favoreceriam a tumorigênese e aceleraria o acúmulo de oncogenes e perda de genes supressores tumorais. Estas descobertas forçam a revisão da patogênese do

câncer de modo que tenha implicações significantes para a diagnose e terapia da doença (PIHAN; DOXSEY, 2003).

Nos estudos relacionados à tumorigênese, muita atenção foi dada à instabilidade genética e às taxas de mutações, no entanto uma elevada taxa de mutação não necessariamente causa o crescimento tumoral. A força evolucionária mais potente com certeza é a seleção natural, que atua diretamente aumentando a frequência de alelos vantajosos na população e é esta força que dirige o crescimento tumoral. O aumento na taxa de mutações pode acelerar o desenvolvimento da doença, mas as mutações não são necessárias para que a progressão tumoral ocorra. A seleção natural é o mecanismo que dirige a evolução celular, somática que leva ao câncer, assim como na evolução “à La Darwin” em nível de organismo (TOMLINSON; BODMER, 1999).

As teorias baseadas em mutações gênicas “genocêntricas” postulam, como citado anteriormente, que o câncer é causado pela expansão clonal de células, que acumularam mutações específicas necessárias para o desenvolvimento da doença, mas ao mesmo tempo como as células normais do mesmo organismo permanecem imutadas? De acordo com Duesberg et al. (2005 e 2007) o modelo genético convencional e os eventos epigenéticos não podem esclarecer as propriedades da carcinogênese citadas a seguir, sendo estas explicadas pela teoria cromossômica do câncer:

(1) Os tumores, em sua maioria, não são herdáveis e deste modo são extremamente raros em recém nascidos, sendo uma doença senil. De acordo com a teoria genocêntrica, o câncer deveria ser uma doença comum em recém nascidos, uma vez que os mesmos poderiam herdar genes mutantes do pai e da mãe, acumulando as mutações necessárias para a carcinogênese. Segundo a teoria cromossômica a aneuploidia é a causa iniciante do câncer e a mesma não é herdável, pois são corrompidos programas de desenvolvimento, o que seria fatal no desenvolvimento do embrião;

(2) Carcinogênicos não-mutagênicos podem causar câncer. Os carcinógenos são agentes químicos ou físicos que aceleram a

carcinogênese, podendo ser classificados em mutagênicos e não-mutagênicos. Os agentes que aceleram a carcinogênese, também chamados de promotores de tumor, são todos não mutagênicos ou não induzem mutações diretamente como o alcatrão, amianto, hidrocarbonetos aromáticos, níquel, arsênico, chumbo, certos corantes, uretano e dioxina. Segundo a teoria cromossômica os carcinógenos funcionam mais como “aneuploidógenos” que como mutágenos. A teoria da mutação gênica não consegue explicar como carcinógenos não-mutagênicos causam câncer. De fato os agentes mutagênicos podem induzir à aneuploidia por meio da destruição ou fragmentação direta dos cromossomos, como a radiação, mas os carcinógenos não mutagênicos podem causar aneuploidias por mecanismos diferentes, como provocando a disfunção dos microtúbulo;

(3) Os tumores somente se desenvolvem anos ou décadas depois da iniciação por carcinógenos. Muitos carcinógenos são mutagênicos e atuam rapidamente, causando alterações instantâneas no DNA como o Raio-X e a luz UV. No entanto, todos os carcinógenos, mutagênicos ou não, possuem uma ação lenta, que apresentam resultados em longo prazo, causando câncer somente após um período de “latência neoplásica”. De acordo com a teoria cromossômica a latência neoplásica seria o tempo necessário para que as células que sofreram uma aneuploidia inicial desenvolvam todas as alterações cromossômicas específicas para que as células tenham características neoplásicas;

(4) A teoria genocêntrica não oferece uma correlação exata entre câncer e aneuploidia, pois a presença das aneuploidias no câncer não é postulada ou mesmo predita. Estudos de expressão gênica em células tumorais por meio de “micro-arrays” identificaram expressão anormal de milhares de genes, correspondendo à ploidia anormal dos cromossomos correspondentes a estes genes;

(5) Em alguns tecidos são encontradas aneuploidias pré-neoplásicas. Estas células são observadas em exposições a carcinógenos, doenças herdáveis que predispoem a altas taxas de aneuploidia sistêmica como o xeroderma, síndrome de Werner, anemia Fanconi dentre outras e também em aneuploidias congênitas como a síndrome de Down que

aumentam a predisposição dos indivíduos ao câncer. A teoria cromossômica do câncer prediz que as aneuploidias pré-neoplásicas são intermediárias da evolução cromossômica que gera aneuploidias específicas do câncer;

(6) A variação cariotípica e fenotípica observada em células tumorais é muito maior que a taxa de mutações convencionais. Esta variabilidade cariotípica observada nas células de um mesmo tumor é a razão pela qual o câncer é constituído de uma população heterogênea de células não-clonais e parcialmente clonais. No entanto, uma em cada mil células tumorais aneuplóides geram um novo fenótipo específico por geração celular, em níveis consideravelmente maiores que as mutações convencionais;

(7) Apesar da alta variabilidade cariotípica encontrada nas células tumorais, desde 1960 foram encontradas diversas alterações cromossômicas câncer-específicas ou não randômicas, também denominadas aneusomias. Em alguns casos são observados a presença de cromossomos marcadores que são originados de rearranjos. Aneusomias específicas foram ligadas a diferentes eventos da carcinogênese como o estágio de transformação neoplásica, invasividade, metástase, resistência a drogas, possibilidade de transplante em outros hospedeiros, morfologia celular, metabolismo anormal e receptores virais câncer-específicos. Tais características são correlacionadas com a expressão alterada de milhares de genes, o que corresponde à presença ou ausência de cromossomos inteiros, gerados pela aneuploidia. Alterações cromossômicas não-randômicas ou câncer-específicas não são postuladas ou previstas pela teoria mutacional do câncer.

(8) O fenótipo das células tumorais é muito complexo para ser explicado pela teoria mutacional. Por exemplo, quando as células são expostas a determinada droga, o tumor pode adquirir resistência ao quimioterápico utilizado, no entanto é observado que as células também se tornam resistentes a diversas outras drogas, originando o fenótipo MDR (multi-drug resistance), caracterizando uma característica multigênica. Segundo a teoria cromossômica a carcinogênese não é dependente de mutação, pois a iniciação de um tumor é muito mais provável pela aneuploidização. A variação fenotípica via aneuploidização é de 4 a 11 vezes mais rápida que via mutação. A mutação observada nas células neoplásicas

pode ser uma consequência da aneuploidia e mesmo os tumores herdáveis observáveis em síndromes podem ser gerados pela aneuploidia;

(9) A teoria genética convencional explica a evolução tumoral por meio de mutações específicas e seleções darwinianas. Mas este modelo não pode explicar a presença de fenótipos não seletivos nas células tumorais. A presença de metástase não pode ser explicada, pois a mesma não fica presente no site de origem da doença. A multi-resistência a drogas somente seria interessante na presença de quimioterapia. Até mesmo a imortalidade não seria uma vantagem a ser selecionada, pois de acordo com o limite de Hayflick, a maioria das células tumorais já possui a capacidade de crescer além de 50 gerações, o que é suficiente para uma única célula formar uma massa celular equivalente a 10 seres humanos;

(10) Diversas mutações gênicas foram observadas em tumores desde 1980, mas nenhum deles é um gene causador do câncer. Primeiro porque as mutações encontradas no câncer não são tumores específicas. Quando esta informação é disponível, grande parte das mutações não é clonal. A expressão de hipotéticos genes causadores de câncer não é detectável sem métodos de amplificação. Apesar dos esforços nenhum gene mutante ou mesmo combinações de genes mutantes foram capazes de converter uma célula diplóide em uma célula cancerosa. Em contraste ao que seria predito pela teoria mutacional, muitas linhagens de camundongos que foram artificialmente implantados com hipotéticos genes causadores do câncer ou tiveram genes supressores tumorais deletados, sobreviveram normalmente em laboratório com o mesmo risco de câncer de camundongos normais.

2.1.7 Células-tronco e células-tronco tumorais

Células-tronco são definidas como células que possuem a capacidade de perpetuar-se por meio de auto-renovação e de dar origem às células maduras de tecidos específicos pelo processo de diferenciação. A capacidade de auto-renovação é uma função crucial para as células-tronco, uma vez que esta característica garante que as mesmas persistam ao longo da vida do animal. Na maioria dos tecidos as células-tronco são raras e

ocupam o topo da hierarquia de desenvolvimento dos tecidos. Estas células se dividem para formar duas células filhas. Uma destas células permanece como célula-tronco (auto-renovação) e a outra se transforma em uma célula progenitora que passa por um processo de expansão e posterior diferenciação em células maduras tecido específico (REYA et al., 2001; LI, NEAVES, 2006).

Existem três aspectos principais que relacionam as células-tronco e as células tumorais: (1) – similaridade entre os mecanismos que regulam a auto-renovação; (2) – possibilidade de que células tumorais possam surgir de células-tronco normais; (3) – Tumores podem conter “células-tronco tumorais” que são células raras com indefinido potencial proliferativo que promovem a proliferação e crescimento dos tumores. As células-tronco tumorais também são as responsáveis pela formação das metástases, uma vez que somente elas possuem capacidade mitótica para dar origem outra colônia tumoral (REYA et al., 2001).

As células-tronco possuem um alto potencial proliferativo e um tempo de vida muito maior quando comparadas com sua progênie e desta maneira possuem maior oportunidade de acumular mutações genéticas. Uma vez que as células-tronco já possuem grande potencial mitótico, seriam necessárias somente duas mutações para iniciar a tumorigênese e não as seis propostas por Hanahan e Weinberg (2000). Neste caso é necessário que tais células passem a produzir sinais de crescimento próprios e se tornem insensíveis aos sinais anti-proliferativos emitidos por outras células vizinhas (REYA et al., 2001; LI, NEAVES, 2006). Desta forma, genes que programam a auto-renovação no lugar da diferenciação celular são prováveis candidatos a oncogenes e as mesmas vias metabólicas que governam a auto-renovação em células-tronco normais parecem ser usurpadas pelas células-tronco tumorais de leucemias e outras neoplasias (CLARKE; FULLER, 2006).

As células-tronco residem em um microambiente especializado e fisiologicamente limitado denominado nicho. O Nicho é composto por um grupo de células em uma localização especial cuja função é dar suporte às células-tronco. O nicho produz fatores extrínsecos que controlam o número, a taxa de proliferação e determina o destino das células-tronco (LI, NEAVES,

2006). Desta forma, as células-tronco parecem necessitar de sinais parácrinos do nicho celular no qual reside para manter sua identidade e capacidade de auto-renovação. Estes sinais provavelmente são evolutivamente conservados e incluem repressão da tradução bem como reguladores de cromatina que reprimem a expressão de genes de diferenciação terminal nas células-tronco (CLARKE; FULLER, 2006).

2.1.8 Informações citogenéticas que podem auxiliar na caracterização cromossômica

2.1.8.1 Heterocromatina constitutiva

Heterocromatina constitutiva é a heterocromatina que ocorre em porções homólogas do par cromossômico, que apresentam heteropicnose, 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 cério (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).

O método utilizado para evidenciar a heterocromatina constitutiva é chamado banda C. Por meio deste método o DNA é preferencialmente eliminado das regiões eucromáticas, portanto após a coloração com Giemsa estas se apresentam com uma coloração mais fraca, enquanto a heterocromatina constitutiva fica fortemente marcada, evidenciando sua localização no cromossomo (COMINGS, 1973). Existem diferentes classes de heterocromatina constitutiva, pois sua composição é bastante variável, dependendo das bases nitrogenadas encontradas. A técnica de banda C faz uma marcação grosseira de toda a heterocromatina constitutiva, não sendo

capaz de diferenciar a composição da mesma. Neste caso é necessário que se utilizem outras técnicas que identifiquem as diferentes classes de heterocromatina (MANTOVANI et al., 2004).

As técnicas de coloração por fluorescência fornecem dados sobre a composição das heterocromatinas, pois alguns fluorocromos são capazes de se ligar especificamente a certos pares de bases do DNA. A utilização de fluorocromos G-C específicos tais 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 cromossômicas. As regiões de heterocromáticas associadas às NORs foram constatadas como sendo regiões “ricas” em bases G-C (SCHMID, 1980; STOCKERT, 2005).

Outra forma de analisar a heterocromatina constitutiva é utilizando enzimas de restrição. Cromossomos metafásicos são susceptíveis às enzimas de restrição (DNAses). As endonucleases de restrição reconhecem seqüências específicas na molécula de DNA, produzindo padrões de digestão específicos para cada par cromossômico, que ao ser corado com giemsa apresenta um padrão de coloração diferencial, característico para cada par do lote. O padrão de marcação produzido por cada enzima de restrição é facilmente reproduzível, deste modo essas enzimas podem ser utilizadas para entender a natureza e as características da porção de heterocromatina constitutiva do genoma, auxiliando também no pareamento dos cromossomos homólogos (MEZZANOTTE et al., 1983; SCHMID, 1988; VERMA; BABU, 1995).

2.1.8.2 Regiões organizadoras de nucléolos – NORs

NORs são as regiões cromossômicas nas quais os genes ribossômicos (DNAr) estão agrupados, a partir dos quais é transcrito o RNA ribossômico - RNAr. Estas regiões estão associadas aos nucléolos e são responsáveis pela sua reorganização ao final da divisão celular. As NORs ativas estão associadas com um grupo de proteínas específicas (MILLER et

al., 1976). 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 o 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 chamadas de proteínas Ag-NOR (argirofílicas), pois possuem grande afinidade pela Prata. Estas proteínas são não-histônicas e de natureza ácida, podendo ser consideradas como marcadores da atividade transcricional da célula (HOWELL; BLACK, 1980; WALKER, 1988; ISHIDA et al., 1993).

