



Silvia Regina Pergamo de Miranda

**Efeitos do choque hipertérmico em células HeLa:
dados morfológicos, morfométricos e imagens de
interferência**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas, área de Biologia Celular.

Campinas - 1991



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia
Celular da Universidade Estadual de Campinas

Dedico,

À minha orientadora,
Dra. Maria Luiza Silveira Mello,
Por tudo! (descrever esse tudo,
por mais que eu me lembrasse seria pouco).

A Deus,
Por tudo! (esse tudo, quem dera
eu conhecer!...)

Ofereço,

À minha mãe, pelo amor que nos une,
e tudo supera.

Agradeço,

Com especial carinho, à Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela orientação precisa e segura; pelos ensinamentos; pelo exemplo de dedicação à Ciência; pela confiança, compreensão, amizade e pela inestimável solidariedade em todos os momentos difíceis.

Ao Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelas relevantes questões levantadas quando do exame prévio e no curso de todo o trabalho; pelo convívio agradável e amizade e, principalmente pela constante preocupação em nos fazer despertar para o verdadeiro sentido de existência e condição humana.

Ao Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela solicitude na acessoria estatística; pelas sugestões apresentadas na análise prévia deste trabalho e pelas discussões dos mais variados assuntos.

À Dra. Regina Pisani, pelas valiosas sugestões apresentadas durante a arguição prévia e pelo carinho dispensado por ocasião deste exame.

Ao Departamento de Microbiologia da UNICAMP, nas pessoas da Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro e Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo, pelo fornecimento das células, e à Srta. Dirce Lima Gabriel, pelo cultivo e semeadura destas células.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP: Dr. Ângelo Luiz Cortelazzo, Dr. Edson Rosa Pimentel, Dra. Laurecir Gomes, Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, Dra. Mary Anne Heidi Dolder e Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, pelo que me ensinaram e principalmente pelo proveitoso convívio cotidiano.

À Dra. Marileila Varella Garcia, pela força nos primeiros passos, e pela imensa admiração e amizade que ficaram.

Aos Professores do IBILCE de São José do Rio Preto: Dra. Adelina Buzzini, Dr. Arif Cais, Dra. Maria Tercília Vilela Azeredo-Oliveira, Dra. Nívea Dulce Conforti Froes, Dr. Valdener Garutti, incentivadores e queridos amigos.

À companheira de sempre, Profa. Marly Magalhães Dantas, porque afinal ser ombro amigo, mãe, professora, crítica, conselheira, terapeuta, confidente e incentivadora da Silvinha não é mole não!... Valeu!

Aos Professores: Hernandes Faustino de Carvalho, José Antonio Novaes Silva, Marco Antonio Ferreira Randi, Maurício José Lopes Vaz Amaral e Sebastião Roberto Taboga, pela convivência, sugestões, auxílios e ótima amizade.

Aos colegas: Ana Lúcia, Ana Paula, Bel, Cristiana, Glaucia, Estela,

Fernandinho, Flávia, Kátia, Lectícia, Marcelo, Marluce, Nazário, Rejane, Selma, Verinha, beijão!

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP, pelo auxílio e amabilidade, em especial a Cidinha e a Lílian, pelo pronto atendimento a todas as “cantadas” e pela boa amizade.

À Sra. Anna Gagliardi, Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração na correção das referências bibliográficas.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à UNICAMP (Monitoria II), pela concessão das bolsas de estudo; e a FAPESP e CNPq, pelo financiamento de parte dos equipamentos utilizados neste trabalho.

À Dna. Walkiria, a MELHOR MÃE DO MUNDO!

Ao Alceu, Ana e Alina Landi e Allim Bassitt Junior, pelo patrocínio do Congresso, e principalmente pelo carinho de sempre.

À Kátia Magali Santos Gnatos, pelas caronas e pela “super amizade”.

Ao Luís, pelo amor e força, apesar dos pesares...

A todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante o período de realização deste trabalho, e que contribuíram para o meu engrandecimento como pessoa.

Conteúdo

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1	Material	8
2.2	Métodos	8
2.2.1	Cultura de Células	8
2.2.2	Choque Térmico	10
2.2.3	Fixação dos preparados	11
2.2.4	Métodos de coloração	11
2.2.5	Observações Morfológicas	12
2.2.6	Cariometria e Nucleolometria	12
2.2.7	Microscopia de Interferência	13
3	RESULTADOS	14
3.1	Aspectos morfológicos celulares	14
3.2	Áreas Nucleares e Nucleolares	21
3.3	Imagens de Interferência	50
4	DISCUSSÃO	66
4.1	Fenótipos Celulares e Metacromasia	66
4.2	Índice mitótico, número de núcleos e nucléolos e micronucleação	67
4.3	Tamanhos nucleares e nucleolares	68
4.4	Imagens de Interferência	70
5	CONCLUSÕES	72
6	RESUMO	74
7	SUMMARY	76
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos sistemas biológicos responde às alterações ambientais estressantes através de uma série de mudanças metabólicas, supostamente protetoras. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na intenção de se investigar as características dessa capacidade de resposta, e de se obter um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos em sua elaboração.

Sob o enfoque acadêmico, dois fatores básicos podem ser destacados como determinantes do interesse pelo tema. São eles:

- A notável conservação da resposta a estresses ao longo da história filogenética das espécies, bem como sua universalidade, sugerindo uma importância fundamental para tais características; e
- A intrigante comunicação entre o aparato genético e o ambiente, envolvendo todo um complexo mecanismo, desde a detecção da mudança até a elaboração da resposta, trilhando inúmeros processos de regulação da atividade gênica (BONATO & JULIANI, 1987).

Dentre os diversos exemplos de agentes estressantes, o choque hipertérmico pode ser definido como uma elevação de temperatura a qual as células de diferentes organismos respondem, de maneira bastante similar, alterando seu padrão de transcrição gênica e sintetizando, transitariamente, uma série de proteínas. Embora se estudem, desde muito tempo, os efeitos da temperatura sobre o homem e os demais seres vivos, as pesquisas, controladas e sistemáticas, sobre a resposta ao choque térmico remontam apenas à década de 60. O trabalho pioneiro na área foi desenvolvido por Ferruccio Ritossa, em 1962, tendo sido nele demonstrado que o padrão de pufes característico de determinada fase do desenvolvimento de *Drosophila busckii* podia sofrer drástica alteração após o choque térmico ou com tratamento por 2-4 dinitrofenol ou ainda salicilato de sódio. Desde então, outros pesquisadores vêm demonstrando tal ocorrência em outras espécies (BERENDES, 1968; ASHBURNER, 1970; LEENDERS & BERENDES, 1972).

As proteínas sintetizadas sob ação do choque térmico são chamadas hsp (do inglês: heat shock proteins) e muitas vezes seu surgimento se associa à repressão da síntese proteica "normal" (LOOMIS & WHEELER, 1980; McALISTER & FINKELSTEIN, 1980; HAUSER & LEVY-WILSON, 1981; KEY et alii, 1981; BASZCZYNSKI et alii, 1982; ARRIGO & WELCH, 1987; BONATO & JULIANI,

1987; SOMERS et alii, 1989; RUDER et alii, 1989). A alteração no padrão de transcrição e de tradução relacionada à hipertermia foi inicialmente detectada em *Drosophila melanogaster*, por Tissieres e colaboradores (1974), os quais notaram a presença de novos pufes. A partir de então outras constatações de síntese de hsp foram também feitas em leveduras (McALISTER et alii, 1979), fungos (FRANCIS & LIN, 1980; CURLE & KAPOOR, 1988), vegetais (BASZCZYNSKI et alii, 1982; YACOOB & FILION, 1986); aves (KELLEY & SCHLESINGER, 1978; ATKINSON, 1981; ATKINSON et alii, 1983; NAGATA et alii, 1986) e mamíferos (THOMAS et alii, 1981; WELCH & SUHAN, 1985).

A síntese de hsp é também induzida por outros estímulos nocivos que não o choque térmico, tais como arsenito de sódio (NaAsO_2) (JOHNSTON et alii, 1980; KOTHARY & CANDIDO, 1982), privação temporária de oxigênio (SACHS & FREELING, 1978; THOMAS et alii, 1981), etanol (HAMMOND et alii, 1982; MINTON et alii, 1982; LINDQUIST, 1986; MIZZEN & WELCH, 1988), análogos de aminoácidos (KELLEY & SCHLESINGER, 1978; HAMMOND et alii, 1982; MINTON et alii, 1982; MIZZEN & WELCH, 1988), íons de metais pesados (HAMMOND et alii, 1982; MINTON et alii, 1982; ATKINSON, 1983; MIZZEN & WELCH, 1988), inibidores de fosforilação oxidativa e do transporte de elétrons (THOMAS et alii, 1981), hormônios esteróides, ionóforos, agentes quelantes e alguns DNAs e RNAs de vírus (LINDQUIST, 1986). Estes agentes estressantes podem também induzir a produção de outras proteínas, semelhantes às hsp (ATKINSON, 1983)

Existem indicações de que os genes para as várias hsp são expressos independentemente. Sua regulação envolve mecanismos atuando ao nível transcricional e pós-transcricional, pressupondo ser a resposta ao estresse um evento complexo, onde genes particulares expressados pela célula podem depender do tipo de estresse ocorrido, do estado de diferenciação celular ou do tipo de célula considerado. (LINDQUIST, 1980; ATKINSON, 1981; ANANTHAN et alii, 1986; ATKINSON et alii, 1986; AUJAME, 1986, 1988; BASZCZYNSKI, 1986; DE BENEDETTI, 1986 a,b; DUBAND et alii, 1986; CELIS et alii, 1988). Além disso, pode-se verificar a expressão da maioria das hsp durante alguma fase do desenvolvimento do organismo, em temperaturas normais. Isto pode ser indicativo de seu envolvimento no processo de degradação de proteínas denaturadas, com função similar àquela possivelmente exercida sob choque térmico. Portanto, um dos caminhos para a compreensão de como estas proteínas atuam na defesa de células submetidas à hipertermia, ou qualquer outro tipo de agressão, seria elucidar suas funções em células não termossensi-

bilizadas (BONATO & JULIANI, 1987; LITTLEWOOD et alii, 1987). Outra alternativa no sentido de se determinar o caráter funcional das **hsp** vem sendo abordada através de clonagem e seqüenciamento dos genes que as codificam e de isolamento e caracterização de mutantes defeituosos com respeito à estrutura dos seus genes (SCHLESINGER, 1986).

Na tentativa de estabelecer o papel das **hsp** na defesa celular algumas funções lhes foram atribuídas. Uma delas seria reconhecer certas regiões das moléculas de proteínas desnaturadas pelo calor e, ligando-se a elas, impedir a formação de precipitados insolúveis e potencialmente danosos à célula (BONATO & JULIANI, 1987); ou ainda, manter as atividades metabólicas básicas necessárias à sobrevivência (THOMAS et alii, 1981).

MINTON e colaboradores (1982) propõem um curioso caráter de proteção para as **hsp**, resultante simplesmente de sua própria síntese, antes de uma eventual função ativa. A intensa síntese das **hsp** sob condições de estresse, culmina em um aumento no volume total de proteínas da célula, e conseqüentemente em um aumento na tendência destas proteínas à autoassociação. O estabelecimento de interações intramoleculares inespecíficas e casuais requer, portanto, uma energia de ativação mais elevada para conversão de proteínas "normais" em proteínas desnaturadas, limitando, por um fator físico, os danos causados às células pela presença de proteínas danificadas pelo estresse.

Por outro lado, uma recente proposta para ação de uma das principais famílias de **hsp**, as 70, seria a de um papel na estabilização de substratos protéicos em processo de maturação, principalmente no que se refere à conformação e autoassociação destes (FLYNN et alii, 1989; BECKMANN et alii, 1990).

Além das **hsp** "convencionais" acima referidas, existem relatos da síntese de **hsp** "especiais" que diferem das primeiras pelas seguintes peculiaridades: são rapidamente induzidas sob temperaturas elevadas, e não sob outras condições de estresse; sua síntese é insensível à ação da actinomicina, a qual bloqueia o aparecimento das "convencionais"; e associam-se estritamente à fração matriz nuclear - filamentos intermediários, não sendo portanto encontradas em todas as frações subcelulares (REITER & PENMAN, 1983; ORNELLES & PENMAN, 1990).

Quando expostas a temperaturas suficientemente altas as células morrem, em virtude da perda irreversível da estrutura protéica vital e de suas funções associadas; inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (MONDOVI et alii, 1969; McCORMICK & PENMAN, 1969; PRIMMETT et alii, 1988; VIDAIR & DEWEY, 1988); aumento na permeabilidade da membrana (DEWEY et alii, 1977; STROM et

alii, 1973); mudanças na respiração e glicólise (DICKSON & SHAM, 1972) e liberação de hidrolases dos lisossomos (OVERGAARD, 1976). No entanto, se as células são submetidas a temperaturas elevadas, mas não letais, ou a breves exposições a temperaturas letais, seguindo-se um período de recuperação, elas passam a exibir uma taxa de sobrevivência dramaticamente aumentada para subseqüentes exposições. Este fenômeno transitório (diferente da resistência ao calor herdada geneticamente) é conhecido como "aquisição de termotolerância", sendo variável de acordo com o tipo de célula e fase do ciclo celular, podendo ser dependente da produção qualitativa e quantitativa de hsp, e também ser induzido por outros agentes estressantes (MINTON et alii, 1982; FOX et alii, 1985; MIZZEN & WELCH, 1988; WELCH & MIZZEN, 1988).

Do ponto de vista de aplicação de conhecimentos na área de estresse por choque de temperatura destacam-se esforços crescentes, principalmente na medicina e na agricultura. No primeiro caso, a elevação de temperatura, que, isoladamente e de maneira controlada, pode não produzir quebras detectáveis no DNA, nem tão pouco alterar os níveis de quebras por uma irradiação subseqüente, pode, no entanto, reduzir a taxa e a extensão do reparo. Esta verificação, somada ao fato de que células transformadas são mais susceptíveis à elevação de temperatura que as não transformadas, possibilita o uso da hipertermia como adjunto clínico à radioterapia e à quimioterapia (LUNEC et alii, 1981; WARTERS & STONE, 1983; ROTI et alii, 1986; BONATO & JULIANI, 1987; BARBE et alii, 1988; BAKER et alii, 1988; FAJARDO et alii, 1988; KAMPINGA et alii, 1988; LING & ROBINSON, 1988; WALTON et alii, 1989). Já na agricultura o fenômeno de termotolerância pode ser utilizado para o desenvolvimento de plantas que resistam a temperaturas cada vez mais elevadas, aumentando assim a produtividade agrícola (LINDQUIST, 1980; BONATO & JULIANI, 1987).

Considerando-se as observações ao nível citológico que acompanham a resposta ao choque térmico, foi relatado para fibroblastos de embrião de galinha o aparecimento, nessas circunstâncias, de pequenas partículas citoplasmáticas muito densas, contendo proteínas de estresse de baixo peso molecular (COLLIER et alii, 1988). Já em fibroblastos de embriões de rato o tratamento hipertérmico conduziu a alterações morfológicas e reposicionamento de mitocôndrias, fragmentação e/ou desaparecimento do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, colapso e agregação de filamentos intermediários ao redor do núcleo, detecção de estruturas fibrosas circulares no interior do núcleo, bem como mudanças no estado de condensação do nucléolo (WELCH & SUHAN, 1985).