A técnica de impregnação com nitrato de Prata 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 transcionalmente 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. 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. (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 (GHOSH, 1976).

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 sendo que os cluster de rDNA estão localizados em regiões pericentroméricas (WINKING et al., 1980; 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.

A contagem das AgNORs é utilizada como um tipo de medida da atividade proliferativa de diversos tipos de tumor (OSHIMA; FORONES, 2001). As informações que dizem respeito à cinética do ciclo celular são utilizadas para mensurar quão proliferativo é um tumor este é um dado muito importante para o diagnóstico e prognóstico da doença (KANEKO, et al., 1991; ISHIDA et al., 1993)

2.1.9 Sarcoma 180

O Sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, foi isolado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo Swiss macho (*Mus musculus*). O tumor foi descoberto em 1914 pelo Dr. W. H. Woglom no laboratório Crocker nos Estados Unidos e foi mantido por transplantes sucessivos desde então. Inicialmente este tumor foi caracterizado como sendo de origem epitelial, pois, em estudos com microscopia ótica e eletrônica, foram observados contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando que se tratava de um carcinoma (ZUCKERBERG, 1973). No entanto, estudos posteriores verificaram que estas células não expressam laminina e desta forma não podem ter origem epitelial, sendo realmente classificado como sarcoma, pois provavelmente se originou de um tecido conjuntivo (ASSEF et al., 2002).

Atualmente a linhagem de células tumorais sarcoma 180 (TIB-66) pode ser obtida pela ATCC (American Type Culture Collection). As células tumorais podem ser mantidas por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor pode ser implantado de duas maneiras - células inoculadas na cavidade intraperitoneal se desenvolvem formando um tumor ascítico ("líquido"), enquanto células neoplásicas inoculadas no músculo formam tumores sólidos.

Histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células poliédricas de citoplasma basófilo e núcleo central, arranjas 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 sangüíneos (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

Estudos anteriores demonstraram que o complemento cromossômico do sarcoma 180 é altamente instável, variando de 20 a 480 cromossomos. Chakrabarti e Roychowdhury, (1980) descreveram o número modal de 75 cromossomos, enquanto Ghosh e Chaudhuri (1984) observaram o número modal de 73 cromossomos. 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. Pelo 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).

Atualmente a linhagem celular sarcoma 180 não possui uma caracterização cariotípica disponível no banco de dados da ATCC, sendo que a maioria das linhagens celulares fornecidas pela empresa possui dados citogenéticos disponíveis para consulta. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização genética da linhagem celular bem como utilizar a mesma para entender alguns aspectos da biologia tumoral, como expressão da telomerase, resposta cariotípica frente a diferentes tipos de manutenção da linhagem, presença de células-tronco tumorais e o papel da aneuploidia na progressão da neoplasia.

2.2 Referências Bibliográficas

ALBERTS, B. Câncer. In: ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, J. D. 3ª edição. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1994, p. 1255-1291.

ASSEF, M.L.M.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.; MORETÃO, M.P.; AZAMBUJA, A.P.; IACOMINI, M.; BUCHI, D.F. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with an α -d-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. **Braz. J. morphol. Sci.** v.19, p.49-54, 2002.

LARKINS, B.A.; DILKES, B.P.; DANTE, R.A.; COELHO, C.M.; WOO, Y.; LIU, Y. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication - **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.183-192, 2001.

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.

BARR, F. G. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. **Nature Genetics**, v.19, p.121-124, 1998.

BLACKBURN, E. H.; GREIDER, C. W. **Telomeres**, New York: Cold Spring Harbor, 1995. 396p.

BERTRAND, V.; COUTURIER-TURPIN, M.H.; LOUVEL, A.; PANIS, Y.; COUTURIER, D. Relation between cytogenetics characteristics of two human colonic adenocarcinoma cell lines and their ability to grow locally or metastasize or both: an experimental study in the nude mouse. **Cancer genetics and cytogenetics**, v.113, p.36-44, 1999.

BICUDO, H. E. M. C. Variabilidade das regiões organizadoras de nucléolos em eucariotos. **Ciência e Cultura**, v.37, 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.

CAMPISI, J.; KIM, S.; LIM C.; RUBIO, M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. **Experimental Gerontology**, v.36, p. 1619-1637, 2001.

CASARTELLI, C. Câncer and cytogenetics. **Revista Brasileira de Genética**, v.4, p. 1109-1131, 1993.

CHAKRABARTI, A.; ROYCHOWDHURY, J. Chromosome analysis with special reference to centromeric heterochromatin and ploidy variation in mouse Sarcoma – 180 cells. **Cytologia**, v.45, p.177-184, 1980.

CHANG, M.W.F.; GRILLARI, J.; MAYRHOFER, C.; FORTSCHEGGER, K.; ALLMAIER, G.; MARZBAN, G.; KATINGER, H.; VOGLAUER, R. Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells. **Experimental Cell Research**, v.309, p.121-136, 2005.

CHANG, S.; KHOO, C.; DePINHO, R.A. Modeling chromosomal instability and epithelial carcinogenesis in the telomerase-deficient mouse. **Cancer biology**, v.11, p.227-238, 2001.

CLARKE, M.F.; FULLER, M.; Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve. **Cell**, v.124, p.1111-1115, 2006.

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.; TANTRAVAH, 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.

DUELLI , D.; LAZEBNIK, Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nature reviews cancer*. **Nature Reviews Cancer**, v.7, p.968-976, 2007.

DUESBERG, P.; Li, R.; FABARIUS, A.; HEHLMANN, R. The chromosomal basis of cancer. **Cellular oncology**, v.27, p.293-318, 2005.

DUESBERG, P.; Li, R.; SACHS, R.; FABARIUS, A.; UPENDER, M.B.; HEHLMANN, R. Cancer drug resistance: The central role of the karyotype. **Drug Resistance Updates**. v.10, p.51–58, 2007.

GHOSH, S. The nucleolar structure. **International Review of Cytology**, v.44, p.1-28, 1976.

GHOSH, S.; CHAUDHURI, A. Analysis of three whole-arm translocations in a mouse sarcoma cell line. **Cytogenetics and cell genetics**, v.38, p.161-164, 1984.

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. **Introdução à Citogenética Geral**, Ribeirão Preto: Guanabara, 1988. 142p.

GUO, Y.; LIU, J.; LI, Y.; SONG, T.; WU, J.; ZHENG, C.; XUE, C. Effect of vector-expressed shRNAs on hTERT expression. **World journal of gastroenterology**, v.11, p.2912-2915, 2005.

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.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v.100, p.57–70.

HESELMAYER, K. MACVILLE, M.; SCHROCK,E.; BLEGEN, H.; HELLSTROM,A.C.; SHAH, K.; AUER, G.; RIED, T. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q. **Genes Chromosomes Cancer**, v.19, p.233–240, 1997.

HINGORANI,SR.; PETRICON, E.F.; MAITRA, A.; RAJAPAKSE,V.; KING, C.; JACOBETZ, M.A.; ROSS, S.; CONRAD, T.P.; VEENSTRA, T.D.; HITT, B.A.; KAWAGUCHI, Y.; JOHANN,D.; LIOTTA, L.A.; CRAWFORD, H.C.; PUTT, M.E.; JACKS, T.; WRIGHT, C.V.E.; HRUBAN, R.H.; LOWY, A.M.; TUVESON, D.A. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse **Cancer Cell**, v.4, p.437 – 450. 2003.

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.

ISHIDA, T.; KANEKO, S.; AKAZAWA, K.; TATEISHI, M.; SUGIO, K.; SUGIMACHI, K. Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression and Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions as Factors Influencing Prognosis of Surgically Treated Lung Cancer Patients **Cancer Research**, v.53, p.5000-5003, 1993.

KANEKO, S.; ISHIDA, T.; SUGIO, K.; YOKOYAMA, H.; SUGIMACHI, K. Nucleolar Organizer Regions as a Prognostic Indicator for Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Research** v.51, p.4008-4011, 1991.

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.

KIM, N.W.; PIATYSZEK, M.A.; PROWSE, K.R.; HARLEY, C.B.; WEST, M.D.; HO, P.L.; COVIELLO, G.M.; WRIGHT, W.E.; WEINRICH, S.L.; SHAY, J.W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, v.266, p.2011-2015, 1994.

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

LARIZZA, L. & SCHIRRMACHER, V. Somatic cell fusion as a source of genetic rearrangement leading to metastatic variants. **Cancer Metastasis Rev.** v.3, p.193–222, 1984.

LEJNINE, S.; MAKAROV, V.L.; LANGMORE, J.P. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.92, p.2393–2397, 1995.

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

LI, L.; NEAVES, W.B. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters. **Cancer Res.** v.66, p.4553-4557, 2006.

LI, S.; CROTHERS, J.; HAQQ, C.M.; BLACKBURN, E.H. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. **The journal of biological chemistry**, v.280, p. 23709-23717, 2005.

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.

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.

MILLER, O. J. Cytogenetics of the mouse. **Annual review of genetics**, v.9, p.285-303, 1975.

MILLER, O.J.; MILLER, D.A.; DEV, V.G.; TANTRAVAH, R.;CROCE, C.M. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse–human somatic cells hybrids. **Proc. Natl Acad. Sci.** v.73, p.4531–4535, 1976.

OJOPI, E. P. B; NETO, E. D. Genes e câncer, alguns eventos moleculares envolvidos na formação de um tumor. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.27, p. 28-38, 2002.

OSHIMA, C.T.F.; FORONES, N.M. AgNOR em câncer gástrico. **Arq Gastroenterol**, v.38, p.89-93, 2001.

PIECZARKA, J. C.; MATTEVI, M. S. Heterocromatina constitutiva In: DUARTE, F. A. M. 7ª edição, **Série Monografias / Sociedade Brasileira de Genética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1998, p.185-225.

PIHAN, G.; DOXSEY, S.J. Mutations and aneuploidy: Co-conspirators in cancer? **Cancer cell**, v.4, p.89-94, 2003.

PONDER, B. A. J. Câncer genetics. **Nature**, v.411, p.336-341, 2001.

PROWSE, K.R.; GREIDER, C.W. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. **Cell biology**, v.92, p.4818-4822, 1995.

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.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R.A. Comparative biology of mouse versus human cells: modeling human cancer in mice **Nature reviews cancer**, v.3, p.952-959, 2003.

REYA, T.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F.; WEISSMAN, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v.414, p.105-111, 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. **Proc. Natl Acad. Sci**, v.97, 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.

STOCK, R.P.; BIALY,H. The sigmoidal curve of cancer. **Nature biotechnology**, v.21, p.13-14, 2003.

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.

STORCHOVA, Z.; PELLMAN,D. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. **Molecular cell biology**, v.5, p.45-54, 2004.

SUMNER, A.T. Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topo II. **Chromosoma**, v.107, p.486–490, 1998.

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.

TAKAHASHI, A.; HIGASHINO, F.; AOYAGI, M.; YOSHIDA, K.; ITOH, M.; KYO, S.; OHNO, T.; TAIRA, T.; ARIGA, H.; NAJAJIMA, K.; HATTA, M.; KOBAYASHI, M.; SANO, H.; KOHGO, T.; SHINDOH, M. EWS/ETS Fusions activate telomerase in Ewing`s tumor. **Cancer research**, v.63, p. 8338-8334, 2003.

TOMLINSON, I.; BODMER, W. Selection, the mutation rate and cancer: Ensuring that the tail does not wag the dog. **Nature medicine**, v.5, p.11-12, 1999.

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

WALKER, R. A. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. **Histopathology**, v.12, p.221-223, 1988.

WINKING, H.; NIELSEN, K.; GROPP, A.; Variable positions of NORs in *Mus musculus* **Cytogenet. Cell. Genet.**, v.26, p.158-164, 1980.

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

3 Análises citogenéticas e expressão da telomerase em sarcoma 180

Robson J. Oliveira-Júnior¹, Carlos Ueira Vieira ¹, Luiz R. Goulart¹,
Sandra Morelli [§]

² Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de
Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

[§]Corresponding author

Email addresses:

SM: morelli@ufu.br

RJOJ: robson_junr@yahoo.com.br

Resumo

O câncer é uma doença resultante da instabilidade genética. Existem duas linhas teóricas que tentam explicar a origem da patologia, a teoria da mutação pontual convencional e a teoria cromossômica do câncer. Diversas características das células neoplásicas que não podem ser explicadas pelas mutações convencionais são explicadas pela teoria cromossômica. A telomerase desempenha um papel importante no surgimento e desenvolvimento do câncer, permitindo que as células tumorais se proliferem sem as barreiras impostas pela erosão telomérica. É observado, frequentemente, que o câncer possui células específicas que são responsáveis pela progressão tumoral. O objetivo do presente trabalho foi entender alguns aspectos da biologia tumoral, como expressão da telomerase, resposta cariotípica frente a diferentes tipos de manutenção da linhagem, presença de células-tronco tumorais e o papel da aneuploidia na progressão da neoplasia. A linhagem celular sarcoma 180 possui uma população heterogênea de células, com número modal de 68 cromossomos (tetraplóide) e número cromossômico variando de 16 a 232. A linhagem

celular não apresentou diferenças cariotípicas referentes aos diferentes tipos de manutenção celular ou diferentes tempos de progressão tumoral. Em todas as metáfases analisadas foram encontrados cromossomos marcadores, sendo eles três cromossomos metacêntricos e quatro microcromossomos. A heterocromatina constitutiva é rica nas bases A-T e sua localização é conservada nas regiões pericentroméricas. As NORs encontram-se ativadas, em pelo menos um cromossomo do par, em todos os cromossomos que possuem a sequência de DNAr, sendo eles os cromossomos 2, 4, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 e 19. Dentro da população encontram-se algumas células que possuem as combinações cromossômicas ideais para a perpetuação do tumor, que foram denominadas células-tronco tumorais. A linhagem possui elevada expressão da telomerase, que permite com que as células se proliferem indefinidamente. A tetraploidia observada em sarcoma 180 foi originada via endoreduplicação e durante a evolução cariotípica da linhagem, foram selecionadas alterações cromossômicas específicas que conferem vantagens adaptativas às células tumorais.

Palavras chave: Sarcoma 180, telomerase, caracterização cromossômica

Abstract:

The cancer is a result of genetic instability. There are two theoretical lines which try to explain this pathology origin, the conventional genetic theories and the chromosomal theory of cancer. A lot of neoplastic cell characteristics can't be explained by the conventional theories and they are explained by the chromosomal theory. The telomerase plays an important role in cancer development, allowing the tumor cells to proliferate without the barriers imposed by the telomeric erosion. It is frequently observed that cancer possesses specific cells responsible by the tumor progression. The purpose of this work was to understand some tumor biology aspects as the telomerase expression, karyotypical response to different types of the cell line maintenance, presence of tumor stem cells and the aneuploidy role in the tumor progression. The sarcoma 180 cell line has an heterogeneous cell population, with modal number of 68 chromosomes (tetraploid) and chromosomal number ranging from 16 to 232. The cell line didn't show karyotypical differences concerned to the different types of cellular

maintenance and different times of tumor progression. In all the analyzed metaphases it was found marker chromosomes (three metacentric and four micro-chromosomes). The constitutive heterochromatin is “A-T rich” and its localization is kept in the pericentromeric regions. The NORs are activated at least in one chromosome of the pair, in all the chromosomes with rDNA (2, 4, 8, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18 e 19). In the cell population it was found cells that possess the correct chromosomal combination to perpetuate the tumor. These cells were called tumor stem-cells. The cell line possesses a high telomerase expression allowing the indefinite cell proliferation. The tetraploidy observed in sarcoma 180 was originated by endoreduplication and during the cell line development, it was selected specific chromosomal alterations which give adaptive advantages to the tumor cells.

Key words: Sarcoma 180, telomerase, chromosomic cacterization

3.1 Introdução

A instabilidade genética ou mudanças no número e estrutura cromossômica são importantes fatores na oncogênese. A consequência da instabilidade genética pode ser uma alteração no número de cópias de um ou mais genes, mudança na expressão gênica ou mudança na estrutura dos genes, alterando a seqüência da proteína correspondente (SAUNDERS et al., 2000). O surgimento das células cancerígenas está intimamente relacionado com mutações e mudanças na estrutura cromossômica, tornando importante seu estudo citogenético. Os dados citogenéticos indicam que mudanças cromossômicas em um tumor podem ser utilizadas para classificação, diagnose e prognóstico do mesmo (CASARTELLI, 1993; HAHN; FLETCHER, 2005).

Os telômeros são estruturas fundamentais para manter a estabilidade genética da célula. Eles finalizam os cromossomos lineares, mantendo a integridade cromossômica, sendo essenciais para garantir uma adequada estrutura e função cromossômica (KARLSEDER et al.,1999). Diversas evidências sugerem que os telômeros contribuem para a iniciação e progressão de tumores malignos de diversas maneiras. A instabilidade genética causada pela disfunção telomérica é um dos principais fatores que

predispõe as células à transformação neoplásica (CAMPISI, 2001). Devido às grandes alterações genéticas que ocorrem durante a tumorigênese, muitas dessas células entram em apoptose. Somente raras células emergem da crise por meio da ativação de mecanismos de manutenção telomérica, mais comumente pelo aumento da expressão da telomerase (MASER, R.S.; DEPINHO, R.A., 2002). A telomerase desempenha um importante papel no crescimento de tumores e na imortalização de células. A reativação desta enzima parece ser um evento crítico que promove a sustentação da proliferação tumoral removendo a barreira do encurtamento telomérico (CHANG et al., 2001).

Duas visões conflitantes sobre a tumorigênese são amplamente discutidas, a de que mutações gênicas específicas iniciam e mantêm o fenótipo alterado das células tumorais e a outra que diz que a aneuploidia é necessária e suficiente para a iniciação e progressão da transformação maligna. Uma crescente lista de artigos comprova o papel da aneuploidia como suporte genético para o desenvolvimento do câncer. (STOCK; BIALY, 2003). De acordo com Duesberg et al. (2005 e 2007) o modelo genético convencional e os eventos epigenéticos não podem esclarecer algumas propriedades da carcinogênese, sendo estas explicadas pela teoria cromossômica do câncer. Esta teoria diz que a plasticidade genômica proporcionada pela aneuploidia poderia facilitar mudanças na dosagem gênica que favoreceriam a tumorigênese e aceleraria o acúmulo de oncogenes e perda de genes supressores tumorais (PIHAN; DOXSEY, 2003; DUESBERG et al. 2005 e 2007).

A linhagem celular sarcoma 180 não possui uma caracterização cariotípica disponível no banco de dados da ATCC, sendo que a maioria das linhagens celulares fornecidas pela empresa possui dados citogenéticos disponíveis para consulta. Desta maneira, o objetivo do presente trabalho foi entender alguns aspectos da biologia tumoral, como expressão da telomerase, resposta cariotípica frente a diferentes tipos de manutenção da linhagem, papel das células-tronco tumorais e da aneuploidia na progressão da neoplasia.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Manutenção dos animais e da linhagem tumoral

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia sob condições controladas. Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso médio de 25 g e um mês de idade, fornecidos pela Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação Ltda, Minas Gerais, agrupados em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de 26 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*.

A linhagem tumoral Sarcoma 180 obtida da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) foi mantida *in vivo* por meio de repiques semanais, nos quais 200 µL do tumor ascítico presente na cavidade peritoneal eram transferidos de um animal ao outro. Os tumores sólidos foram obtidos por meio da inoculação intramuscular. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) por meio de deslocamento cervical ou inalação de éter.

Também foram utilizadas células normais do camundongo como parâmetro de comparação com o tumor. Para obtenção de destas foram utilizadas as medulas ósseas, que foram assepticamente coletadas em um tubo de ensaio com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de solução fisiológica estéril. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 900 rpm, o sobrenadante foi descartado e os procedimentos para a obtenção de cromossomos mitóticos se prosseguiram.

3.2.2 Cultura celular

A linhagem celular também foi mantida *in vitro*. As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² em meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK), suplementado com 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e 10% de soro fetal bovino inativado por aquecimento (Cultilab,

Campinas, Brazil). As células foram mantidas em uma estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.2.3 Expansão Clonal

Para a realização da expansão clonal as células foram mantidas em uma placa de ELISA com 96 poços, contendo 200 µL de meio completo. A viabilidade das células cultivadas em frascos de 25 cm² foi avaliada pelo teste de exclusão por azul de tripan descrito por Strober (1991). Posteriormente estas células foram ressuspensas em meio e diluídas até a proporção de 1 célula/µL. Foi transferida a alíquota de 1 µL para cada poço da placa de ELISA, e a mesma foi analisada em microscópio invertido (Olympus). Os poços que continham apenas uma célula foram marcados e o desenvolvimento celular foi acompanhado até a obtenção do número adequado de células para realizar as análises cromossômicas e o repique no animal.

3.2.4 Caracterização citogenética convencional

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica de preparações diretas (*in vivo*) descrita por Guerra (2002). A heterocromatina constitutiva foi marcada por banda C (Sumner, 1972), coloração com cromomicina A3 (Schmid, 1980) e coloração com Hoechst 33258 (Verma e Babu, 1995). Os cromossomos mitóticos também foram marcados utilizando a técnica de bandamentos por endonucleases de restrição (Mezzanotte et al., 1983) utilizando as enzimas *Apa* I, *Bam*H I, *Dde* I, *Eco*R I e *Hind* III. As Regiões Organizadoras do Nucléolo (NORs) foram evidenciadas pela impregnação com nitrato de Prata (Howell; Black, 1980). As melhores metáfases foram escolhidas para a montagem final dos cariótipos, com a finalidade de determinar os tipos e tamanho dos cromossomos. Assim, as melhores metáfases foram fotografadas e tiveram seus cromossomos organizados em ordem decrescente de tamanho. A identificação dos cromossomos foi feita de acordo com o critério da razão entre os braços cromossômicos, proposta por Levan et al. (1964).

3.2.5 Extração do RNA total e reação de transcrição reversa

Foram coletadas amostras de células do tumor ascítico e de células normais obtidas do lavado intraperitoneal, sangue, mesentério e testículo dos animais. As células foram trituradas em um homegeinizador e o RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, Inc.). A reação de transcrição reversa foi realizada com 1 µg de RNA total das amostras completado para um volume final de 20 µL com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) contendo 10 unidades de inibidor de RNase, 40 unidades de transcriptase reversa MMLV, 1x MMLV-RT buffer, 200 µM de cada dNTP e 6 µM de primers hexâmeros randômicos. A reação foi incubada em um termociclador a 37°C por 1 hora, produzindo assim os cDNAs.

3.2.6 RT-PCR semi-quantitativa

Para a realização dos experimentos de expressão gênica foram utilizadas três amostras de diferentes animais para cada tecido analisado. O cDNA foi amplificado por PCR utilizando os seguintes primers para o gene da Telomerase: sentido 5'-GGATTGCCACTGGCTCCG-3'; antisenso 5'-TGCCTGACCTCCTCTTGAC-3'. O gene constitutivo da Actina foi utilizado como controle positivo interno para normalizar os produtos das reações de amplificação. Para a reação de PCR desse gene foram utilizados os seguintes primers: sentido 5'-GGCACCACACCTTCTACAATG-3' e antisenso 5' - GTGGTGGTGAAGCTGTAG - 3'.

Para as reações de amplificação 2 µL de cDNA foram adicionados a 20 µL de reação de PCR total, contendo 200 µM de cada dNTP, 10µM de primer, 2.0 mM de MgCl₂ para as reações da actina e 1.5 mM de MgCl₂ para as reações da telomerase, 1.5 unidades de Taq DNA polimerase e tampão 1x. As reações foram incubadas a 95°C por 5 minutos, seguidas por 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 59°C (telomerase) ou 55°C (actina) por 40 segundos e 72°C por 50 segundos, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O número ideal de ciclos de PCR foi determinado quando amplificação dos genes atingiu a fase exponencial.

3.2.7 Níveis relativos de expressão gênica avaliados por densitometria

O níveis de expressão relativa da telomerase foram obtidos por meio de análises densitométricas das amplificações dos genes da telomerase (gene alvo) e actina (gene constitutivo), que foram quantificados baseando-se na intensidade de coloração da banda correspondente, utilizando a razão gene alvo/gene constitutivo, no programa ImageMaster VDS, versão 2.0 (Amersham Biosciences).

3.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas referentes à distribuição cromossômica nos diferentes tipos de manutenção do tumor e diferentes tempos de progressão tumoral foram realizadas utilizando-se um intervalo de confiança para proporções pelo teste t-student a 0,05 de significância. Os gráficos e as análises estatísticas referentes à expressão da telomerase foram feitos utilizando o programa Statview for Windows versão 4.57 (Abacus Concepts, Inc., Copyright 1992-1996). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.3 Resultados

3.3.1 Distribuição do número cromossômico de acordo com o tipo de manutenção da linhagem celular e tempo de progressão tumoral

As análises cromossômicas foram realizadas em três diferentes tipos de manutenção da linhagem celular: Inoculação intraperitoneal (tumor ascítico), inoculação intramuscular (tumor sólido) e cultura celular. Nos tipos de manutenção *in vivo* (tumor ascítico e tumor sólido), também foram realizadas análises cromossômicas comparando três estágios de progressão tumoral (7 dias, 14 dias e 21 dias de desenvolvimento do tumor). A análise da progressão tumoral não foi realizada em estágios superiores a 21 dias para evitar o sofrimento do animal. As primeiras análises indicaram polimorfismo de tamanho entre os núcleos celulares (Figura 1), sendo que em alguns casos observaram-se alguns núcleos com tamanho três vezes superior ao de outras células.