Embora não se possa estabelecer uma correlação direta entre a injúria mitocondrial e a morte celular (já que a diminuição na produção de energia devida ao choque térmico não afetaria fundamentalmente a viabilidade celular) estudos realizados com células de ovário de hamster chinês demonstraram a ocorrência de inchaço das mitocôndrias, difusão e dissociação de suas membranas internas, alteração de pH e potencial de membrana, e perda da integridade dos complexos enzimáticos de membrana (COLE & ARMOUR, 1988).

Em células HeLa, como conseqüência do choque térmico, têm sido verificadas a perda parcial do componente granular do nucléolo, a inibição parcial da síntese e metabolização do precursor ribossomal 45S, o aumento no número de grânulos de pericromatina e de estruturas filamentosas no núcleo, a desestruturação dos polissomos e o aumento no número de lisossomos. Um subsequente período de manutenção das culturas em temperatura normal (37 °C) restaura as características observadas em células controle, com exceção do número aumentado de lisossomos (HEINE et alii, 1971).

Em condições de choque térmico tem sido relatada descompactação cromatínica, sugestiva de ativação gênica, mesmo a nível de heterocromatina, em diferentes sistemas celulares (DIAS et alii, 1969; SIMÕES et alii, 1975; SIMÕES & CESTARI, 1982; DANTAS et alii, 1989; DANTAS & MELLO, 1990). Apesar disso, não se encontra relato de mudanças na estrutura básica da cromatina sob essas circunstâncias (WHEELER & WARTERS, 1982; WARTERS & STONE, 1984; McCONNELL et alii, 1987).

Em células em cultura de *Drosophila*, bem como em células de mamíferos, durante a resposta ao choque térmico são produzidas proteínas que em larga escala se confinam ao núcleo (LEVINGER & VARSHVSKY, 1981; WHEELER & WARTERS, 1982; WARTERS & STONE, 1984; LITTLEWOOD et alii, 1987). Essas proteínas, que aparecem no interior dos núcleos como efeito do choque térmico e que se caracterizam por forte resistência a soluções salinas altamente concentradas (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981; LITTLEWOOD et alii, 1987), não se associam diretamente aos nucleossomos (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981). Parecem representar parte de uma estrutura intranuclear não exclusivamente periférica (lâmina densa interna), participante também de uma matriz nuclear ou carioesqueleto que circundaria o nucléolo e que possivelmente atingiria o seu interior (LITTLEWOOD et alii, 1987). Os agregados protéicos desse carioesqueleto teriam uma tendência a se estabilizarem ou se tornarem rígidos sob o estresse térmico (McCONNELL et alii, 1987). Foi atribuída a eles a função de preservar a organização

espacial da cromatina transcricionalmente ativa (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981).

Outra alteração ao nível nuclear associada ao choque térmico tem sido o aparecimento de grânulos de pericromatina, considerados uma forma de estocagem e/ou de transporte de alguns tipos de mRNA complexados a proteínas fosforiladas (HEINE et alii, 1971; PUVION et alii, 1977).

Pressupondo-se que o choque térmico possa acarretar mudanças na distribuição e no estado de agregação de macromoléculas, principalmente protéicas, no interior dos núcleos e ao seu redor, é de se supor também que, acontecido esse fato, este se reflita no padrão de distribuição de massa seca em células sob tais circunstâncias. Sendo isso verdade, preparados de células não coradas, observadas à microscopia de interferência revelariam diferentes padrões de imagens de interferência, após um choque de temperatura. Isto porque o sistema interferométrico transforma as variações de intensidade e de fase em variações de cores, gerando imagens características e permitindo a determinação da distribuição de massa seca das células. O princípio básico para o fornecimento de tais informações é a existência de uma relação direta entre a concentração de uma solução e seu índice de refração (BURRELLS, 1961).

Alterações em tamanhos e morfologias nucleares e nucleolares poderiam também se achar envolvidas em tais casos (WELCH & SUHAN, 1985).

No presente trabalho procurou-se, portanto, investigar tais possibilidades, usando-se como modelo de estudo células HeLa submetidas a diferentes condições de hipertermia e também em situações de retorno à temperatura controle, após terem sido submetidas ao choque.

Foram assim estudados comparativamente, nas condições descritas:

1. as morfologias celulares, nucleares e nucleolares observáveis ao microscópio de luz;
2. os tamanhos nucleares e nucleolares determinados por métodos morfométricos;
3. os valores de índice mitótico e de micronucleação como indicadores, respectivamente, da ação cicloativa e clastogênica do agente estressante;
4. as imagens de interferência para as células, indicativas do seu padrão de distribuição de massa seca;

5. os efeitos de tratamento com uma solução salina altamente concentrada sobre o padrão de distribuição de massa seca do material.

A escolha de células HeLa se baseou no fato de serem elas um dos mais usados e conhecidos exemplos de linhagem celular humana transformada, sendo, portanto, de interesse dados aqui levantados, que possam ser comparados a resultados futuramente obtidos em outras células, transformadas ou não, humanas ou de outros organismos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Foram utilizadas células da linhagem HeLa, rotineiramente em cultura no Departamento de Microbiologia do Instituto de Biologia da UNICAMP e provenientes da Seção de Cultura de Células do Instituto Adolpho Lutz de São Paulo.

2.2 Métodos

2.2.1 Cultura de Células

O cultivo das células foi feito em meio de cultura RPMI/1640 (Flow Laboratories, Inglaterra), suplementado com soro fetal bovino (Microbiological, RJ) a 10%, sem antibióticos.

Os repiques eram realizados, normalmente, a cada 4 dias, e por ocasião destes procedeu-se à sementeira, da seguinte forma:

- Remoção e descarte do meio de cultura contido nos frascos onde as células cresciam;
- Adição de solução salina (Fazekas) para remoção de células mortas, seguida de descarte do fluido;
- Tratamento com solução enzimática - tripsina/EDTA (ATV) - Instituto Adolpho Lutz, SP. (1 ml / 5 cm³ de superfície de cultura);
- Ressuspensão das células em 5 ml de meio de cultura;
- Observação da suspensão em câmara de Neubauer, para cálculo da quantidade aproximada de células na suspensão;
- Distribuição da suspensão celular em tubos de Leighton contendo, em suas câmaras, lamínula com dimensões de 11x22 mm. A suspensão distribuída (1 ml para cada tubo) foi balanceada de tal forma que cada mililitro de suspensão continha por volta de 1.10^5 células;
- Incubação em estufa de cultura New Brunswick Scientific model CO-20, a 37 °C , atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, por 16 horas.

A execução das etapas mencionadas se deu sob fluxo laminar horizontal Veco modelo ULFS-12 série FC 364 utilizando-se material estéril.

O método de cultivo descrito é o rotineiramente utilizado no Departamento de Microbiologia da UNICAMP.

2.2.2 Choque Térmico

Após a semeadura, as células HeLa foram submetidas a choque térmico, tendo sido montado o seguinte esquema experimental:

Situação Experimental	Tratamentos			
	Cultivo Inicial 37 °C	Choque térmico 40 °C	Choque térmico 43 °C	Recuperação 37 °C
HS1	16h	1h	-	-
HS2	16h	1h	-	4h
C1	16h	-	-	-
C2	21h	-	-	-
HS1*	16h	-	1h	-
HS2*	16h	-	1h	4h
C1*	16h	-	-	-
C1-1*	17h	-	-	-
C2*	21h	-	-	-

- HS1 - grupo tratado 1: 16 horas após a semeadura, as células foram submetidas a choque térmico, em banho-maria a 40 °C , durante 1 hora, e então fixadas.
- HS2 - grupo tratado 2: as células foram tratadas como descrito para HS1, mas após o choque térmico, os tubos retornaram à estufa a 37 °C , por 4 horas (“recuperação”), após o que se processou a fixação das células.
- C1 - grupo controle 1: células fixadas 16 horas após a semeadura (controle de HS1).
- C2 - grupo controle 2: células fixadas 21 horas após a semeadura (controle de HS2).
- HS1* - grupo tratado 1*: 16 horas após a semeadura, as células foram submetidas a choque térmico, em banho-maria a 43 °C , durante 1 hora, e então fixadas.

- HS2* - grupo tratado 2*: as células foram tratadas como descrito para HS1*, mas após o choque térmico, os tubos retornaram à estufa a 37 °C , por 4 horas (“recuperação”), após o que se processou a fixação das células.
- C1* - grupo controle 1*: células fixadas 16 horas após a semeadura (controle de HS1*).
- C1-1* - grupo controle 1-1*: células fixadas 17 horas após a semeadura (controle de HS1*).
- C2* - grupo controle 2*: células fixadas 21 horas após a semeadura (controle de HS2*).

A escolha das temperaturas de choque, consideradas moderada (40 °C) e mais drástica (43 °C), se baseou nas observações e considerações de Heine e colaboradores (1971).

2.2.3 Fixação dos preparados

Os monoestratos celulares foram fixados numa mistura de etanol absoluto e ácido acético glacial, na proporção de 3:1, por 1 minuto. A seguir o material foi lavado em etanol a 70 %, por 2 minutos, e deixado secar ao ar, à temperatura ambiente.

Os preparados destinados à observação em microscópio de interferência foram fixados em paraformolglutaraldeído, por 30 minutos, a seguir lavados em água destilada por 10 horas, e deixados secar ao ar, à temperatura ambiente.

2.2.4 Métodos de coloração

Parte do material foi corada com azul de toluidina segundo método de Vidal (MELLO & VIDAL, 1980) e parte submetida à reação de Feulgen.

Para a coloração com azul de toluidina foi utilizada solução do corante a 0,025 %, em tampão McIlvaine a pH 4.0. A coloração se processou por 15 minutos e foi seguida de rápida lavagem em água destilada e secagem ao ar, diafanização em xilol e montagem em bálsamo do Canadá ($n_D = 1,54$). Em alguns preparados a coloração foi precedida por tratamento com RNase (Sigma) a 0,1 % em solução aquosa, por 1 hora, à temperatura de 37 °C .

No material submetido à reação de Feulgen a hidrólise se processou em HCl 4N, à temperatura de 25 °C sendo seguida por rápido banho em HCl 0,1N gelado. Os tempos de hidrólise variaram de 70 a 105 minutos, pois se testava encontrar o tempo ótimo de depuração (MELLO & VIDAL, 1978), tendo sido este detectado como 90 minutos para todas as situações investigadas.

O tratamento com reativo de Schiff foi efetuado à temperatura ambiente, por 40 minutos, seguindo-se 3 banhos, de 5 minutos cada, em água sulfurosa (metabissulfito de sódio: HCl 1N: água destilada, 1:1:18) recém-preparada. A seguir o material foi lavado em água destilada, por 2 minutos e desidratado em série etanólica a partir de etanol a 70 %. As passagens em álcool a 70 % e 95 % foram de 1 minuto; já as duas passagens em álcool 100 % foram de 2 minutos cada. A diafanização foi realizada em xilol, por 10 minutos e a montagem foi feita em bálsamo do Canadá.

2.2.5 Observações Morfológicas

As observações de morfologia foram realizadas em células coradas com azul de toluidina, bem como em células não coradas e examinadas em microscopia de interferência.

Índices mitóticos, número de núcleos por célula e número de nucléolos por núcleo foram estimados em campos microscópicos escolhidos ao acaso nos preparados corados com azul de toluidina.

O percentual de micronúcleos foi detectado em preparados submetidos à reação de Feulgen.

À exceção das observações de microscopia de interferência, todas as outras foram realizadas em microscópio de luz comum, binocular, Zeiss. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Zeiss, usando-se filme negativo Panatomic X.

2.2.6 Cariometria e Nucleolometria

A partir de negativos fotográficos, a imagem dos núcleos e dos nucléolos corados com azul de toluidina a pH 4.0 foi projetada com auxílio de um ampliador fotográfico (em aumento final de 2600x) sobre papel milimetrado. O contorno dessas imagens, bem como o de um padrão de área foram então desenhados. As áreas nucleares e nucleolares foram a seguir determinadas com base na área projetada (MELLO & VIDAL, 1980).

Os valores de área nuclear total e áreas nucleolares foram distribuídos segundo histogramas de frequência, numa escala de valores em progressão geométrica (PALKÓVITS & FISCHER, 1968) e em diagramas de dispersão (VIEIRA, 1980).

Foram também aplicados testes estatísticos compatíveis aos dados obtidos, visando-se comparações entre as diferentes situações experimentais.

2.2.7 Microscopia de Interferência

O exame das células, visando-se detectar alterações no seu padrão de distribuição de massa, foi realizado em fotomicroscópio Pol-Interferencial Zeiss, utilizando-se objetiva Pol-Int.II 40 / 0.65 e condensador compatível à objetiva.

Os preparados foram imersos em solução salina de Fazekas cujo índice de refração ($n_D = 1,3341$) foi determinado em refratômetro, segundo Abbe, de fabricação Zeiss.

Após observações e fotografia das imagens, os mesmos preparados foram tratados com solução de NaCl 2M por 1 hora, lavados em solução salina de Fazekas, de novo montados nesse meio e reobservados. Este procedimento visou determinar alguma suscetibilidade de extração de proteínas com o tratamento salino (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981; LITTLEWOOD et alii, 1987).

As imagens foram fotografadas em filme negativo Kodacolor Gold 100.