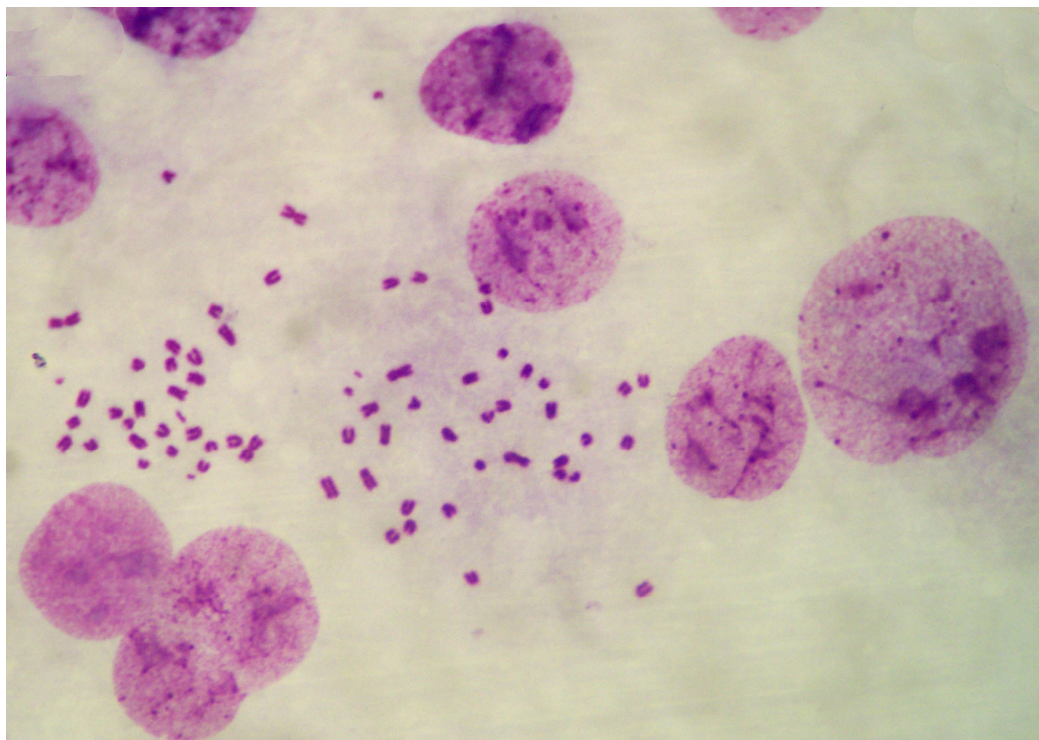


Figura 1 – Núcleos de sarcoma 180 indicando polimorfismo de tamanho.

Não foi observada diferença significativa na distribuição cromossômica entre os diferentes tipos de manutenção do tumor (Figura 2) e entre os diferentes dias de progressão tumoral (Tabela1, Figura 3 e 4). Foi analisado um total de 1050 metáfases, sendo que em todos os estágios de progressão tumoral e em todos os diferentes tipos de manutenção da linhagem celular, a maioria das metáfases analisadas (mais de 80%) apresentou complemento cromossômico quase tetraplóide. Agrupando-se todos os dados obteve-se um número modal de 68 cromossomos. Praticamente cromossomos presentes nas células são classificados como acrocêntricos, no entanto foi observada a presença de cromossomos marcadores em todas as metáfases analisadas, sendo eles em maioria 3 cromossomos metacêntricos e 4 micro-cromossomos (Figura 5).

Nas células cultivadas *in vitro*, apesar do maior percentual de células tetraplóides, foi observada uma maior distribuição da ploidia, com maior número de células diplóides e triplóides, quando comparada com os tipos de manutenção tumoral *in vivo*. Também foi observado um maior número de aberrações cromossômicas nas células mantidas em cultura, com diversas quebras, associações e até mesmo pulverização cromossômica (Figura 6).

Tabela1 – Distribuição do número cromossômico de acordo com o tempo de progressão tumoral em tumores ascíticos e sólidos de sarcoma 180. (VNC) – Variação do número cromossômico (NM) – Número modal (Nº NM) – Nº de metáfases que apresentaram o número modal (Nº TMA) – Número total de metáfases analisadas. A ploidia com maior incidência encontra-se destacada em negrito.

	Tempo de progressão tumoral					
	7 Dias		14 Dias		21 Dias	
	Ascítico	Sólido	Ascítico	Sólido	Ascítico	Sólido
VNC	35-135	27-73	23-139	67-73	16-142	25-74
Haplóide (n)	0 %	0 %	0 %	0 %	1,5 %	0 %
Diplóide (2n)	0,8 %	5,0 %	2,0 %	0 %	6,9 %	3,7 %
Triplóide (3n)	7,9 %	7,5 %	10,2 %	0 %	9,2 %	11,1 %
Tetraplóide (4n)	85,7 %	87,5 %	85,8 %	100 %	81,6 %	85,2 %
Pentaplóide (5n)	0,8 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
Hexaplóide (6n)	0,8 %	0 %	1,0 %	0 %	0 %	0 %
Heptaplóide (7n)	4,0 %	0 %	1,0 %	0 %	0,8 %	0 %
NM	70	71	68	71	68	71
Nº NM	24	17	21	9	17	13
Nº TMA	125	40	98	15	130	28

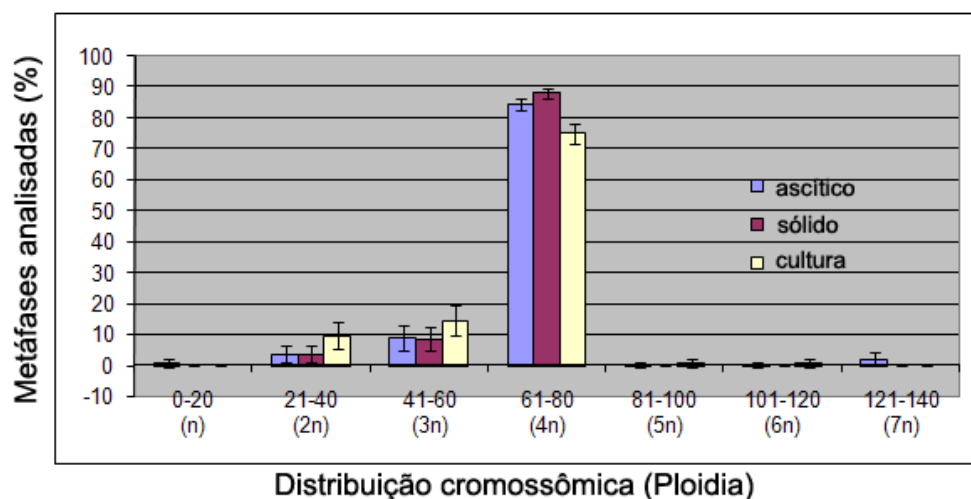


Figura 2 – Distribuição do número cromossômico de sarcoma 180 de acordo com o tipo de manutenção da linhagem celular. Foi utilizado o intervalo de confiança para proporções pelo teste t-student a 0,05 de significância. As barras representam $\pm$ erro.

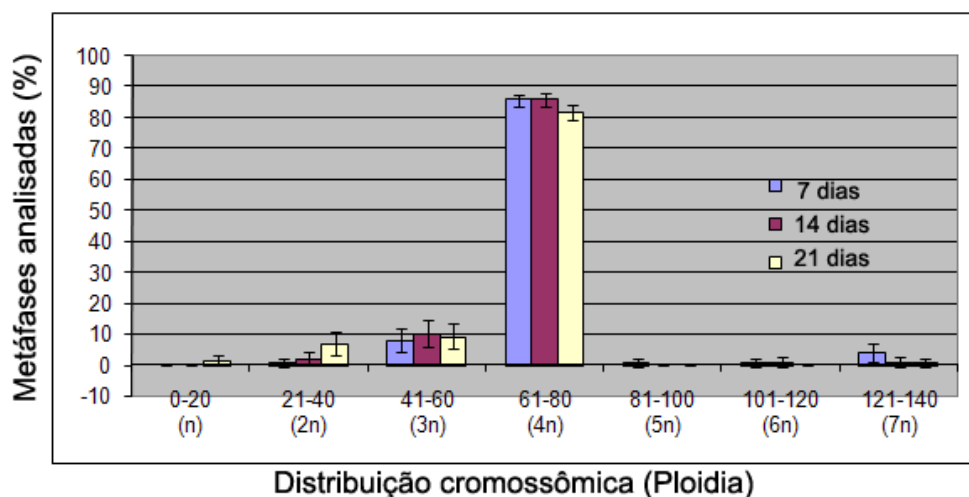


Figura 3 – Distribuição do número cromossômico de sarcoma 180 de acordo com o tempo de progressão do tumor ascítico. Foi utilizado o intervalo de confiança para proporções pelo teste t-student a 0,05 de significância. As barras representam $\pm$ erro.

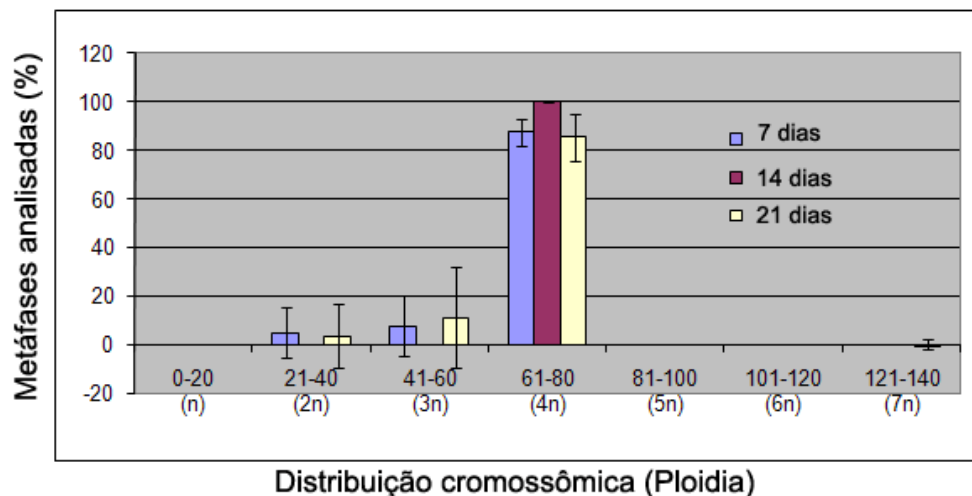


Figura 4 – Distribuição do número cromossômico de sarcoma 180 de acordo com o tempo de progressão do tumor sólido. Foi utilizado o intervalo de confiança para proporções pelo teste t-student a 0,05 de significância. As barras representam $\pm$ erro.

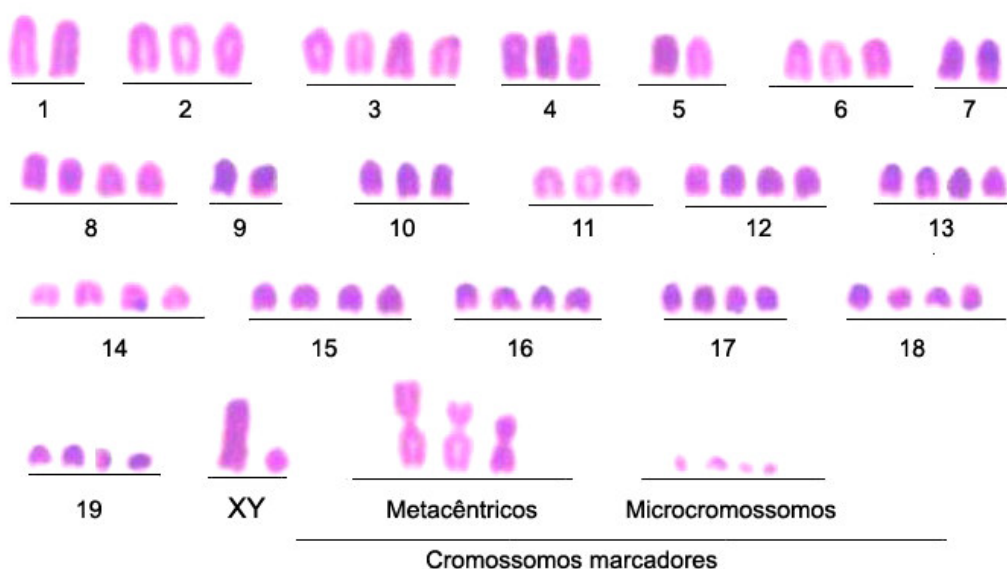


Figura 5 – Cariótipo representativo de sarcoma 180 corado com Giemsa.

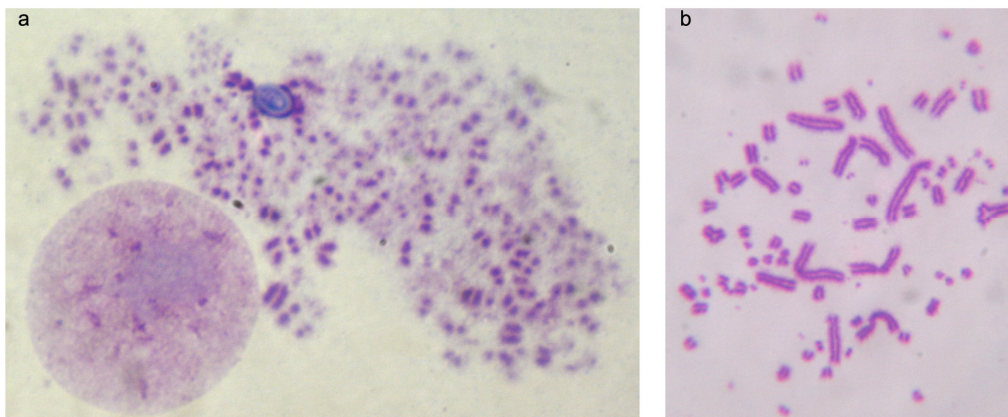


Figura 6 – Metáfases de sarcoma 180 mantidas em cultura. (a) – pulverização cromossômica. (b) – Quebras e associações cromossômicas.

3.3.2 Expansão clonal

Foram individualizadas, ao todo, 50 células em poços separados de uma placa de Elisa. Destas 50 células, apenas uma foi capaz de crescer e formar uma linhagem clonal. O desenvolvimento desta célula foi acompanhado e fotografado (Figura 7). As análises cromossômicas mostraram que a maioria absoluta da progênie (52% das metáfases analisadas) apresentou-se sob forma heptaplóide ($7n$) (Figura 8). No entanto, os clones mantiveram um grande número de células com o cariótipo tetraplóide característico da linhagem (32% das metáfases analisadas). Em algumas metáfases observou-se a presença de diplocromossomos (Figura 9), indicativos da ocorrência de endoreduplicação.