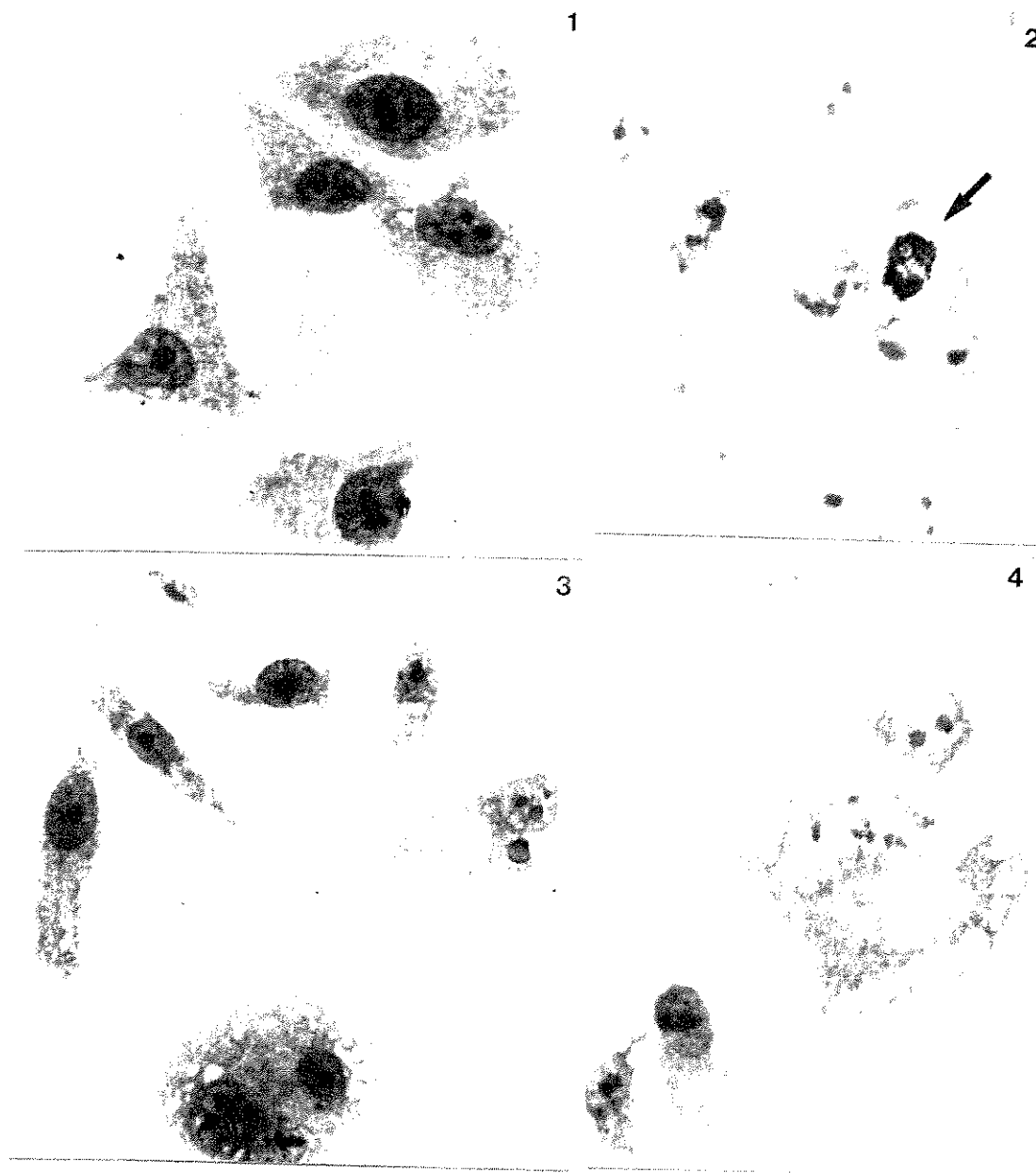
3 RESULTADOS

3.1 Aspectos morfológicos celulares

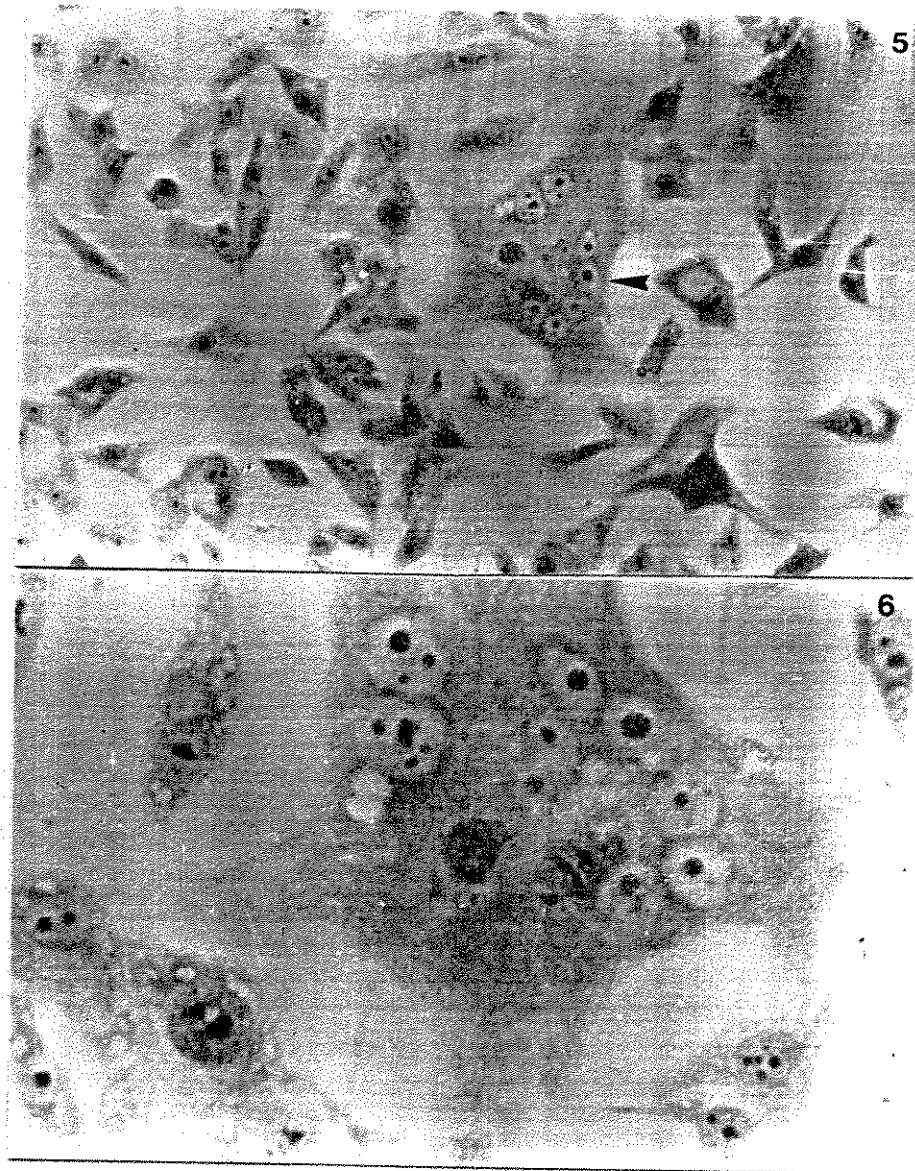
A observação dos preparados, sejam controles ou experimentais, corados com azul de toluidina, indica a ocorrência nos mesmos de diferentes fenótipos celulares, caracterizados por forma triangular, fusiforme, alongada, esférica e poligonal (Figs. 1-4). Estes diferentes fenótipos celulares são também identificados em monoestratos celulares não corados, em observação ao microscópio de interferência (Figs. 25 a 38).

Nas diferentes situações são encontradas também células em divisão (Fig. 2) e células gigantes (Figs. 4-6). Com referência ao número de núcleos, são encontradas células predominantemente mononucleadas (Tabela I), mas ocorrem também células binucleadas e multinucleadas (Figs. 5 e 6). Os núcleos exibem um, dois ou mais nucléolos (Figs. 1-9), sendo a presença de um único nucléolo a mais freqüente (Tabela I). Micronúcleos picnóticos (Fig. 3) e não picnóticos acham-se também presentes.

Tanto no citoplasma como no núcleo dos vários tipos celulares é detectável o fenômeno de metacromasia, tipo de basofilia devido ao grau de empilhamento das moléculas do corante ligadas ao substrato e à proximidade entre as mesmas, e caracterizada por um pico de absorção ao redor de 550-580 nm (LISON, 1960; VIDAL, 1975, 1987; MELLO, 1976, 1982, 1983; MELLO & VIDAL, 1977; MELLO et alii, 1978; SIMONI & MELLO, 1986). No entanto, de modo geral, o citoplasma não se cora homogeneamente, havendo áreas com aspecto "vacuolizado", sem afinidade pelo azul de toluidina a pH 4.0 (Figs. 1-9).



Figs. 1 a 4 - Células HeLa (C1) coradas com azul de toluidina a pH 4.0. São observados diferentes tamanhos e formas celulares. Observam-se também mitose (Fig.2, seta), núcleos de diferentes tamanhos e com 1, 2 (Fig. 3) ou vários nucléolos (Fig. 4), micronúcleo picnótico (Figs. 1 e 3) e célula gigante (Fig. 4). x400.

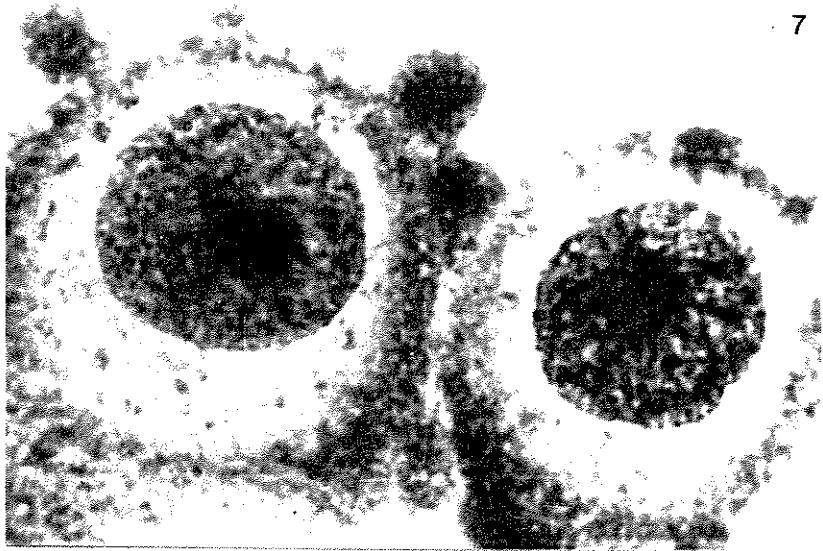


Figs. 5 e 6 - Células HeLa (HS2) coradas com azul de toluidina a pH 4.0, onde se destaca a presença de massa sincicial (seta). 5. x200; 6. x500.

Nas diferentes situações de hipertermia foi verificado, em algumas células, o acúmulo de substâncias reativas ao azul de toluidina próximas aos bordos celulares e muitas vezes predominância de áreas não reativas ao azul de toluidina circundando os núcleos (Fig. 7 - 9). O material citoplasmático reativo ao azul de toluidina mostrou tratar-se de RNA, uma vez que é digerido por RNase. Preferencialmente na condição experimental de choque térmico foram encontradas células cujo bordo apresentava diversas expansões citoplasmáticas projetando-se para o meio exterior e mesmo se desprendendo das células (Fig. 7 - 9). Esta situação apareceu com freqüência muito mais acentuada quando o choque térmico a que as células HeLa foram submetidas se deu a 43 °C (HS1*).

Excetuando-se a observação de que o choque térmico induziu redução no índice mitótico, não recuperável após 4 horas de cultivo a 37 °C, os percentuais de células com diferentes números de núcleos e, de núcleos com diferente número de nucléolos aparentemente não foram afetados pelo choque (Tabela I).

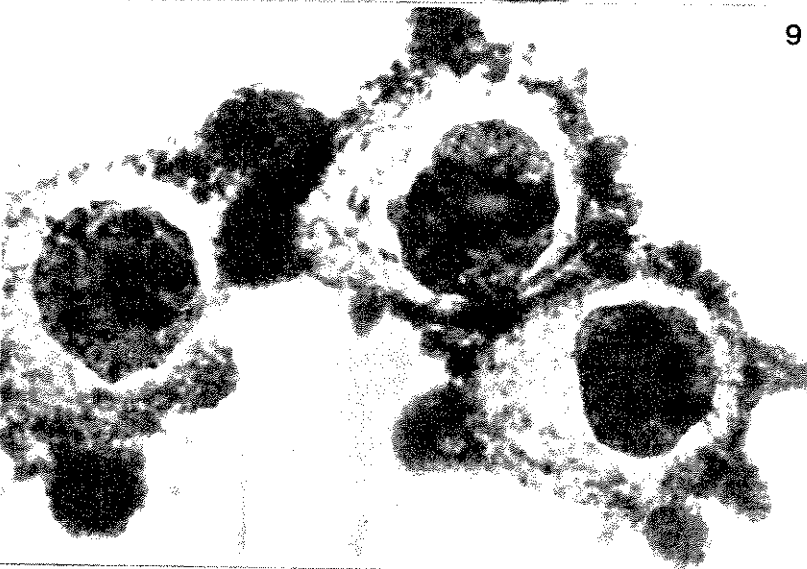
Quanto à presença de micronúcleos, esta parece ser ligeiramente mais elevada nos preparados que foram submetidos ao choque, especialmente à temperatura mais elevada, não havendo também diminuição em seu percentual até 4 horas após o retorno à temperatura de 37 °C (Tabela II).



7



8



9

Tabela I - Dados referentes a células HeLa submetidas a choque hipertérmico e coradas com azul de toluidina (pH 4.0).

Situações Experimentais	n	I.M. %	células nucleadas (%)			nucléolo/núcleo (%)		
			mono	bi	multi	1	2	> 2
C1	1001	0,80	93,3	5,7	1,0	63,0	25,7	11,3
C1*	1001	2,10	97,2	2,2	0,6	51,3	27,9	20,8
C1-1*	1013	0,99	97,4	2,2	0,4	46,1	28,0	25,8
HS1	1017	0,39	96,5	2,7	0,8	67,5	26,0	6,5
HS1*	1001	1,0	97,9	1,4	0,7	51,1	29,1	19,7
C2	1018	0,49	95,8	3,5	0,7	67,2	25,8	7,0
C2*	1015	4,43	98,7	1,3	-	31,1	25,5	43,4
HS2	1017	0,10	96,5	2,9	0,6	67,5	24,4	8,1
HS2*	1007	0,38	98,9	1,1	-	60,7	19,7	19,6

- C1 - controle de HS1 (16 h / 37 °C);
 C1* - controle de HS1* (16 h / 37 °C);
 C1-1* - controle de HS1* (17 h / 37 °C);
 C2 - controle de HS2 (21 h / 37 °C);
 C2* - controle de HS2* (21 h / 37 °C);
 HS1 - choque (16 h / 37 °C + 1 h / 40 °C);
 HS1* - choque (16 h / 37 °C + 1 h / 43 °C);
 HS2 - “recuperação” (16 h / 37 °C + 1 h / 40 °C + 4 h / 37 °C);
 HS2* - “recuperação” (16 h / 37 °C + 1 h / 43 °C + 4 h / 37 °C);
 I.M. - índice mitótico;
 n - número de células contadas.

Tabela II - Micronucleação em células HeLa após choque hipertérmico.

Situações Experimentais	número de células contadas	micronúcleos %
C1	1067	0,94
C1*	1038	2,22
C1-1*	1028	2,28
HS1	1057	1,23
HS1*	1077	3,06
C2	1016	2,56
C2*	1025	1,17
HS2	1073	2,33
HS2*	1067	4,06

- HS1 - choque (16 h / 37 °C + 1 h / 40 °C);
 C1 - controle de HS1 (16 h / 37 °C);
 HS2 - “recuperação” (16 h / 37 °C + 1 h / 40 °C + 4 h / 37 °C);
 C2 - controle de HS2 (21 h / 37 °C);
 HS1* - choque (16 h / 37 °C + 1 h / 43 °C);
 C1* - controle de HS1* (16 h / 37 °C);
 C1-1* - controle de HS1* (17 h / 37 °C);
 HS2* - “recuperação” (16 h / 37 °C + 1 h / 43 °C + 4 h / 37 °C);
 C2* - controle de HS2* (21 h / 37 °C).