Quando a cultura clonal adquiriu um número de células suficiente, a linhagem foi inoculada no peritônio de 3 animais. Após o desenvolvimento do tumor, estas células foram recuperadas e citogeneticamente analisadas. Foi observado que a linhagem voltou ao seu estado tetraplóide original, (91,6% das metáfases analisadas).

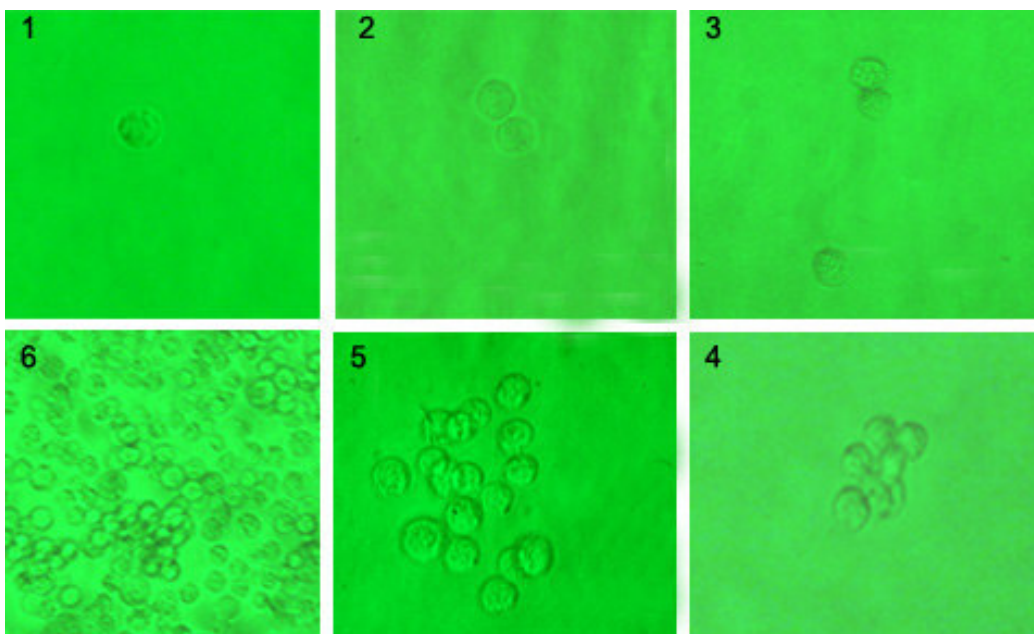


Figura 7 – Foto-micrografia da expansão clonal realizada em sarcoma 180. Uma célula foi individualizada e seu desenvolvimento foi acompanhado em um microscópio invertido. Aumento de 400X.

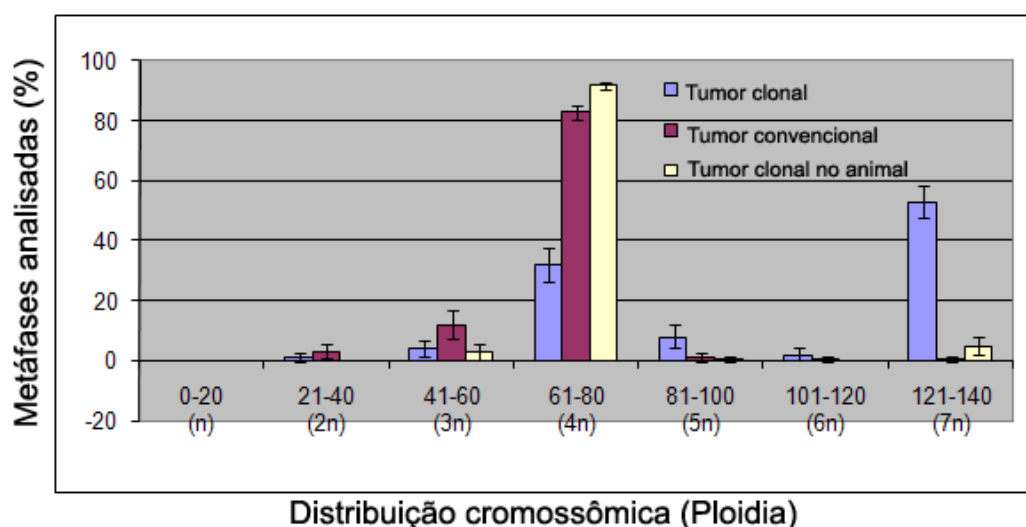


Figura 8 – Distribuição do número cromossômico em células de sarcoma 180 obtidas por meio de expansão clonal (azul), comparadas com a linhagem celular convencional (vermelho) e com as células resultantes da expansão clonal obtidas depois da inoculação em animais (amarelo). Foi utilizado o intervalo de confiança para proporções pelo teste t-student a 0,05 de significância. As barras representam $\pm$ erro.

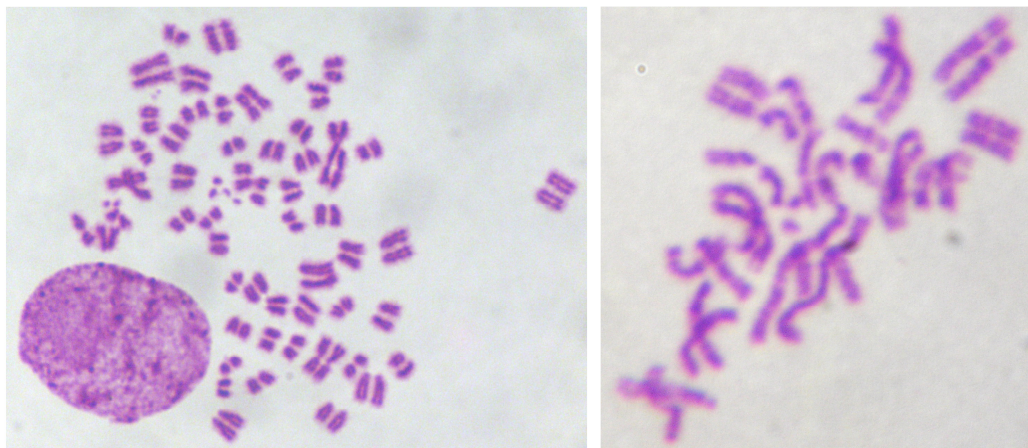


Figura 9 – Metáfases de sarcoma 180 demonstrando poliploidização via endoreduplicação.

3.3.3 Banda C

A linhagem tumoral Sarcoma 180 apresentou blocos de heterocromatina constitutiva localizados na região pericentromérica, representados pelas regiões com coloração mais forte (Figura 10). Os cromossomos metacêntricos (marcadores) apresentaram grandes blocos heterocromáticos centroméricos.

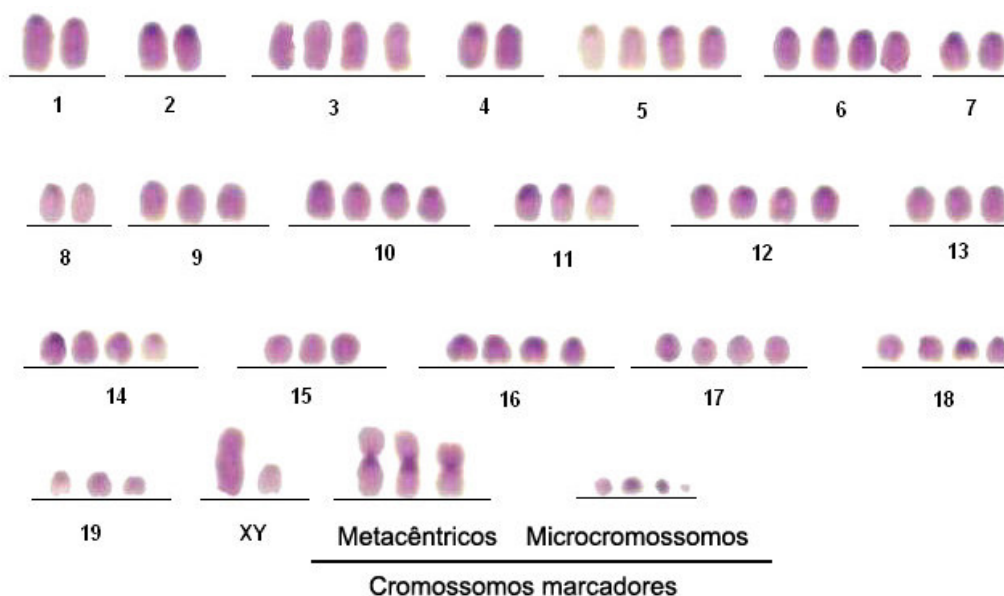


Figura 10 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à banda C. As regiões mais fortemente coradas perto dos centrômeros representam os blocos de heterocromatina constitutiva.

3.3.4 Coloração com fluorocromos base-específicos

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 região cromossômica mais intensamente marcada quando coradas com CMA3 (Figura 11). Mesmo quando contra-corados com Distamicina, que torna o método mais sensível, os cromossomos não apresentaram nenhuma região “rica” em G-C.

A coloração com Hoechst 33258, que é um corante fluorescente que tem afinidade pelas bases nitrogenadas Adenina e Timina (A-T), revelou regiões “ricas” nestes pares de bases. Tanto as metáfases de células de camundongos normais quanto metáfases de Sarcoma 180 (Figura 12), tiveram suas regiões pericentroméricas marcadas. Os cromossomos metacêntricos marcadores novamente apresentaram grandes blocos de heterocromatina marcados na região centromérica.

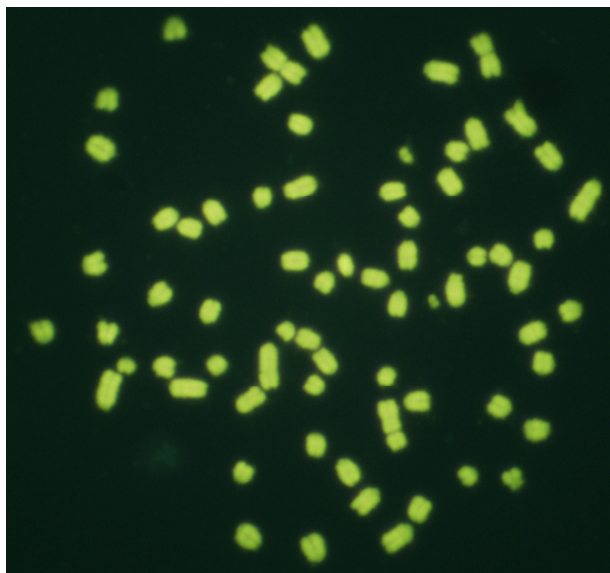


Figura 11 – Metáfase de sarcoma 180 corada com Cromomicina A₃. Não foi observada nenhuma marcação de heterocromatina constitutiva “rica” em G-C.

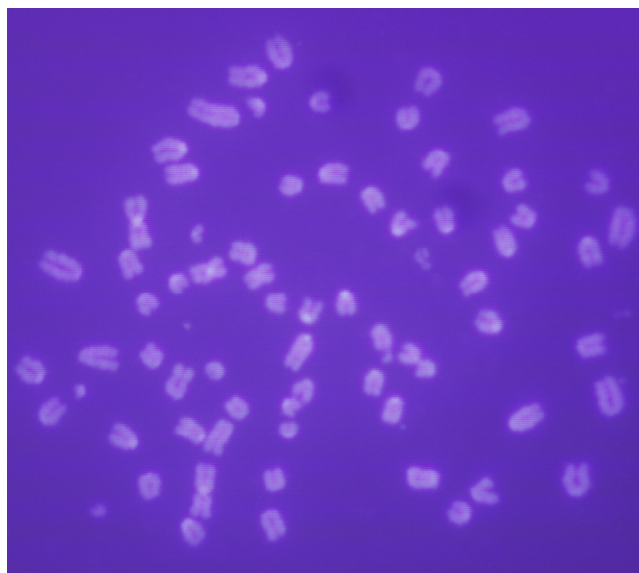


Figura 12 – Metáfase de sarcoma 180 corada com Hoechst 33258. As regiões mais claras nas regiões centroméricas representam os blocos de heterocromatina constitutiva “rica” em A-T.

3.3.5 Bandamentos por enzimas de restrição

As lâminas contendo os cromossomos mitóticos foram submetidas ao tratamento com diferentes enzimas de Restrição. As enzimas de restrição *Dde* I e *Bam* HI produziram bandas transversais (características para cada cromossomo homólogo do complemento) em todos os cromossomos do lote, o que facilitou a montagem de um cariótipo baseado neste padrão de digestão cromossômica (figura 13 e 14). A enzima *EcoR* I produziu o mesmo padrão de marcação observado na banda C, revelando blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica dos cromossomos acrocêntricos e grandes blocos heterocromáticos nos cromossomos metacêntricos. Já as enzimas *Apa* I e *Hind* III, além de revelarem regiões de banda C, produziram heteropiconose nas regiões biteloméricas de alguns cromossomos do complemento, inclusive nos cromossomos metacêntricos.