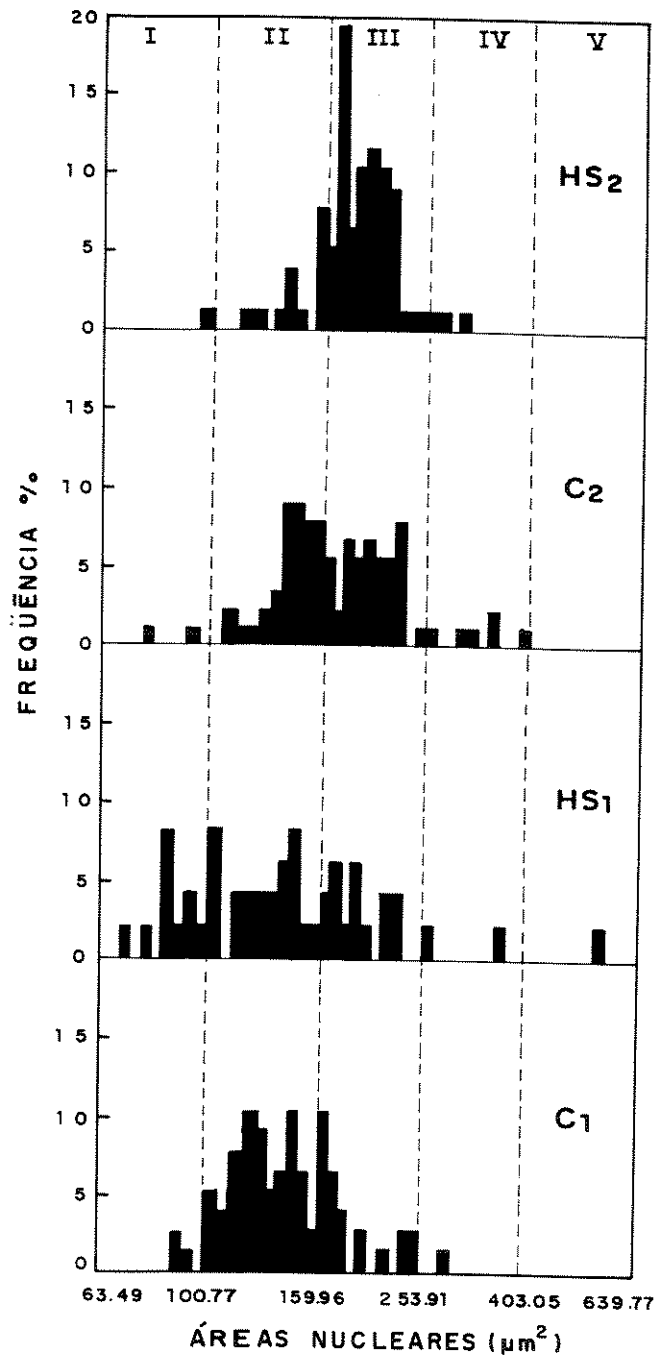
3.2 Áreas Nucleares e Nucleolares

Os valores de área nuclear e de área nucleolar nas células HeLa controle e submetidas ao choque térmico, distribuídos segundo histogramas de freqüência, numa escala de valores em progressão geométrica, acham-se indicados nas Figuras 10 a 17.

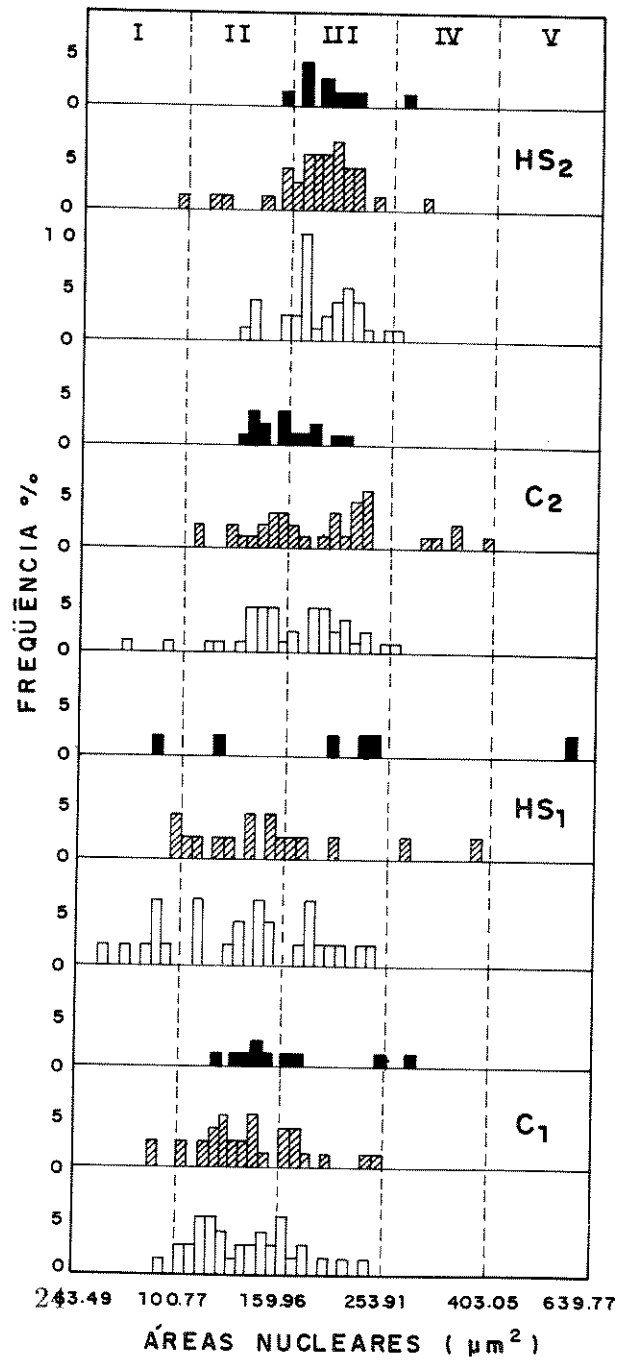
As classes I a V das figuras 10 a 13 representam intervalos que guardam entre si a relação $\sqrt[3]{4}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (PALKÓVITS & FISCHER, 1968; MELLO & VIDAL, 1980).

Com base numa análise descritiva dos histogramas de freqüência para as áreas nucleares, constatou-se que o choque à temperatura de 40 °C (HS1) levou a que uma parte da população nuclear viesse a apresentar valores mais baixos de área (Fig. 10, Tabela III). Os núcleos que assim se comportaram continham em sua

maioria apenas um nucléolo (Fig. 11). No material cultivado à temperatura controle após o choque de 40 °C (HS2) os valores de área nuclear se deslocaram para a região à direita da distribuição (Fig. 10, Tabela III), excedendo até os valores do controle respectivo (C2), uma contribuição principalmente de núcleos com 1 e 2 nucléolos (Fig. 11).



10



11

Uma alteração na distribuição dos dados de áreas nucleares, com deslocamento para valores mais baixos, após o choque a 43 °C (HS1*) em relação ao controle foi detectável apenas quando se considerou o controle C1-1*, que corresponde a 17 h de cultura (1h a mais que C1*) (Fig. 12, Tabela III). A alteração do padrão de distribuição acima mencionado ocorreu independentemente do número de nucléolos por núcleo (Fig. 13). Na situação de cultivo por 4h à temperatura de 37 °C após o choque hipertérmico a 43 °C houve tendência dos valores de área se deslocarem para a direita da distribuição (Fig. 12, Tabela III), contribuição de núcleos com 1, 2 e mais de 2 nucléolos (Fig. 13).

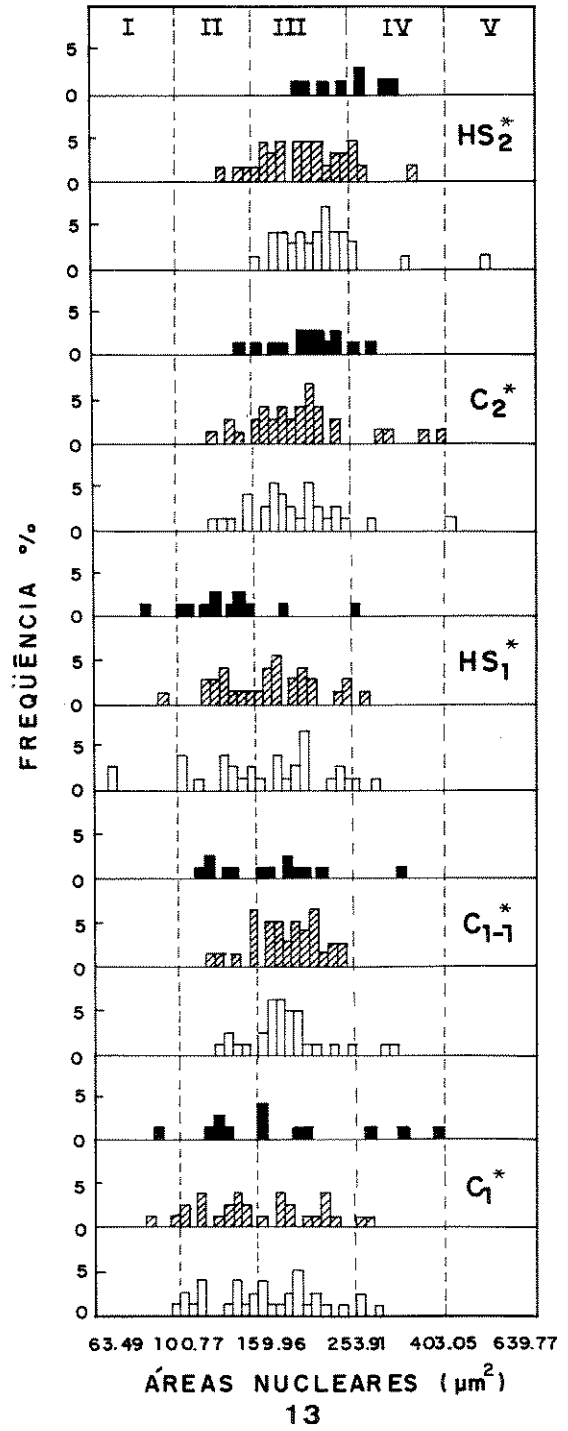
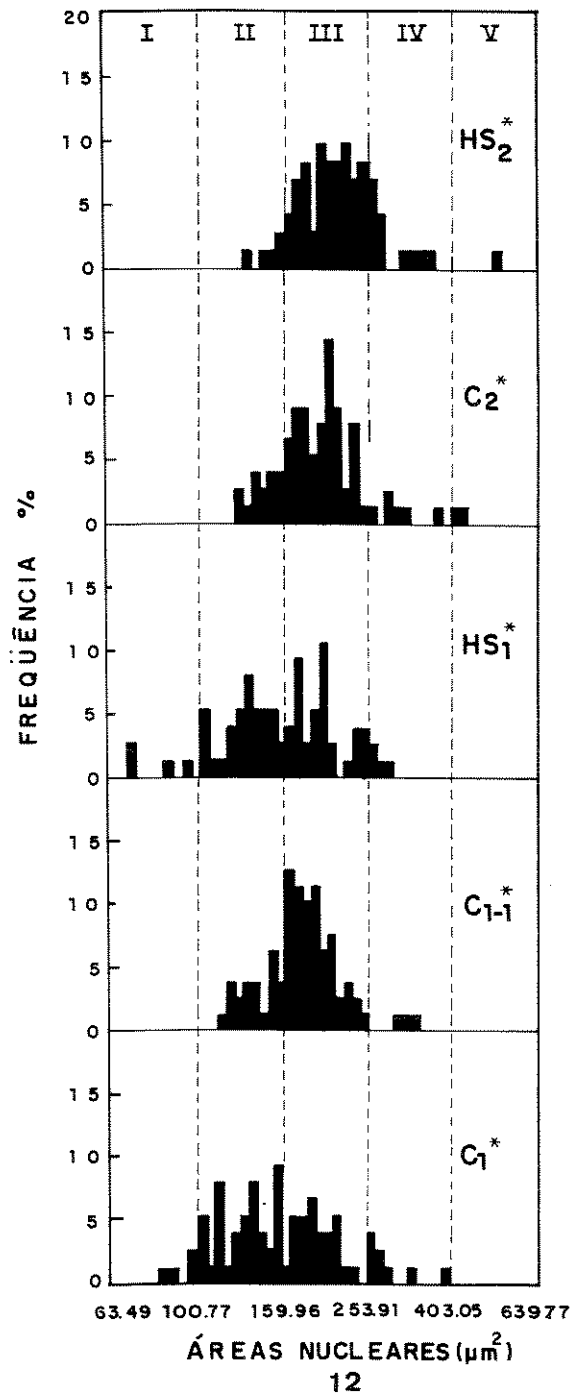


Tabela III - Freqüência nuclear para diferentes valores de área delimitados pelas classes I a V, cujos intervalos guardam entre si a relação de $\sqrt[3]{4}$, o que corresponderia a duplicações em valores de volume nuclear (PALKÓVITS & FISHER, 1968; MELLO & VIDAL, 1980).

Situações Experimentais	número de medidas	Freqüência nuclear (%) nos diferentes intervalos de classe				
		I	II	III	IV	V
C1	79	3,80	65,82	29,11	1,27	-
C1*	75	5,33	49,33	34,67	10,67	-
C1-1*	79	-	26,58	69,62	3,80	-
HS1	49	20,41	42,86	30,61	4,08	2,04
HS1*	74	5,40	44,60	44,60	5,40	-
C2	89	2,25	43,82	47,19	6,74	-
C2*	78	-	17,95	71,80	7,69	2,56
HS2	76	1,32	17,10	77,63	3,95	-
HS2*	71	-	7,04	74,65	16,90	1,41

- C1 - controle de HS1 (16 h / 37 °C);
 C2 - controle de HS2 (21 h / 37 °C);
 HS1 - choque (16 h / 37 °C + 1 h / 40 °C);
 HS2 - “recuperação” (16 h / 37 °C + 1 h / 40 °C + 4 h / 37 °C);
 C1* - controle de HS1* (16 h / 37 °C);
 C1-1* - controle de HS1* (17 h / 37 °C);
 C2* - controle de HS2* (21 h / 37 °C);
 HS1* - choque (16 h / 37 °C + 1 h / 43 °C);
 HS2* - “recuperação” (16 h / 37 °C + 1 h / 43 °C + 4 h / 37 °C).

Apesar das alterações acima relatadas, que se basearam em análise descritiva dos dados, diferenças estatisticamente significativas foram demonstradas apenas para as comparações de controles em diferentes tempos de cultivo e entre choque e recuperação (Tabelas IV e V). Para tal demonstração foram empregados os testes estatísticos de U (Mann-Whitney) e de Kruskal-Wallis, seguido por comparações múltiplas.

Estes testes são não-paramétricos, e se aplicam a distribuições não normais e não homogêneas, como neste caso. O teste de U compara amostras duas a duas, testando a hipótese nula de que as amostras vêm da mesma população ou de populações idênticas, contra a hipótese alternativa de virem de populações que diferem significativamente entre si. O teste de Kruskal-Wallis compara todas as situações simultaneamente revelando se as diferenças entre as amostras são significativas na população genuína ou se elas representam meras variações esperadas para amostras aleatórias da mesma população. Sua hipótese nula dita que as amostras vêm da mesma população ou de populações idênticas com respeito às médias e sua hipótese alternativa aponta que pelo menos dois tratamentos diferem entre si. A execução de relações múltiplas permite a discriminação da existência de tais diferenças, apontando os casos em que elas se fazem presentes. A opção em se realizar os dois testes foi recomendada a título de confirmação dos resultados, uma vez que os testes se utilizam de diferentes parâmetros, e não fornecem potência 100 % quando se cumprem as condições de normalidade.

Quanto à análise descritiva dos histogramas de freqüência das áreas nucleolares, constatou-se um aumento dos valores nos controles, com o avanço do tempo de cultivo (Figs. 14 e 16), contribuído principalmente pelos núcleos com 2 nucléolos (Figs. 15 e 17). Apenas na recuperação do choque a 43 °C (HS2*) observou-se alteração na distribuição dos valores de áreas nucleolares, comparada ao respectivo controle (C2*) e à situação do próprio choque (HS1*) (Fig. 16). Esta alteração corresponde a um aumento nos valores das áreas de HS2* em comparação à C2* e HS1*. Tal fato parece acontecer independentemente do número de nucléolos por núcleo em consideração (Fig. 17).

As alterações aqui relatadas para as áreas nucleolares foram também comprovadas através da análise estatística (Tabelas IV e V).

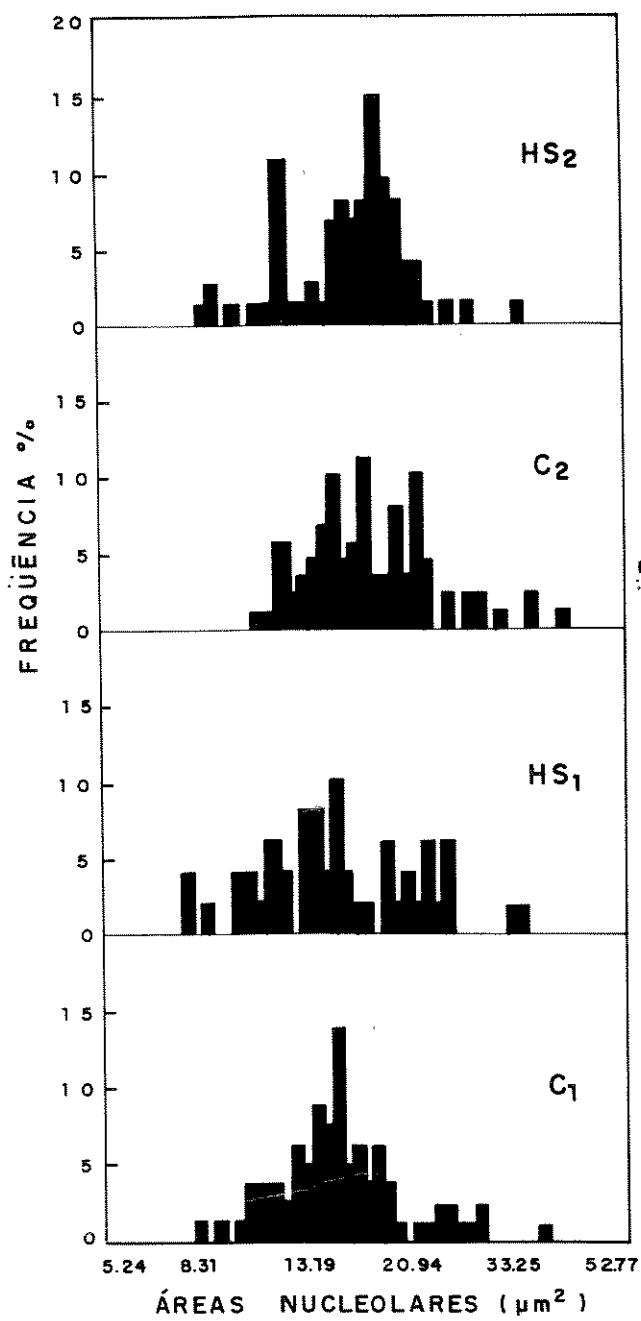
Tabela IV - Teste de U (Mann-Withney) para os valores de áreas nucleares e nucleolares dos histogramas de frequência.

Situações Experimentais	áreas nucleares		áreas nucleolares	
	40 °C	43 °C	40 °C	43 °C
C1 x HS1	NS	NS	NS	NS
C2 x HS2	NS	NS	NS	S***
C1 x C2	S***	S***	S*	S*
HS1 x HS2	S***	S***	NS	S***
C1 x C1-1	-	NS	-	NS
C1-1 x HS1	-	NS	-	NS
C1-1 x C2	-	NS	-	S*

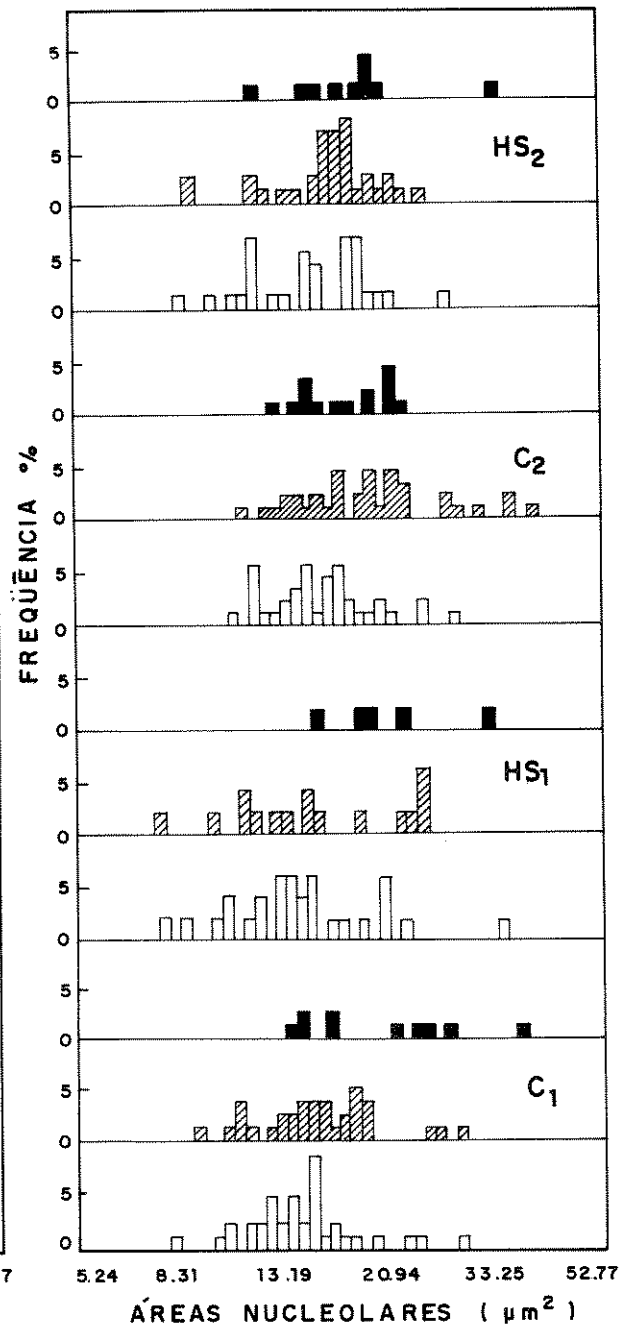
Tabela V - Teste de Kruskal-Wallis para os valores de áreas nucleares e nucleolares dos histogramas de frequência.

Situações Experimentais	áreas nucleares		áreas nucleolares	
	40 °C	43 °C	40 °C	43 °C
C1 x HS1	NS	NS	NS	NS
C2 x HS2	NS	NS	NS	S***
C1 x C2	S***	S***	S**	S*
HS1 x HS2	S***	S***	NS	S***
C1 x C1-1	-	NS	-	NS
C1-1 x HS1	-	NS	-	NS
C1-1 x C2	-	NS	-	S*

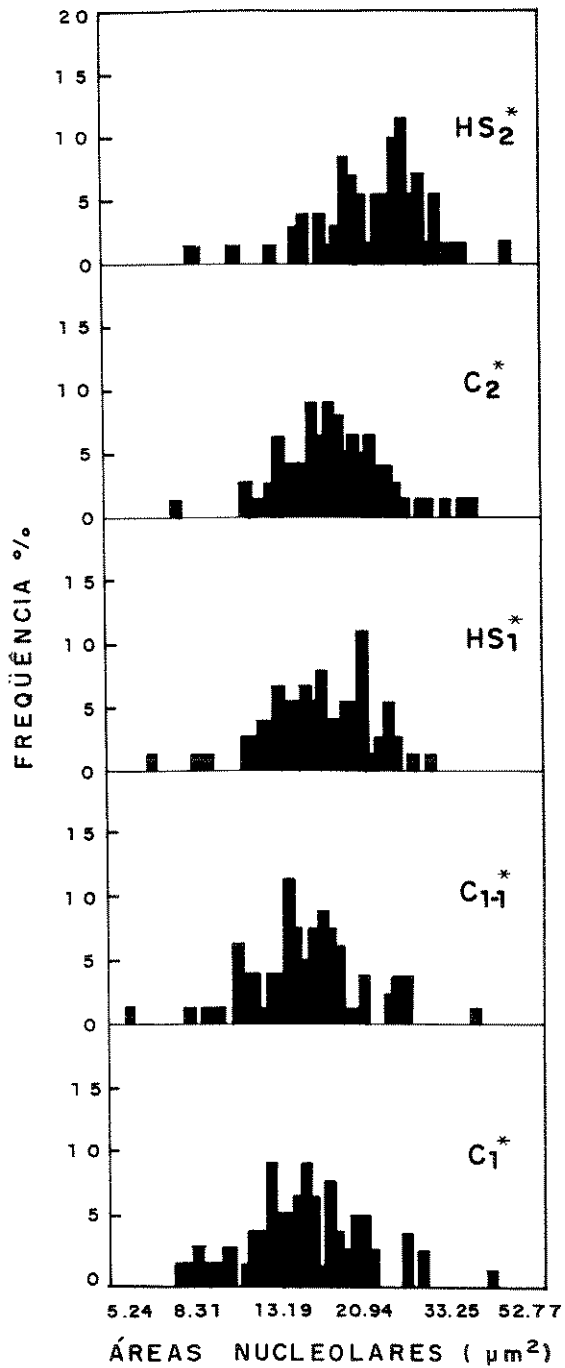
- NS - não significativo ao nível de 5 %;
 * - significativo ao nível de 5 % ($0,01 < p < 0,05$);
 ** - significativo ao nível de 1 % ($0,001 < p < 0,01$);
 *** - significativo ao nível de 0,1 % ($p < 0,001$);
 HS1 - choque;
 HS2 - “recuperação”;
 C1 - controle de HS1;
 C2 - controle de HS2.



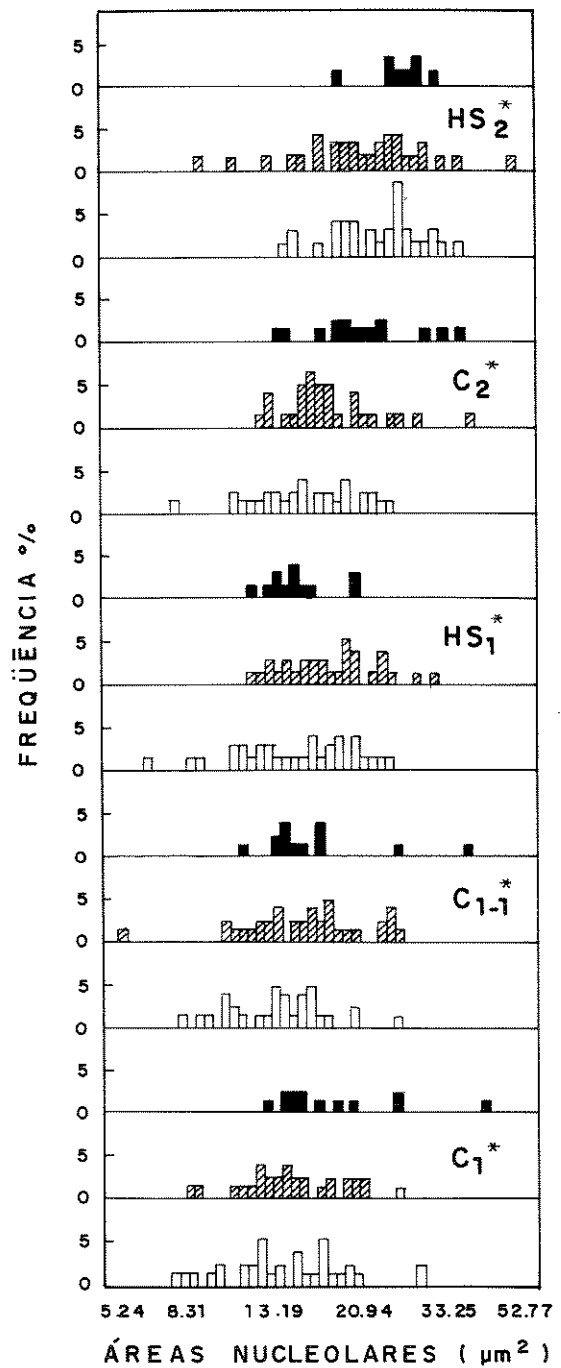
14



15



16



17

Os diagramas de dispersão visando ao estudo da correlação entre áreas nucleares e nucleolares nas diferentes situações experimentais podem ser vistos nas Figuras 18 e 19.

Os coeficientes de correlação obtidos em todos os casos indicam a existência de correlação direta ou positiva entre os valores de áreas nucleares e nucleolares, isto é, as variações ocorrem no mesmo sentido. Para todas as situações a correlação encontrada foi significativa.

Nas Figuras 20 e 21 acham-se representadas as retas de regressão construídas a partir de equações obtidas com os valores de áreas nucleares x áreas nucleolares nas diferentes situações experimentais desta investigação. Estas retas permitem a observação de como a correlação “se comporta”. Nas Figuras 22 e 23 essas retas foram representadas duas a duas a fim de melhor visualização de diferenças.

Os resultados do teste de significância entre os coeficientes de correlação comparados são mostrados na Tabela VI e comprovam que a correlação entre áreas nucleares e nucleolares em células submetidas a choque de temperatura a 40 °C ou 43 °C é significativamente diferente daquela das células controle. Tal parece se dever a que a área nucleolar em parte das células submetidas ao choque não acompanhou em mesma proporção os tamanhos nucleares (Figs. 18 e 19). Nas células em recuperação, por outro lado, houve de fato a tendência a se recuperar o padrão controle, com ausência de diferenças significativas entre seus coeficientes de correlação (Tabela VI).

Diferenças no grau de interdependência entre área nuclear x área nucleolar, conforme as situações comparadas, em que tal grau era medido através dos parâmetros “altura” e “ângulo” das retas de regressão, acham-se estatisticamente demonstradas na Tabela VII.

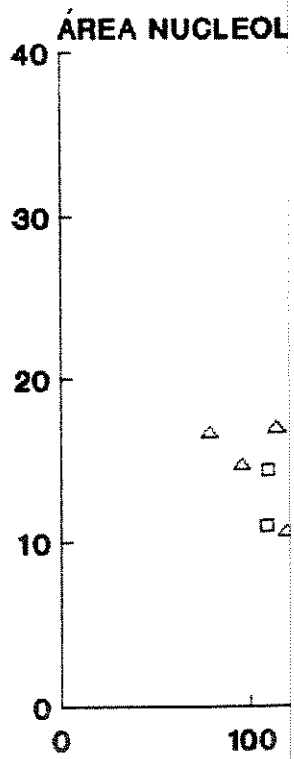
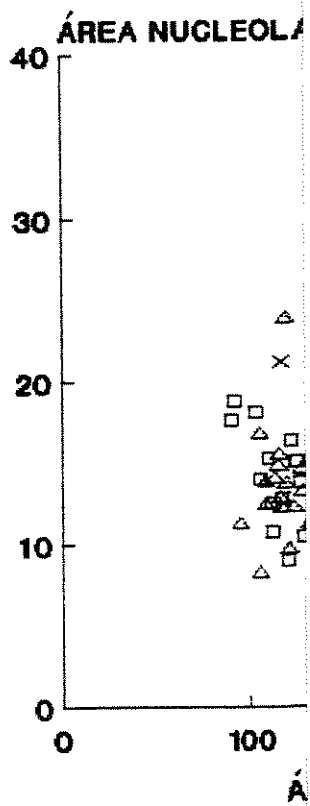
O teste de significância entre retas de regressão fornece dados cuja interpretação pode ser generalizada da seguinte maneira:

- Retas consideradas paralelas estatisticamente, ou seja, com ângulos não apresentando diferenças significativas, mas com alturas significativamente diferentes, têm-se para um mesmo aumento no valor de X aumentos proporcionais em Y, mas embora exista proporcionalidade, os valores de Y estarão defasados na reta cuja altura for menor. Fala-se que há diferenças na “potência”.
- Retas com alturas não significativamente diferentes, mas com ângulos diferentes, têm-se uma alteração na “efetividade”; para um dado valor de X, o aumento em Y é menor na reta de menor ângulo.