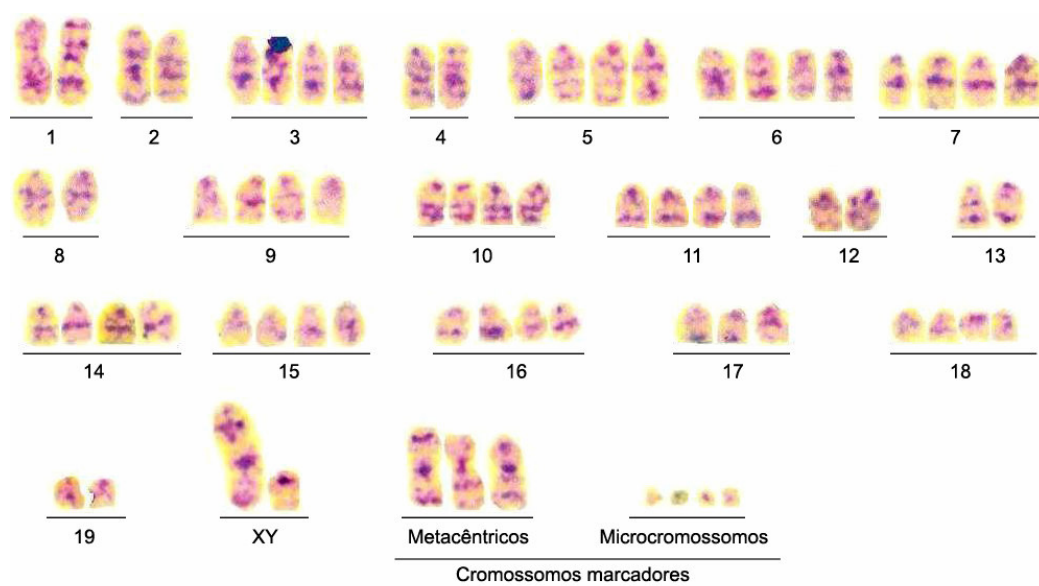


Figura 13 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à digestão com a enzima de restrição *Dde* I.

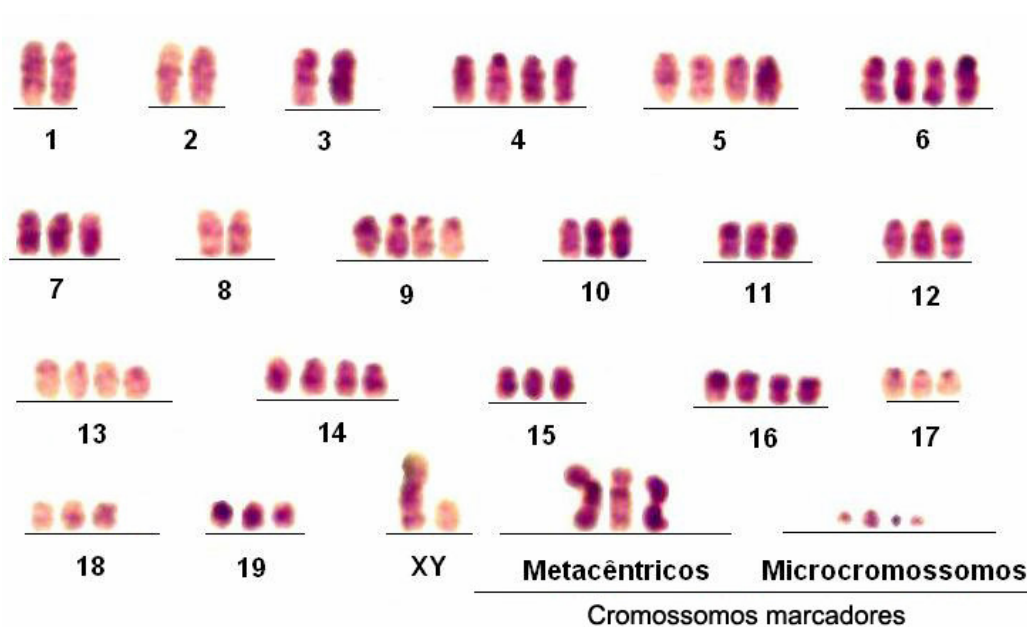


Figura 14 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à digestão com a enzima de restrição *Bam* HI.

3.3.6 Regiões Organizadoras do Nucléolo – NORs

As metáfases provenientes de células normais dos camundongos utilizados nos experimentos apresentaram NORs em um cromossomo de cada par, em seis pares diferentes (12, 15, 16, 17, 18 e 19). Já as metáfases do Sarcoma 180 apresentaram pelo menos 11 cromossomos com NORs ativos (Figura 15). Além das marcações em um cromossomo dos pares 12, 15, 16, 17, 18 e 19, também foram observadas marcações em cromossomos dos pares 2, 4, 8, 10 e 11. Além destes cromossomos, dois dos cromossomos metacêntricos observados nesta linhagem celular apresentaram marcações quando corados com nitrato de prata. Foi observado também que o segundo cromossomo do Sarcoma 180 possui uma grande amplificação da região organizadora do nucléolo em sua região telomérica. Comparando-se os nucléolos de células normais com os nucléolos de células do Sarcoma 180, observa-se que há grande desorganização nos nucléolos das células tumorais, além de aparentarem ter um maior número e maior atividade dessas regiões (Figura 16).

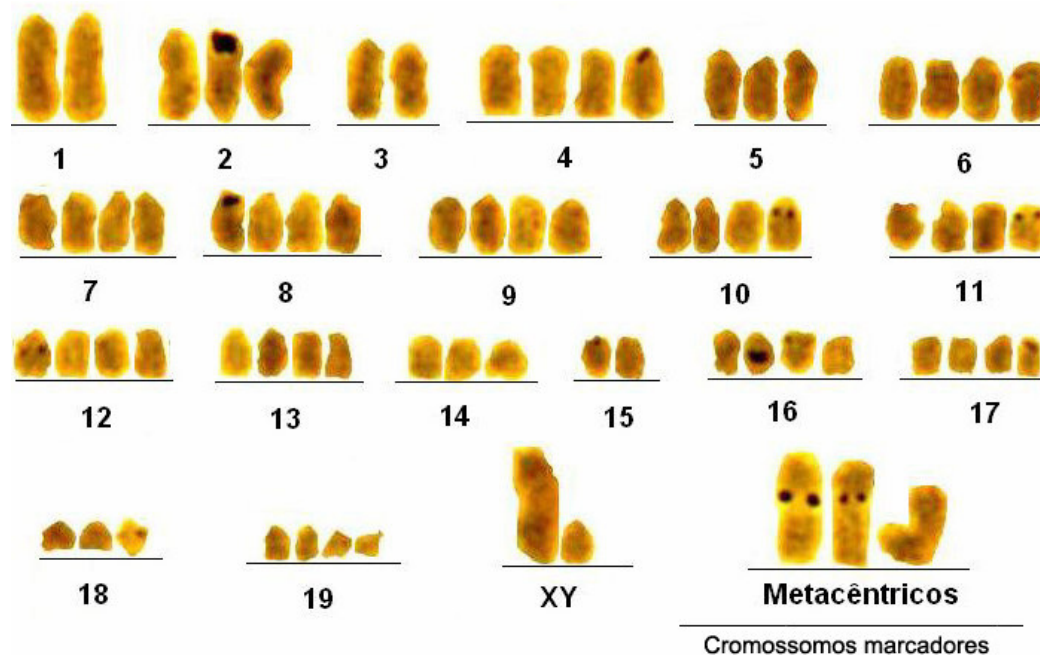


Figura 15 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à impregnação com nitrato de Prata. As regiões cromossômicas mais escuras correspondem à NORs.

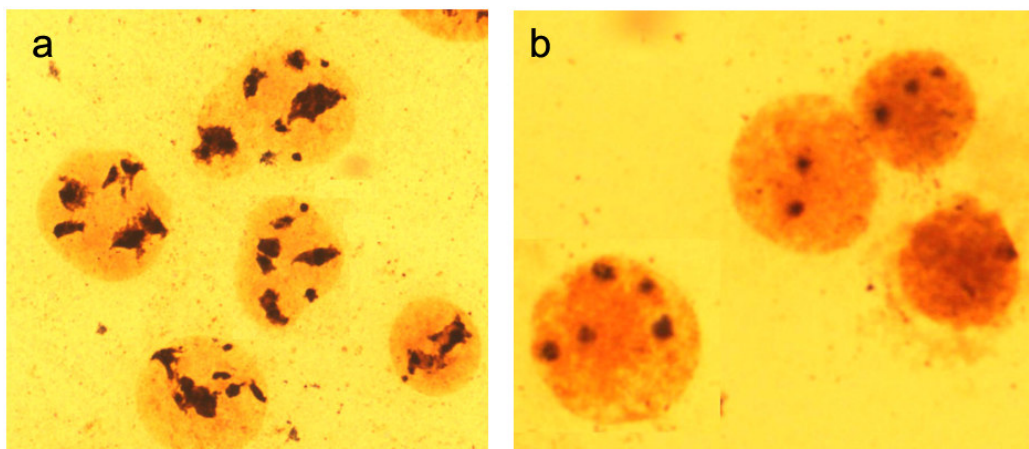


Figura 16 – Núcleos interfásicos de sarcoma 180 (a) e células da medula óssea (b) coradas com nitrato de Prata. As regiões escuras representam as NORs ativas.

3.3.7 Banda G

As lâminas contendo metáfases de Sarcoma 180 foram tratadas 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 17). 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.

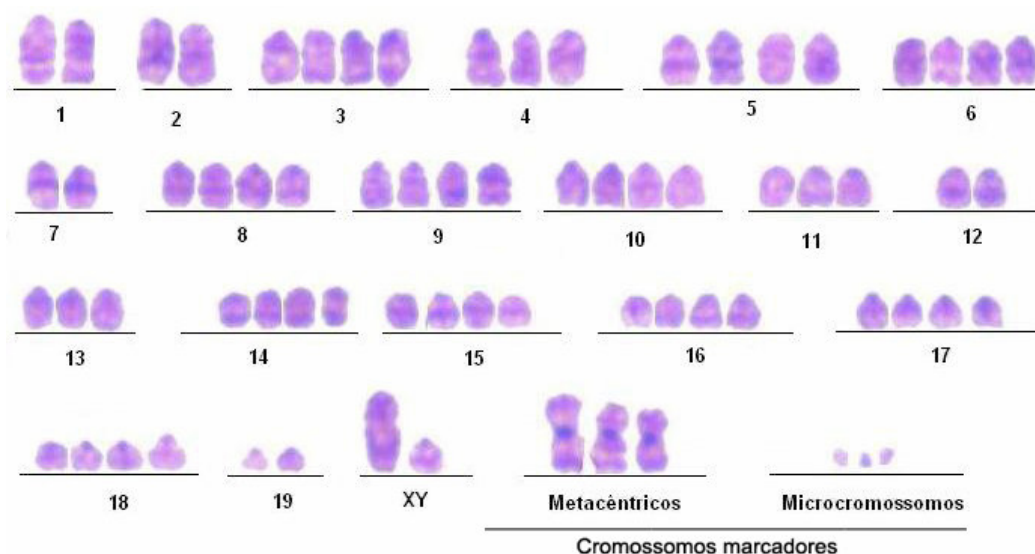


Figura 17 – Cariótipo de sarcoma 180 submetido à digestão com tripsina.

3.3.8 Expressão da Telomerase por RT-PCR

Foi analisada a expressão semi-quantitativa do gene da telomerase e de quatro diferentes tecidos de camundongos (lavado peritoneal, sangue, mesentério e testículo). Observou-se que a expressão da telomerase em sarcoma 180 é muito superior à expressão encontrada nos outros tipos celulares analisados. Mesmo quando comparada ao testículo, que é um tecido com intensa atividade proliferativa, a expressão de telomerase em sarcoma 180 apresentou-se praticamente duplicada (Figuras 18 e 19).

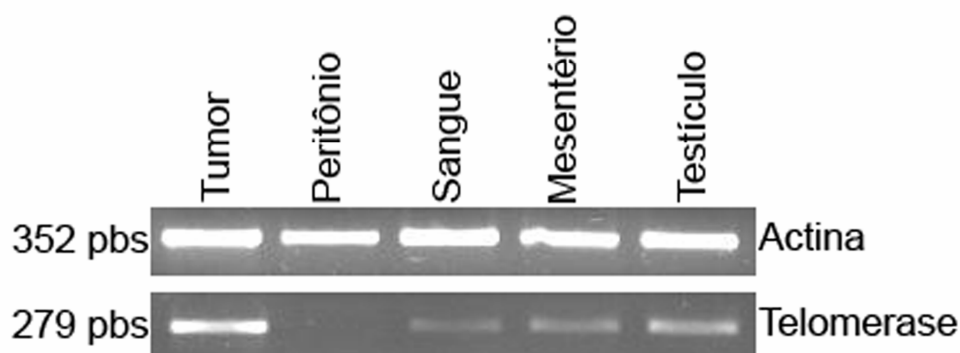


Figura 18 – Gel de agarose dos produtos de RT-PCR dos genes telomerase e actina do sarcoma 180 e dos outros tecidos de camundongos analisados.

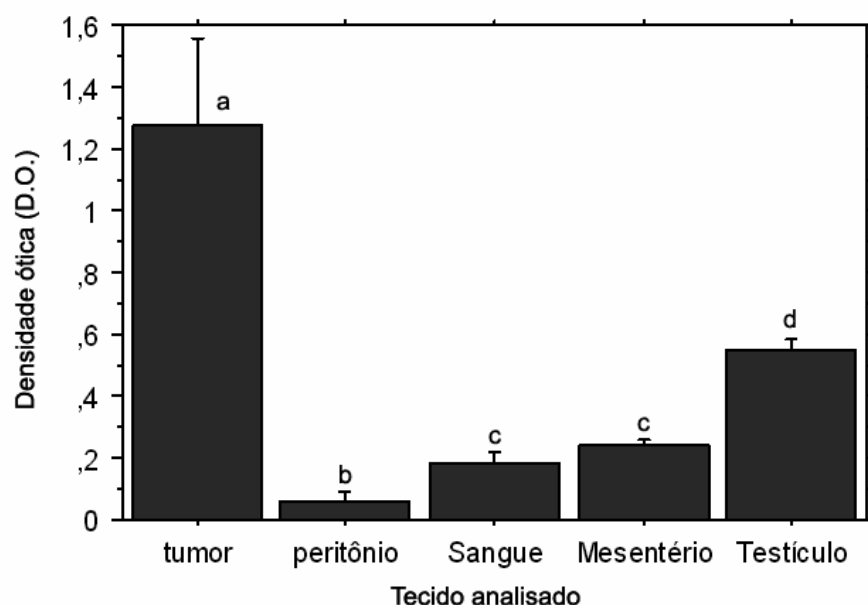


Figura 19 – Análise semi-quantitativa por RT-PCR da expressão do gene da telomerase. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Foi utilizado o teste t-student e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.4 Discussão

A linhagem de células tumorais 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) apresenta inúmeras linhagens celulares, de diferentes organismos, disponibilizando informações sobre as células 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 alterações genéticas. 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 triploides” 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 e em todas as formas de manutenção tumoral. Agrupando-se todos os dados foram encontradas metáfases com números cromossômicos variando entre 16 e 232 e número modal de 68 cromossomos, o que indica que a linhagem celular sarcoma 180 é composta por uma população heterogênea de células.

O núcleo celular de sarcoma 180 apresenta polimorfismo de tamanho, acompanhado por diferenças no tamanho da célula. Segundo Storchova e Pellman, (2004), uma consequência fisiológica da poliploidia é o aumento no tamanho da célula, pois o volume da célula aumenta linearmente com cada complemento cromossômico extra. Este fato é explicado pela maior dosagem

gênica encontrada nas células poliplóides, o que acarreta uma elevação na síntese de proteínas.

Segundo Duesberg et al. (2005; 2007) a variabilidade cariotípica observada nas células de um mesmo tumor é a razão pela qual o câncer é constituído de uma população heterogênea de células não-clonais ou parcialmente clonais. De acordo com o mesmo autor uma em cada mil células tumorais aneuplóides gera um novo fenótipo específico por geração celular (por isso parcialmente clonal), em níveis consideravelmente maiores que as mutações convencionais.

Apesar de um tumor ser originado a partir de uma única célula e se expandir de forma clonal, a progênie desta célula inicial adquire uma série de outras alterações genéticas, que são importantes para que este tumor adquira características favoráveis para seu desenvolvimento. A presença de variabilidade genotípica dentro da população tumoral pode ser interessante para a manutenção do tumor. Ao ocorrer algum tipo de pressão seletiva, como o tratamento com quimioterápicos, a população celular possuirá material genético diversificado, podendo algumas células apresentar características que as permitam sobreviver às adversidades encontradas.

Desta forma, assim como proposto por Tomlinson e Bodmer (1999), a progressão tumoral seguiria todas as leis evolutivas propostas por Darwin, ocorrendo assim uma “micro-seleção natural”. Entretanto, como proposto por Duesberg et al. (2005, 2007), os rearranjos cromossômicos tumorais produzem variabilidade genética de forma muito mais rápida do que ocorre com o processo de especiação, fazendo com que as células se adaptem ao ambiente em que se encontram, ou seja, se adaptem às situações nas quais o organismo hospedeiro se encontra.

É importante ressaltar que todas as células analisadas possuíam algum tipo de alteração genética bem como os cromossomos marcadores (metacêntricos e micro-cromossomos). Os marcadores parecem conferir características vantajosas à linhagem celular, uma vez que são sempre selecionados positivamente.

Quando foi realizada a expansão clonal de uma célula de sarcoma 180, apenas uma célula isolada de um poço da placa de ELISA foi capaz de se propagar e formar uma nova população. Desta forma verifica-se que nem todas as células da linhagem possuem o balanço gênico necessário para proliferar-se. Somente uma pequena sub-população celular é responsável pela renovação das células tumorais, possuindo grande potencial proliferativo. Estas células são freqüentemente denominadas células-tronco tumorais.

Segundo Reya et al. (2001), existem três aspectos principais que relacionam as células-tronco e as células tumorais: (1) – similaridade entre os mecanismos que regulam a auto-renovação; (2) – possibilidade de que células tumorais possam surgir de células-tronco normais; (3) – tumores podem conter “células-tronco tumorais” que são células raras com indefinido potencial proliferativo e promovem a proliferação e crescimento dos tumores. As células-tronco tumorais também são as responsáveis pela formação das metástases, uma vez que somente elas possuem capacidade mitótica para dar origem a outra colônia tumoral.

A célula de sarcoma 180 que foi isolada e apresentou grande capacidade proliferativa foi mantida em cultura. As análises citogenéticas indicaram que as células resultantes da expansão clonal apresentaram 52% da população com cariótipo heptaplóide (7n). Entretanto foi conservada uma sub-população celular (32%) com o cariótipo padrão observado na linhagem. As células quase heptaplóides provavelmente se originaram por meio de um processo denominado endoreduplicação, uma vez que foram observados diplocromossomos em diversas metáfases do sarcoma 180.

Deste modo, a endoreduplicação parece ser o mecanismo pelo qual as células iniciais do sarcoma 180 se tornaram poliplóides, assim como observado em uma linhagem celular derivada tumor gástrico primário descrita por Lima et al. (2004). No sarcoma 180 provavelmente a endoreduplicação ocorreu antes da formação dos cromossomos metacêntricos, uma vez que os mesmos não foram duplicados, pois não se observa cromossomos homólogos dos mesmos.

Segundo Larizza e Schirmmacher (1984) as células tumorais que possuem propriedades metastáticas freqüentemente possuem uma maior dosagem gênica do que seus progenitores. Este fato é observado pelo aumento do nível de ploidia, duplicação cromossômica e amplificação gênica. A aquisição de um elevado número cromossômico observado nas células tumorais pode ser resultado de endoreduplicação ou hibridação somática (fusão celular).

A população de células obtidas depois da expansão clonal foi inoculada em animais e posteriormente foi citogeneticamente re-analisada. Foi observado que a maioria das células da população (91,2%) apresentava-se quase tetraplóide, como observado normalmente. Neste caso, aquela menor sub-população celular que representava 32% da população provavelmente possuía as combinações cromossômicas necessárias para se manterem no animal.

O ambiente de cultura celular (*in vitro*) é diferente do ambiente encontrado no peritônio do animal (*in vivo*). Estas diferenças podem estar relacionadas às ofertas de oxigênio e nutrientes ou até mesmo à concentração de células competindo pelo espaço físico. Neste caso, em sarcoma 180, foi observado que as células quase tetraplóides possuem vantagens adaptativas ao ambiente *in vivo* e se sobressaíram na competição. Estas vantagens adaptativas provavelmente se devem ao fenótipo obtido pelas combinações cromossômicas convenientes ao ambiente. Desta forma somente células com os cromossomos adequados foram selecionadas, assim como proposto por Duesberg et al. (2005 e 2007) em sua teoria cromossômica do câncer.

Por meio da impregnação com nitrato de prata foi observado um aumento da atividade das NORs em sarcoma 180. 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, além dos cromossomos observados nas células normais, foi observada a ativação de NORs nos cromossomos 2, 4, 8, 10 e 11, que coincidem com as

NORs descritas por Suzuki et al. (1990), em algumas populações de camundongos.

As NORs de camundongos estão presentes em pelo menos seis cromossomos, sendo que os cromossomos portadores de NOR variam de uma população para a outra (DEV et al., 1977). Estas diferenças na localização das NORs provavelmente se devem ao isolamento geográfico das populações, que são submetidas a diferentes processos de evolução cariotípica.

A ausência de marcação das NORs nos cromossomos, quando corados com nitrato de Prata, não significa ausência de seqüências de DNAr e sim inatividade das mesmas. No entanto, em sarcoma 180 foi observado a ativação de todas as seqüências de DNAr descritas em camundongos de diversas populações. Foi observado também que os cromossomos portadores da NOR são selecionados positivamente, talvez por conferirem vantagens metabólicas para a célula.

Provavelmente, a ativação das NORs está relacionada à intensa atividade metabólica das células tumorais. Como estas células estão em constante processo replicativo e, conseqüentemente, intensa síntese protéica, elas necessitam de grandes quantidades de ribossomos. O aumento da quantidade de NORs favorece a síntese de RNAr, agilizando assim a formação dos ribossomos. A contagem das NORs é uma ferramenta freqüentemente utilizada em análises clínicas para diagnósticos e prognósticos de tumores, pois quanto maior o número de NORs maior será a agressividade de um tumor (OSHIMA; FORONES, 2001; KANEKO, et al., 1991; ISHIDA et al., 1993).

Com relação às células mantidas em cultura, foi observado que estas possuíam muitas metáfases com diversos danos cromossômicos, dentre eles quebras, associações cromossômicas e até mesmo pulverização cromossômica. Neste caso, estas alterações cromossômicas são observadas devido ao fato de o ambiente de cultura celular ser mais propício a elevar as taxas de mutação. Uma das prováveis causas seria o estresse oxidativo.

Segundo Zglinicki (2002) o estresse oxidativo é um importante modulador dos telômeros uma vez que altas concentrações de oxigênio aceleram a redução do comprimento telomérico. Os telômeros são responsáveis pela manutenção da integridade cromossômica e a perda ou degradação destas estruturas podem gerar diversas alterações genéticas.

Uma vez que o estresse oxidativo aumenta a erosão dos telômeros, as alterações observadas nas células mantidas em cultura podem ser resultantes desse fenômeno metabólico adverso ou resultantes do acúmulo de espécies reativas de oxigênio. A redução telomérica pode desestabilizar a estrutura cromossômica, elevando as taxas de fusões entre os mesmos, acarretando posteriores ciclos de fusão-ponte-quebras-tranlocações, assim como observado por Chang et al. (2001) nos camundongos deficientes em telomerase.

Apesar da concentração de oxigênio ser controlada pela estufa de CO₂, esta é diferente da concentração sob a qual as células se encontram *in vivo*. O estresse oxidativo, decorrente do aumento da concentração de oxigênio, aumenta os níveis de radicais livres, que além de elevar a erosão telomérica podem também causar danos diretos a outras partes do DNA. Desta forma, a manutenção de células em cultura é dependente da concentração de oxigênio e variações neste fator podem causar alterações nas características originais das células cultivadas.

Chakrabarti e Roychowdhury, (1980) analisaram o cariótipo de Sarcoma 180 e verificaram um número modal de 75 cromossomos. Comparando-se os dados deste autor com o presente estudo verificou-se perdas cromossômicas no decorrer dos anos. Segundo Casartelli (1993) a perda de cromossomos causa um desbalanço gênico, afetando a concentração de proteínas celulares. 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. 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, ajudando assim na definição do tratamento com maior eficiência para o tumor em questão (CASARTELLI, 1993).

O “cariótipo padrão” da linhagem celular é, possivelmente, resultante de uma tetraploidia inicial via endoreduplicação, 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. Chakrabarti e Roychowdhury, (1980) descreveram algumas características citogenéticas de Sarcoma 180, porém em seus estudos os autores não sugerem tratar-se de uma “quase tetraploidia”. Este fato é compreensível, uma vez que os mesmos só apresentaram um cariótipo baseado em coloração convencional com Giemsa, que não permite um pareamento cromossômico baseado na composição dos mesmos.

Existe uma variação na composição cromossômica das células, sendo que alguns cromossomos possuem ploidia mais conservada 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 cromossomo do complemento, apresenta uma ploidia conservada, pois em todas as metáfases analisadas foi encontrado sob a forma diplóide.

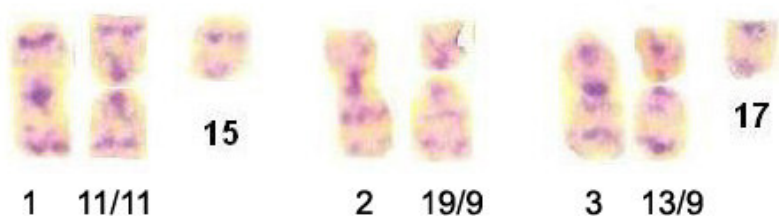
Outra alteração genética detectada em Sarcoma 180 foram os rearranjos cromossômicos estruturais. Como citado anteriormente, foram encontrados três cromossomos metacêntricos, o que não é comum, pois se trata de uma linhagem de células de camundongos e os mesmos possuem somente cromossomos acrocêntricos. Os cromossomos metacêntricos encontrados são derivados de translocações Robertsonianas entre dois cromossomos acrocêntricos, assim como descrito por Ghosh e Chaudhuri (1984).

Os três cromossomos metacêntricos encontrados em Sarcoma 180 possuem tamanhos diferentes, o que é um indicativo de que cada cromossomo possui uma origem distinta. No presente estudo também foram

encontrados em média quatro “micro-cromossomos” marcadores, que só foram observados em sarcoma 180 e não em células normais. Estes cromossomos podem ser resultantes das quebras cromossômicas envolvidas nas translocações Robertsonianas.

Analisando-se o padrão de bandas produzido pela técnica de banda G e pela enzima de restrição *Dde* I pode-se sugerir quais cromossomos deram origem aos metacêntricos (Figura 20). Provavelmente o maior par de cromossomos metacêntricos surgiu da fusão entre dois cromossomos de número 11 ou entre um cromossomo de número 11 e um de número 15. O segundo par de cromossomos metacêntricos pode ter surgido da translocação entre os cromossomos 19 e 9 e o terceiro par deste tipo cromossômico seria derivado da união entre os cromossomos 13 e 19 ou 13 e 17. O padrão de bandas cromossômicas produzidas pelas técnicas utilizadas indica que pelo menos os dois cromossomos metacêntricos menores são resultantes de translocações cromossômicas não-recíprocas. Algumas técnicas de FISH ou pintura cromossômica poderão esclarecer melhor a origem dos metacêntricos.