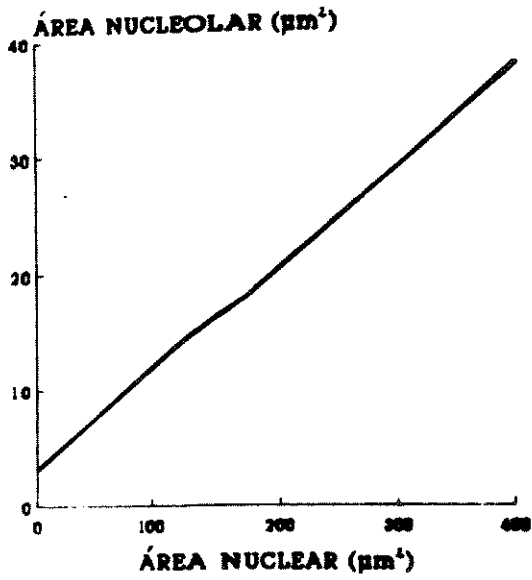
- Retas com alturas e ângulos significativamente diferentes, isto é, retas que se cruzam, têm-se a efetividade invertida no ponto de cruzamento.

No caso da comparação entre C2 x HS2, a aparente discrepância na decisão de significância conforme o parâmetro considerado se deve a que:

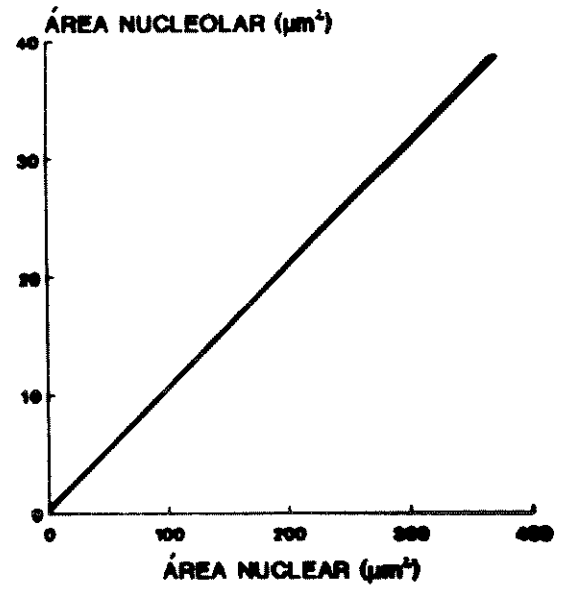
1. para os mesmos valores de área nuclear o material em “recuperação” após choque a 40 °C apresentou sempre áreas nucleolares ligeiramente menores do que as do seu controle;
2. o tamanho dos nucléolos no material em “recuperação” após choque a 43 °C deixa progressivamente de acompanhar o aumento do tamanho nuclear quando comparado ao seu controle.



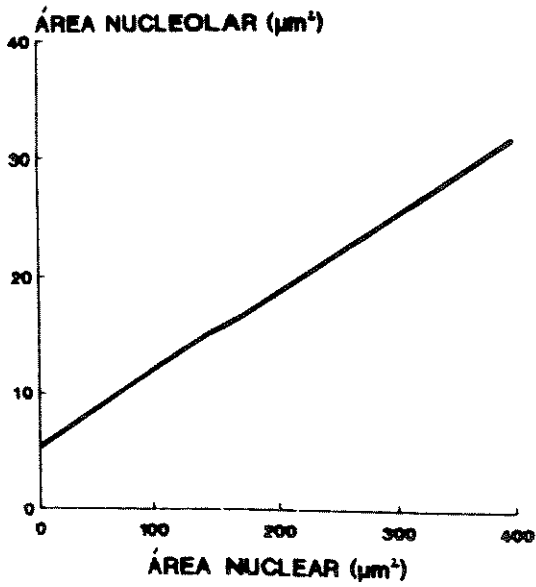
C1
 $y = 2.8621 + 0.0888x$



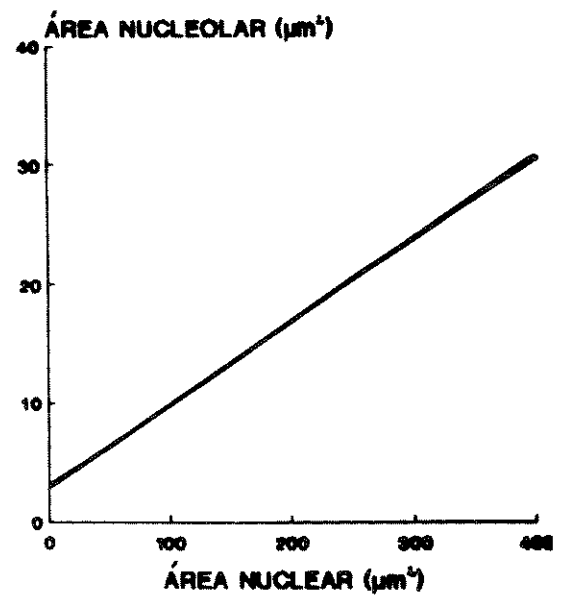
HS1
 $y = 0.4366 + 0.1066x$



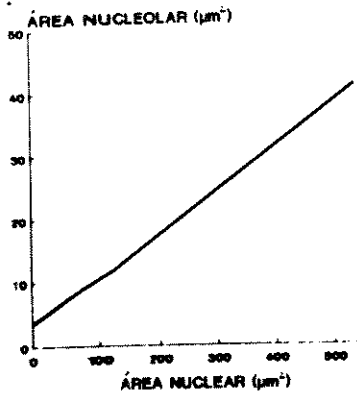
C2
 $y = 5.6852 + 0.0706x$



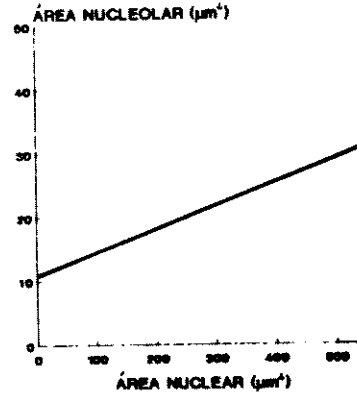
HS2
 $y = 3.3654 + 0.0706x$



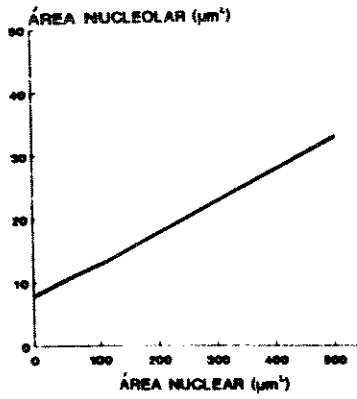
C1*
 $y = 3.96 + 0.07046x$



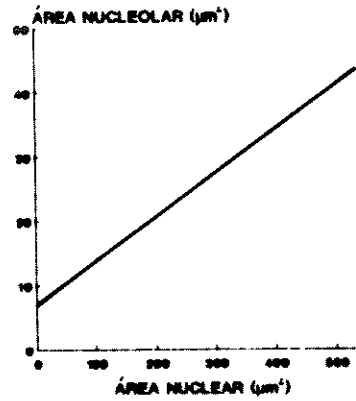
HS1*
 $y = 10.96 + 0.03542x$



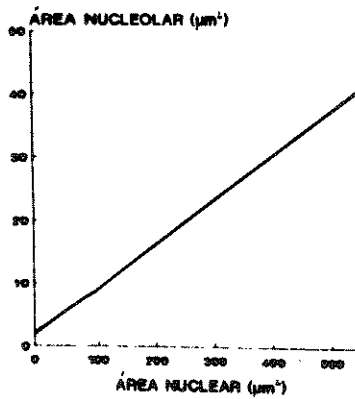
C2*
 $y = 8.09 + 0.05005x$

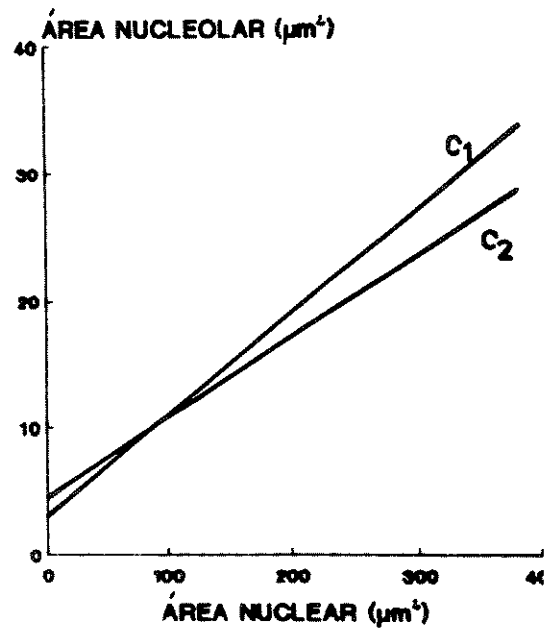
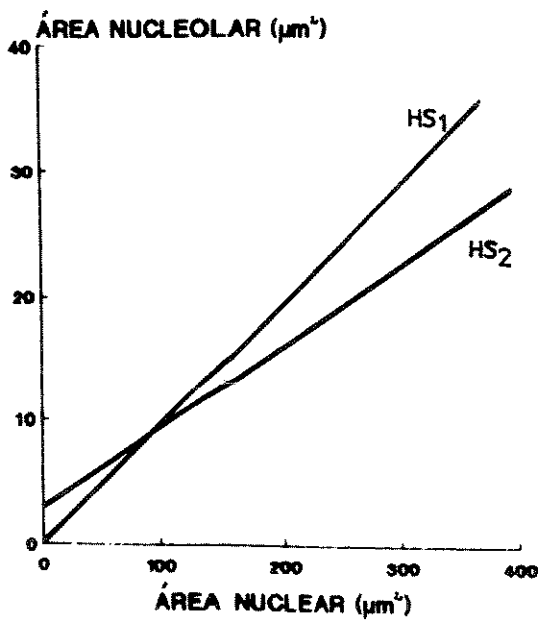
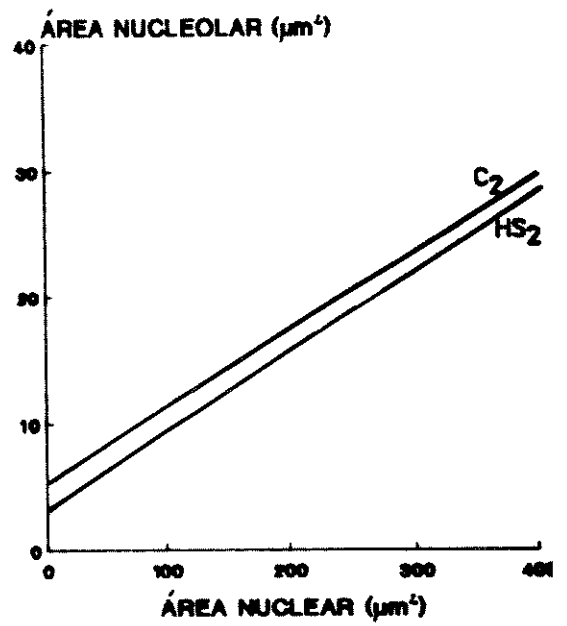
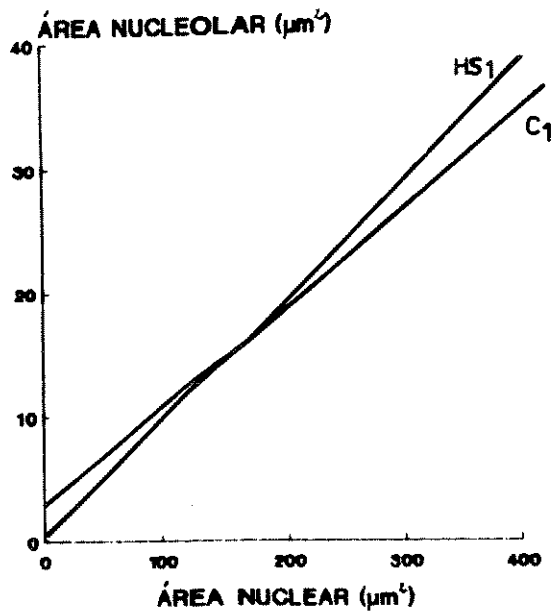


HS2*
 $y = 7.75 + 0.06810x$



C1-1*
 $y = 2.10 + 0.07183x$





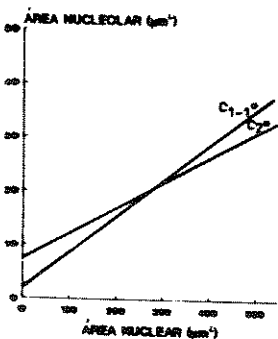
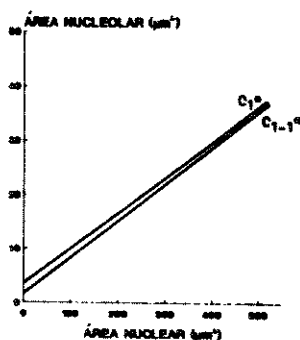
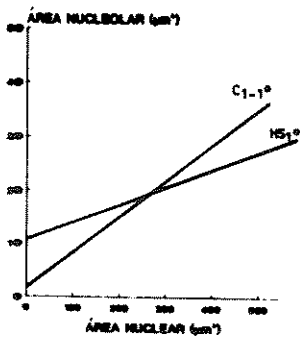
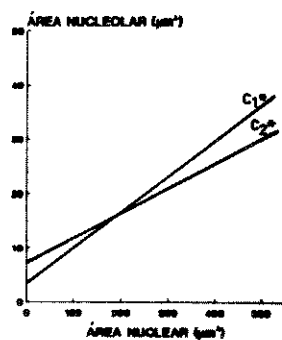
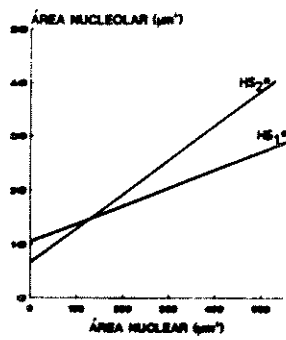
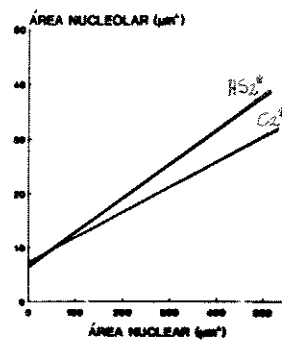
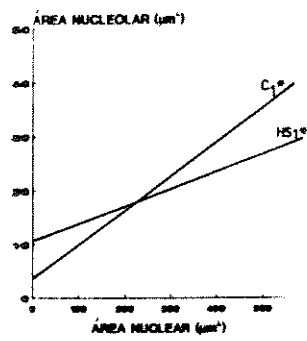


Tabela VI - Teste de significância para coeficientes de correlação obtidos a partir de comparação de valores de áreas nucleares e nucleolares em diferentes situações experimentais.