Dde I



Banda G

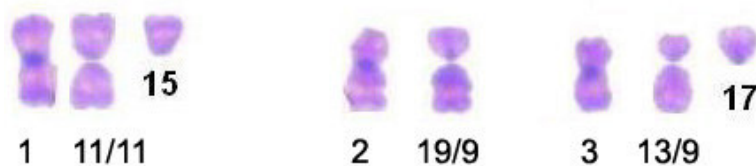


Figura 20 – Possíveis translocações que deram origem aos cromossomos metacêntricos marcadores de sarcoma 180.

Ghosh e Chaudhuri (1984) analisaram algumas translocações encontradas em Sarcoma 180, identificando três cromossomos resultantes de translocações, que foram denominados marcadores, sendo que somente um

deles era um cromossomo metacêntrico, que seria derivado da translocação entre os cromossomos 6 e 9. Por meio da análise dos padrões de bandas produzidos no presente trabalho, foi observado que nenhum dos três cromossomos metacêntricos encontrados é derivado de uma translocação envolvendo estes dois cromossomos. Desta forma, a evolução cariotípica da linhagem celular selecionou negativamente o cromossomo metacêntrico inicial, talvez pelo fato de que o mesmo não conferia vantagens à linhagem. Os outros cromossomos metacêntricos originados durante o processo evolutivo de sarcoma 180 também podem ter suprido as características conferidas pelo primeiro cromossomo metacêntrico descrito.

Muitos sarcomas apresentam aberrações cariotípicas específicas e reprodutivas. Conhecimentos acerca destas aberrações são úteis não somente para determinar a patogênese do tumor, mas, também, para sua diagnose, classificação e prognóstico. Alguns sarcomas possuem alterações cariotípicas específicas simples e, assim como ocorre em leucemias, muitos destes tumores possuem translocações cromossômicas recíprocas. Muitas destas translocações foram estudadas e tiveram seus produtos de fusão gênica identificados (HAHN e FLETCHER, 2005).

As translocações ocorridas em Sarcoma 180 são alterações específicas e reprodutíveis e, possivelmente, são marcadores dessa linhagem celular. Esses eventos podem ter causado a fusão de alguns genes, produzindo proteínas quiméricas que ativam a proliferação celular. As translocações em questão, também, podem ter inativado algum gene supressor tumoral ou de reparo do DNA. Estas alterações podem ser importantes na carcinogênese. Técnicas de genética e citogenética molecular podem esclarecer se houve a ativação ou inativação de genes envolvidos no desenvolvimento tumoral e também poderão confirmar os cromossomos envolvidos na formação dos metacêntricos marcadores.

De acordo com Rabitts et al. (2001), as maiores conseqüências das translocações cromossômicas em tumores hematopoiéticos e sarcomas são as fusões gênicas e super-expressão de oncogenes. As fusões gênicas resultam de uma quebra, dentro dos íntrons, em cada cromossomo envolvido. Quando a translocação ocorre, existem ganhos, na região dos

íntrons dos dois genes, resultando em um gene produto de fusão. Quando esse gene é 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, com duas funções. Em leucemias agudas e sarcomas, a maioria dos genes translocados codifica 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 grandes alterações genéticas observadas neste estágio pode ser o mecanismo pelo qual algumas células adquiram a grande quantidade 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 freqüentes em tumores 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 inicial de crise celular e posterior malignização e estabilização das células pelo aumento ou ativação da expressão da telomerase.

Em humanos a telomerase é expressa somente em algumas células, como células embriogênicas e linfócitos ativos, enquanto nos tumores, esta

enzima possui atividade detectável em 90% dos casos, sendo que os outros 10% mantêm seus telômeros eficientemente por um mecanismo alternativo de alongamento telomérico (ALT) (KIM et al., 1994; BLASCO et al., 1997). De acordo com Prowse e Greider, (1995), em camundongos, a telomerase é expressa em diversos tipos celulares com diferentes níveis de expressão de acordo com a célula analisada. Em camundongos, observa-se maior expressão da telomerase em células que possuem intensa atividade mitótica.

As análises de expressão da telomerase por RT-PCR indicaram que esta enzima está super-expressa em sarcoma 180. Foi observada expressão diferencial nos diferentes tecidos de camundongo, corroborando com os resultados de Prowse e Greider, (1995). Dos tecidos normais de camundongo, foi observada uma maior expressão da telomerase nos testículos, provavelmente devido à intensa atividade das espermatogônias.

Comparando a expressão de sarcoma 180 com células originadas do mesoderma, ou seja, que possuem a mesma origem embrionária do tumor (células do peritônio, sangue e mesentério), observou-se que o tumor apresentou expressão pelo menos quatro vezes maior. Mesmo quando comparado com o testículo, que apresenta os maiores níveis de expressão da enzima no animal, a expressão de telomerase em sarcoma 180 se apresentou pelo menos duas vezes maior.

A ativação ou aumento da expressão da telomerase desempenha um importante papel no crescimento de tumores e na imortalização de células (CHANG et al., 2001). Provavelmente a intensa expressão da enzima é um importante fator que garante que a linhagem celular sarcoma 180 se prolifere indefinidamente, ultrapassando a barreira do encurtamento telomérico, evitando assim uma grande instabilidade cromossômica, que inviabilizaria a manutenção celular.

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 heterocromatinas 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 centrômeros.

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), indicando a ausência dos cromossomos marcadores observados por Ghosh e Chaudhuri (1984). É provável que esses cromossomos também tenham sido negativamente selecionados durante a evolução cariotípica desta linhagem de células tumorais, talvez pela instabilidade de cromossomos portadores de dois centrômeros. Tais cromossomos são instáveis, pois quando o ciclo celular chega ao estágio de anáfase eles são ligados em duas fibras opostas do fuso acromático, podendo cada fibra puxar um centrômero para pólos opostos da célula, causando o rompimento do cromossomo.

O fluorocromo Cromomicina A₃ se liga, preferencialmente, a 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.

A associação dos dados obtidos nas análises citogenéticas e moleculares de sarcoma 180 com as teorias existentes permitiram a proposta de uma teoria para a evolução cromossômica da linhagem celular sarcoma 180, que pode ser extrapolada para outros tumores, até mesmo em humanos. Provavelmente uma célula normal de camundongo sofreu uma falha no mecanismo de replicação e se poliploidizou via endoreduplicação. O aumento no número cromossômico permitiu com que estas células se proliferassem mais rapidamente. Depois de diversos ciclos mitóticos as células tiveram seus telômeros reduzidos como prediz o limite de Hayflick. Como consequência da redução telomérica os cromossomos se desestabilizaram e sofreram diversas alterações citogenéticas, resultantes de fusão, ponte e quebras cromossômicas. Estas aberrações cromossômicas podem ter causado mudanças fenotípicas ainda maiores, que provavelmente conferiram vantagens para as células que as possuíam, permitindo com que as mesmas escapassem da apoptose. Desta maneira, algumas células adquiriram as combinações cromossômicas ideais que as tornavam malignas. No entanto, os cromossomos destas células provavelmente eram instáveis, devido à erosão telomérica. Este obstáculo foi superado pela reativação ou aumento da expressão da telomerase, que se encontra extremamente expressa em sarcoma 180.

Após a estabilização conferida pela telomerase, as células puderam se dividir indefinidamente estabelecendo assim a linhagem celular. Durante a evolução da linhagem, muitas alterações podem ter ocorrido ou até mesmo continuarem ocorrendo atualmente, mas somente foram ou serão selecionadas positivamente as que conferem alguma vantagem adaptativa momentânea. Apesar da heterogeneidade celular encontrada em sarcoma 180, somente células que possuem a combinação cromossômica ideal são responsáveis pela perpetuação da linhagem. Estas células podem ser denominadas células iniciantes de tumor ou células-tronco tumorais, que podem até mesmo serem as responsáveis pela formação de metástases.

3.5 Conclusão

A linhagem celular sarcoma 180 possui uma população heterogênea de células, com número modal de 68 cromossomos. Trata-se de uma linhagem tetraplóide, originada por endoreduplicação. A localização da heterocromatina constitutiva é conservada nas regiões pericentroméricas. As NORs encontram-se ativadas em pelo menos um cromossomo do par, em todos os cromossomos que possuem a sequência de DNAr. Dentro da população encontram-se algumas células que possuem as combinações cromossômicas ideais para a perpetuação do tumor, que foram denominadas células-tronco tumorais. Estas células possuem elevada expressão da telomerase, que permite com que as células se proliferem indefinidamente.

3.6 Referências Bibliográficas

Baldev KV, Willcourt M: **Decondensation of pericentromeric heterochromatin alters the sequence of centromere separation in mouse cells.** *Chromosoma* 1998, 107:417-423.

Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, Depinho RA, Greider CW: **Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA.** *Cell* 1997, 91:25-34.

Campisi J, Kim S, Lim C, Rubio M: **Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection.** *Experimental Gerontology* 2001, 36: 1619-1637.

Casartelli C: **Câncer and cytogenetics.** *Revista Brasileira de Genética* 1993, 4: 1109-1131.

Chakrabarti A, Roychowdhury J: **Chromosome analysis with special reference to centromeric heterochromatin and ploidy variation in mouse Sarcoma – 180 cells.** *Cytologia* 1980, 45: 177-184.

Chang S, Khoo C, Depinho RA: **Modeling chromosomal instability and epithelial carcinogenesis in the telomerase-deficient mouse.** *Cancer biology* 2001 11: 227-238.

Dev VG, Tantravahi RDA, Miller OJ: **Nucleolus organizers in Mus musculus subspecies and in the RAG mouse cell line.** *Genetics* 1977, 86: 389-398.

Duesberg P, Li R, Fabarius A, Hehlmann R: **The chromosomal basis of cancer.** *Cellular oncology* 2005, 27: 293-318.

Duesberg P, Li R, Sachs R, Fabarius A, Upender MB, Hehlmann R: **Cancer drug resistance: The central role of the karyotype.** *Drug Resistance Updates* 2007, 10: 51–58.

Ghosh S, Chaudhuri A: **Analysis of three whole-arm translocations in a mouse sarcoma cell line.** *Cytogenetics and cell genetics* 1984, 38: 161-164.

Gilley D, Tanaka H, Herbert BS: **Telomere dysfunction in aging and cancer.** *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2005, 37: 1000-1013.

Guerra M: *Como observar cromossomos.* Ribeirão Preto: FUNPEC; 2002.

Hahn HP, Fletcher CDM: **The role of cytogenetics and molecular genetics in soft tissue tumor diagnosis – a realistic appraisal.** *Current diagnostic pathology* 2005, 11: 361-370.

Howell WM, Black DA: **Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.** *Experientia* 1980, 36: 1014-1015.

Karlseder J, Broccolo D, Dai Y, Hardy S, Lange T: **p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2.** *Science* 1999, 283: 1321-1324.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW: **Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.** *Science* 1994, 266: 2011 – 2015.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA: **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas* 1964, 52:201-220.

Maser RS, Depinho RA: **Connecting chromosomes, crisis, and câncer.** *Science* 2002, 297: 565-569.

Mezzanotte R, Bianchi U, Vanni R, Ferrucci L: **Chromatin organization and restriction endonucleases activity on human metaphase chromosomes.** *Cytogenetic and cell genetics* 1983, 3: 562-566.

Miller OJ: **Cytogenetics of the mouse.** *Annual review of genetics* 1975, 9: 285-303.

Pihan G, Doxsey SJ: **Mutations and aneuploidy: Co-conspirators in cancer?** *Cancer cell* 2003, 4: 89-94.

Prowse KR, Greider CW: **Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length.** *Cell biology* 1995, 92: 4818-4822.

Rabbitts TH, Appert A, Chung G, Collins EC, Dryna L, Foster A, Lobato MN, McCormack MP, Pannell R, Spandidos A, Stocks MR, Tanaka T, Tse E: **Mouse models of human chromosomal translocation and approaches to cancer therapy.** *Blood cells, molecules and diseases* 2001, 27: 249-259.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: **Stem cells, cancer, and cancer stem cells.** *Nature* 2001, 414: 105-111.

Saunders WS, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi AH, Petersen I, Gollin SM: **Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells.** *PNAS* 2000, 97: 303-308.

Schmid M: **Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC- and AT- rich chromosome regions in anura.** *Chromosoma* 1980, 77: 83-103.

Stock RP, BialyH: **The sigmoidal curve of cancer.** *Nature biotechnology* 2003, 21: 13-14.

Stockert JC, Pinna-Senn E, Bella JL, Lisanti JA: **DNA-binding fluorochromes: correlation between C-banding of mouse metaphase chromosomes and hydrogen bonding to adenine–thymine base pairs.**

Acta histochemica 2005, 106: 413-420.

Sumner AT: **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Expl. Cell Res* 1972, 74:304-306.

Strober, W. (1991). **Trypan blue exclusion test for cell viability.** In *Current Protocols in Immunology*. (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marguiles, E. M. Shevach, and W. Strober, Eds.), pp. A.3.3–4. Wiley, New York.

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* 1990, 7: 271-282.

Verma RS, Babu A: *Human chromosomes*. New York: McGraw-Hill; 1995.

Zuckerberg C: **Ultrastructure of Sarcoma 180.** *Cancer Research* 1973, 33: 2278-2282.

Zglinicki TV: **Oxidative stress shortens telomeres.** *Trends Biochem Sci* 2002, 27: 339-344.