Situações Experimentais	temperatura de choque	
	40 °C	43 °C
C1 x HS1	S*	S**
C2 x HS2	NS	NS
C1 x C2	NS	S*
HS1 x HS2	S**	S*
C1 x C1-1	-	NS
C1-1 x HS1	-	NS
C1-1 x C2	-	NS

Tabela VII - Teste de significância entre retas de regressão obtidas a partir de valores de áreas nucleares e nucleolares em diferentes situações experimentais.

Situações Experimentais	altura		ângulo	
	40 °C	43 °C	40 °C	43 °C
C1 x HS1	S**	S**	S*	S**
C2 x HS2	S**	NS	NS	S**
C1 x C2	S**	S**	S**	S**
HS1 x HS2	S**	S**	S**	S**
C1 x C1-1	-	S*	-	NS
C1-1 x HS1	-	S**	-	S**
C1-1 x C2	-	S**	-	S**

- NS - não significativo ao nível de 5 %;
 * - significativo ao nível de 5 % ($0,01 < p < 0,05$);
 ** - significativo ao nível de 1 % ($0,001 < p < 0,01$);
 HS1 - choque;
 HS2 - “recuperação”;
 C1 - controle de HS1;
 C2 - controle de HS2.

3.3 Imagens de Interferência

Procedeu-se de tal maneira que o meio de imersão no qual as células se achavam em contato aparecesse em cor preta. As cores de interferência observadas nas células passaram, então, a ser superiores a esta, segundo a escala de Michel-Lévy (Fig. 24). As cores de interferência observadas nas células relacionam-se à franja de mesma cor na escala padrão mencionada (Fig. 24).

O padrão de distribuição das cores de interferência nas células HeLa mostrou-se alterado após o choque de temperatura a 43 °C, quando comparado ao das situações controle (Figs. 25 - 29). As cores observadas na região nuclear saltaram para cores superiores, inclusive de segunda ordem (azul e às vezes amarelo) (Figs. 27 - 29), em mais da metade dos núcleos interfásicos. Em situação de recuperação, as imagens de interferência apareceram semelhantes às dos controles (Figs. 30 e 31).

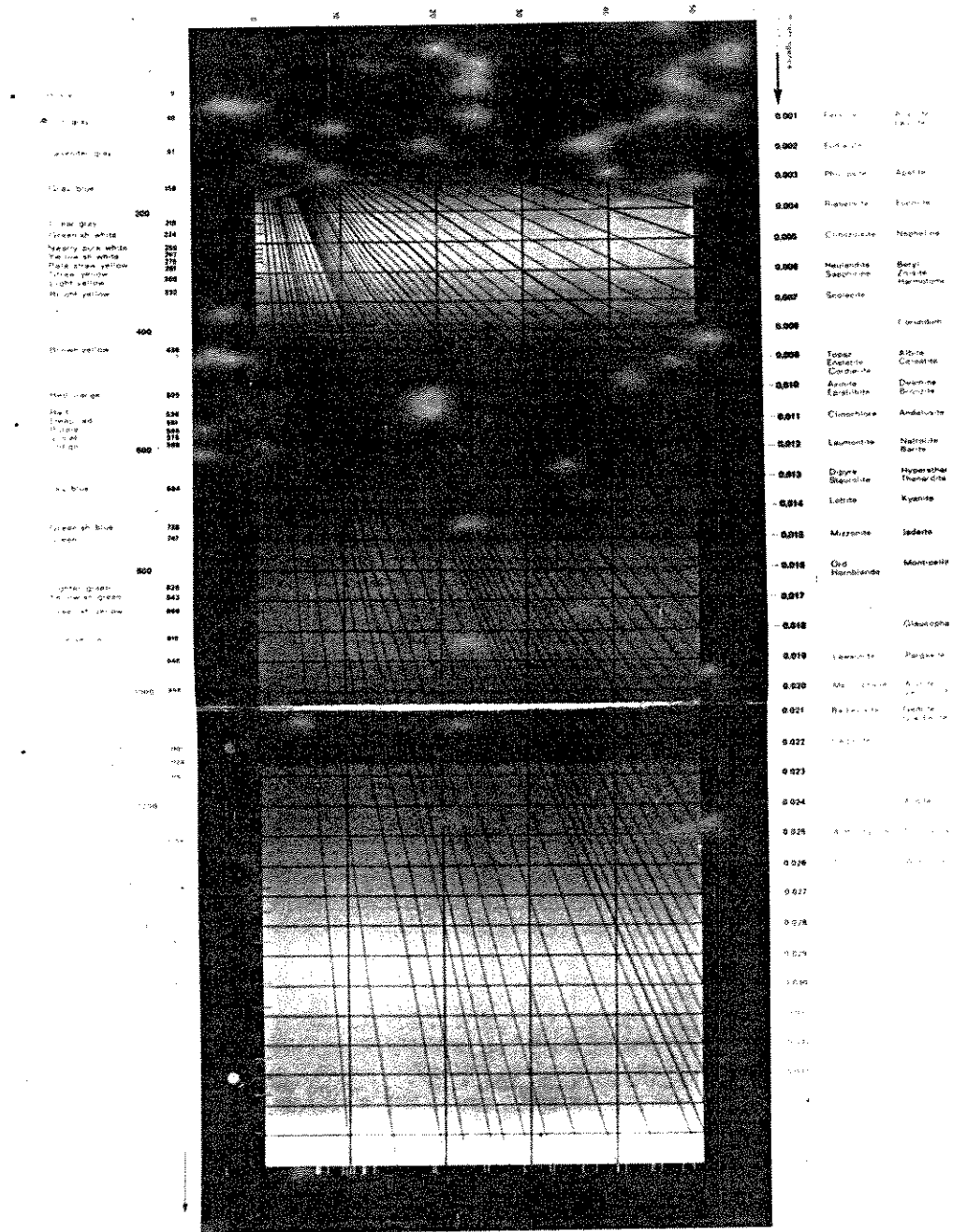
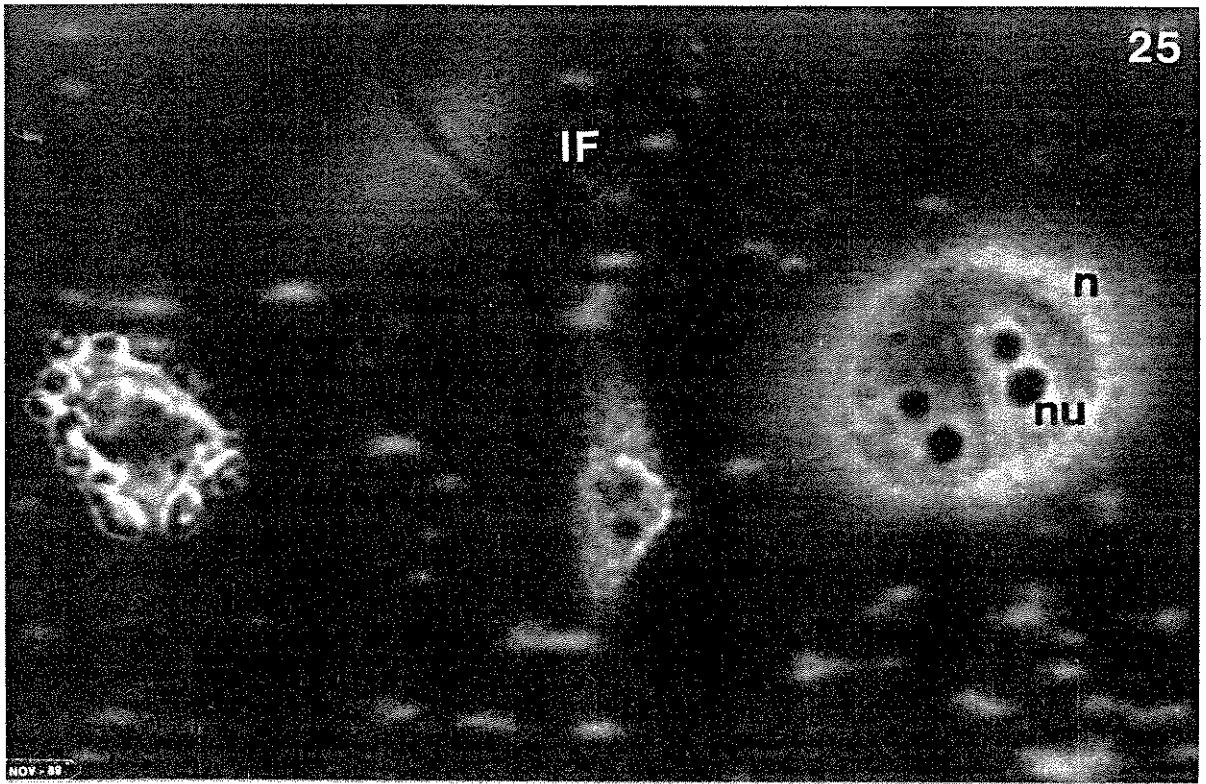
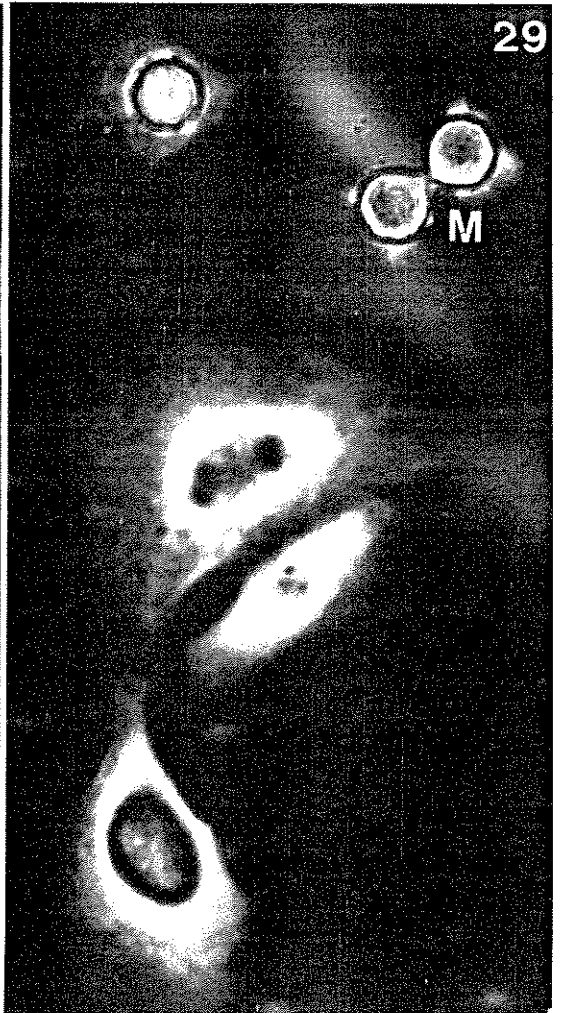
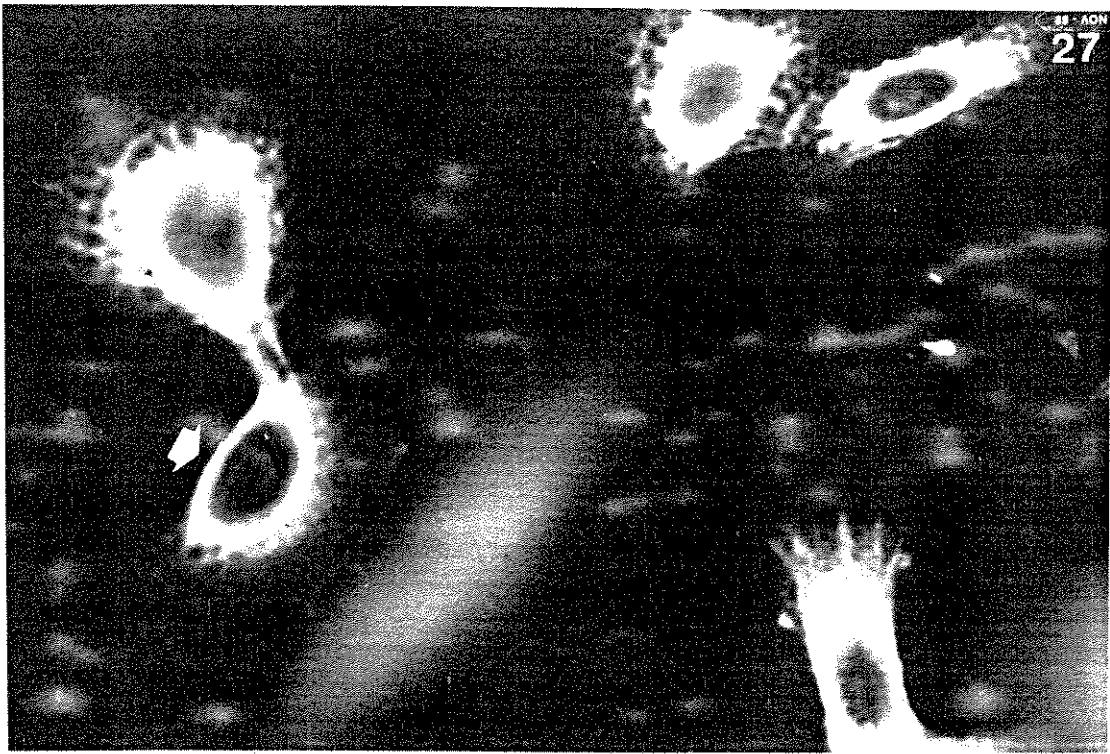
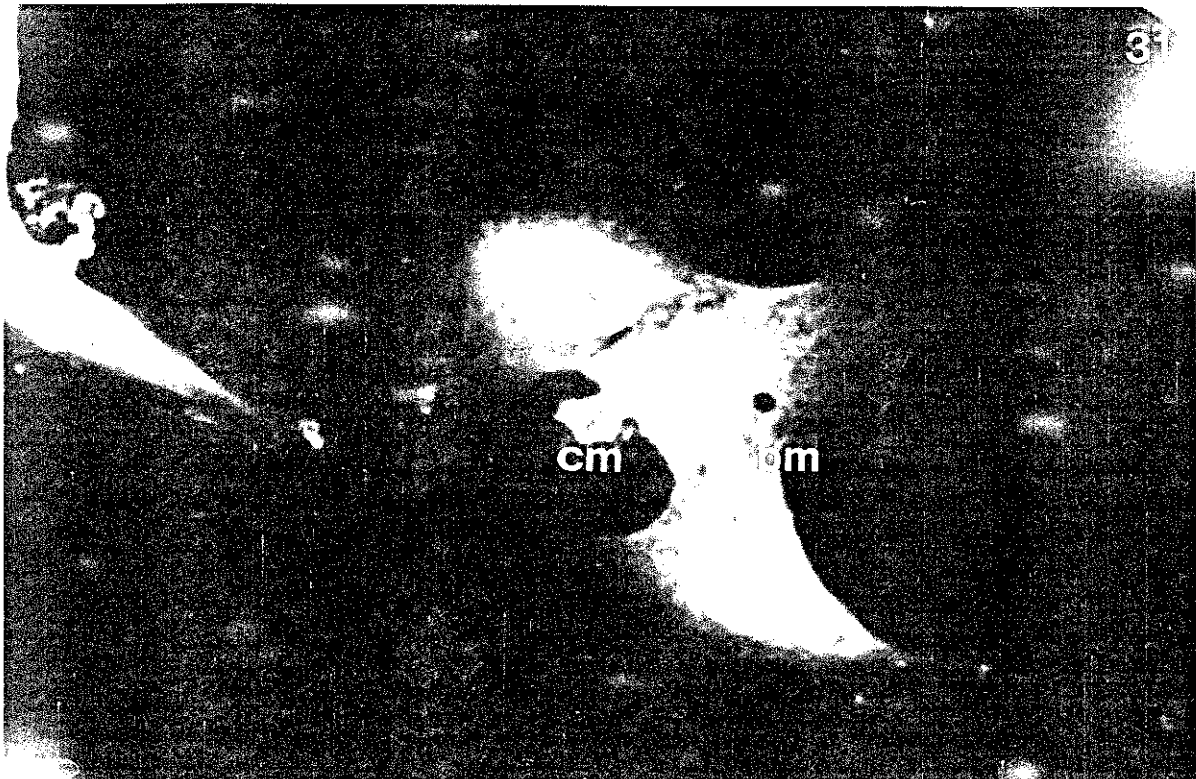
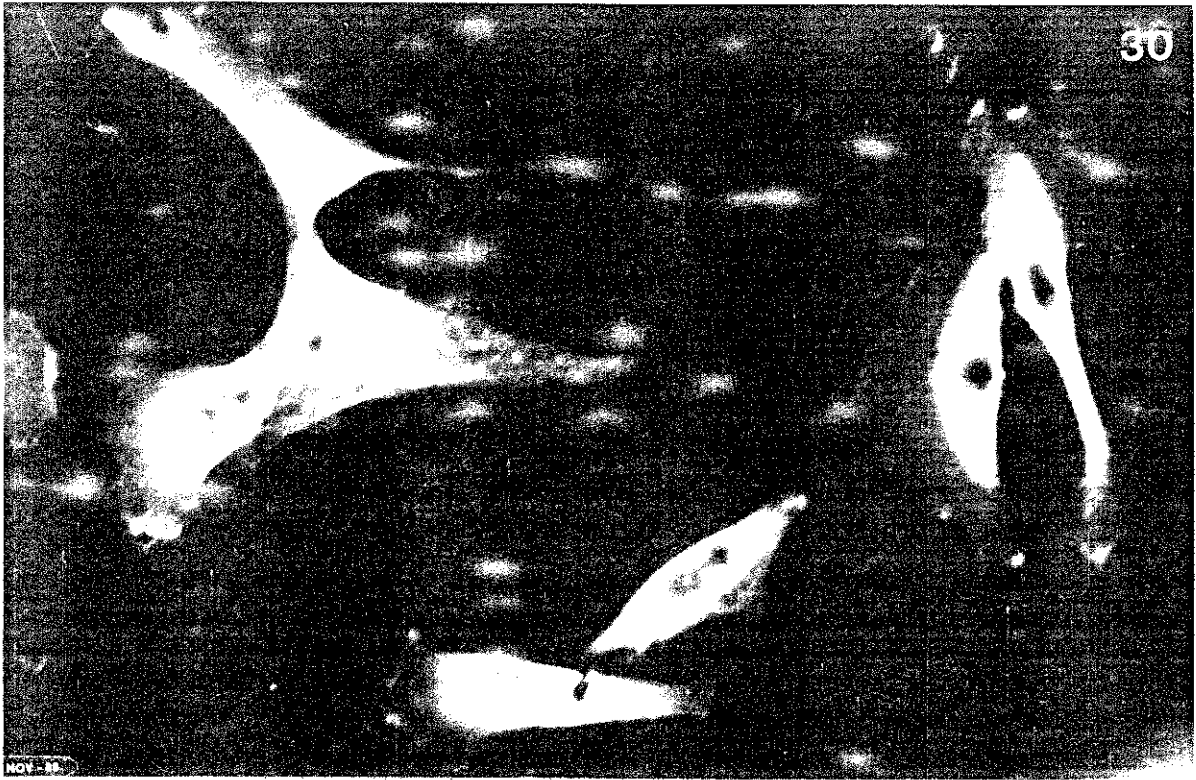


Fig. 24 - Padrão de cores de interferência segundo escala de Michel-Lévy.



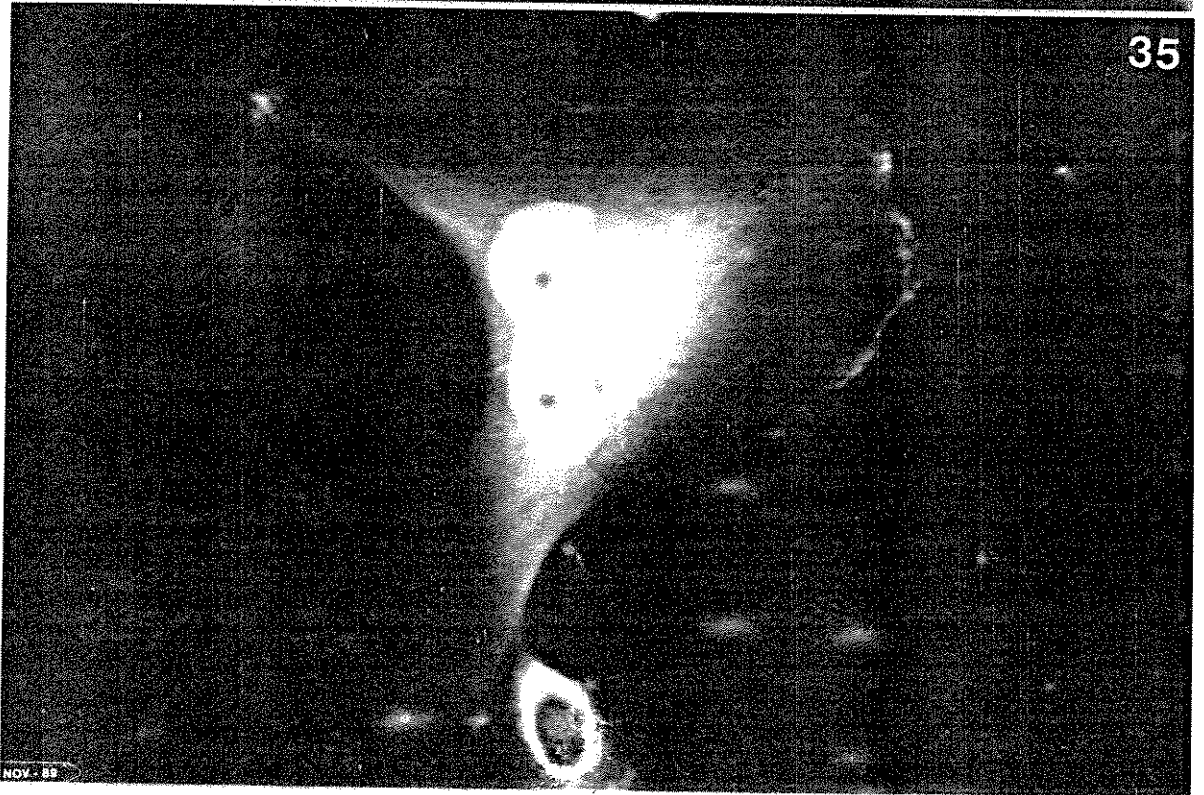
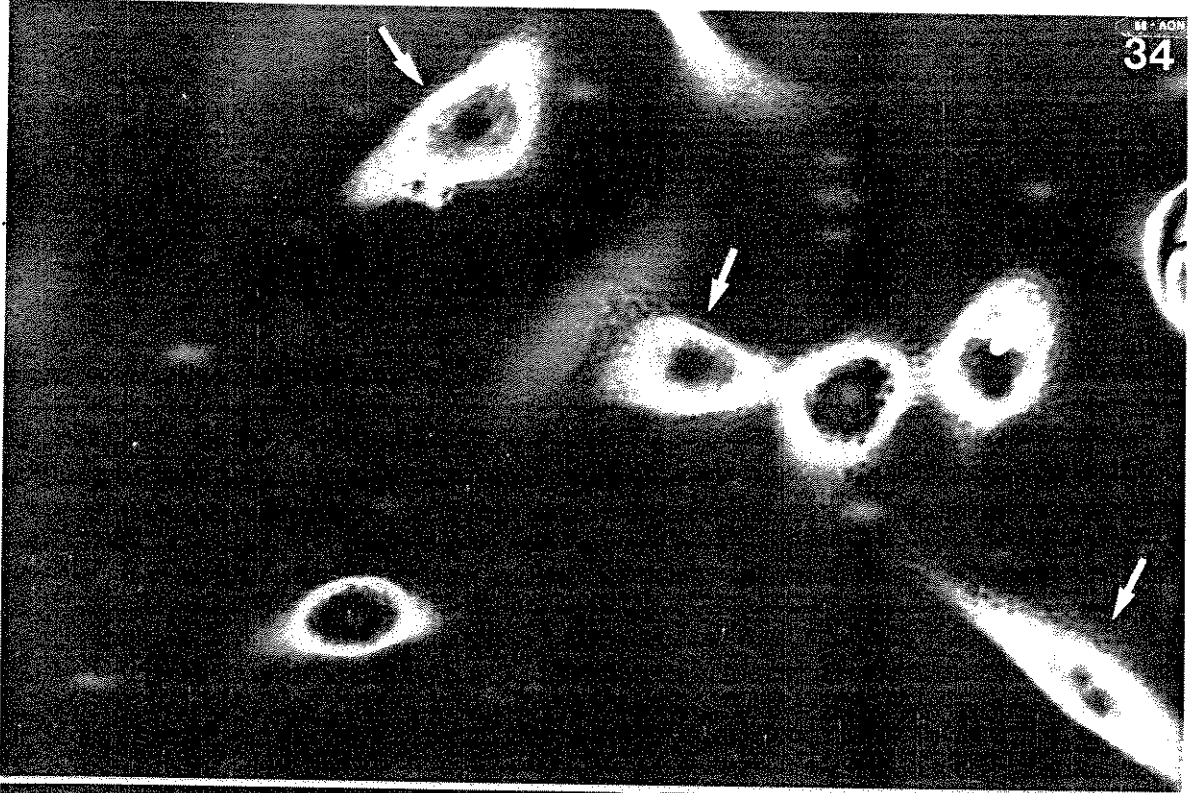




Nos preparados controle submetidos a tratamento com NaCl 2M houve uma alteração muito ligeira no padrão de cores de interferência, no sentido de seu deslocamento para o lado inferior da escala de Michel-Lévy (Figs. 32 e 33). Já no material submetido ao choque de 43 °C houve sugestão de alguma remoção de material nuclear que se apresentava sob a forma granular, dado o deslocamento de cor para o lado inferior da escala nessas estruturas (Fig. 34). Nas células retornadas à condição controle, as imagens de interferência após tratamento com NaCl 2M foram semelhantes às do material controle (Fig. 35).

Com respeito às células submetidas ao choque a 40 °C , o padrão de cores de interferência não foi muito diferente daquele da situação controle (Figs. 36 e 37). Células interfásicas submetidas a esse choque e retornadas à temperatura de 37 °C exibiram, no entanto, eventualmente, padrão de cores (Fig. 38) que se assemelhou ao das células submetidas ao choque a 43 °C (Figs. 27 - 29).





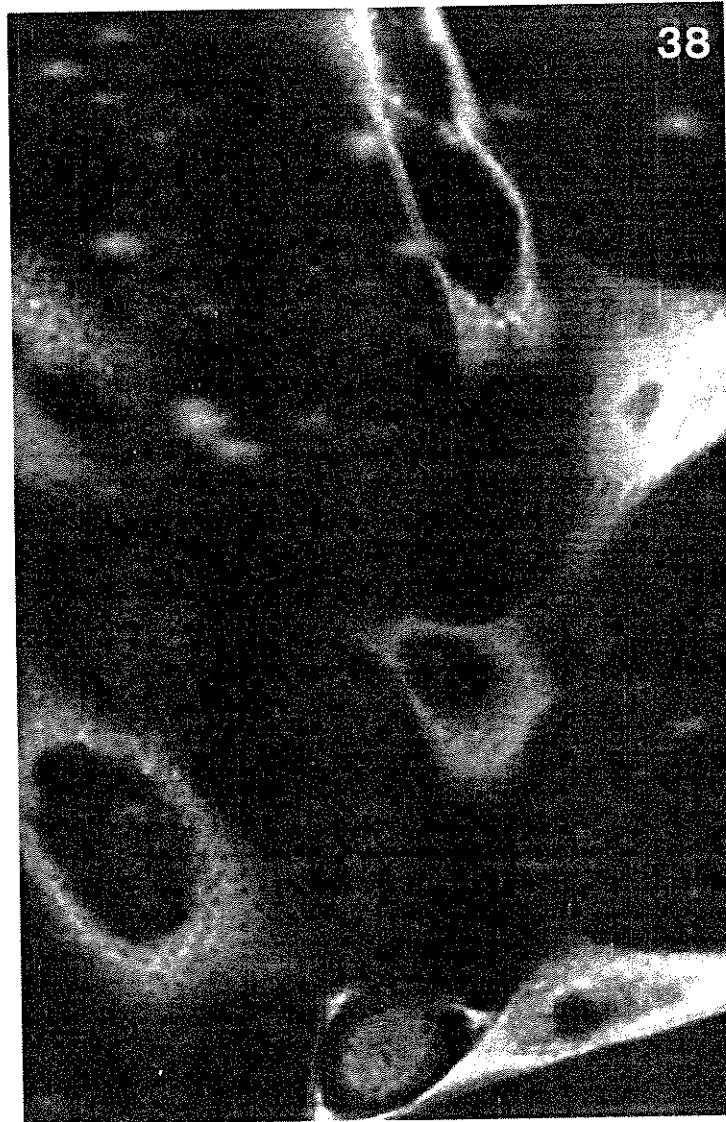


Fig. 38 - Imagens de interferência de células HeLa submetidas ao choque de 40 °C e observadas 4 horas após retorno à temperatura de 37 °C . Franja preta em seu máximo de abertura. 1000x

4 DISCUSSÃO

4.1 Fenótipos Celulares e Metacromasia

A diversidade em fenótipos celulares presentes na cultura de células HeLa não somente nas situações experimentais, mas também nas situações controle deste trabalho encontra apoio numa série de referências da literatura. Têm sido relatadas mudanças na forma dessas células como resultado de condições experimentais da cultura, mas é também dado ênfase à sua diversidade morfológica mesmo em situação controle (ROSE, 1954 e 1957; PIPKIN & MACK, 1958; WODDLIFF, 1958 a e b; ROSE, 1960).

Segundo Rose (1962) as células HeLa apresentam formas epiteliais (representadas por células arredondadas, células triangulares, e ocasionalmente por grandes células multinucleadas); formas fibroblastóides (como células alongadas, fusiformes, “estreladas” e poligonais); formas gigantes (com 1 ou mais núcleos) e formas dendríticas (com aspecto semelhante ao de uma célula nervosa). Estes mesmos fenótipos celulares, à exceção das formas dendríticas, foram encontrados no presente trabalho.

As projeções citoplasmáticas que se desprendem das células, como pôde ser claramente visto nas Figs. 7 a 9, estão presentes em grande quantidade nas células submetidas ao choque. Este “borbulhamento de membrana” foi relatado como uma das respostas celulares ao estresse térmico mais precocemente detectada (BORRELLI et alii, 1986).

Já as características de metacromasia exibidas pelas células HeLa, coradas com azul de toluidina a pH 4.0, submetidas ao choque térmico, indicam que nesta situação passam a existir, ao redor do núcleo componentes não reativos ao método. Considerando-se os dados ultraestruturais de WELCH & SUHAN (1985) para fibroblastos de embrião de rato submetidos à hipertermia em que se tornavam evidentes o colapso e a agregação de filamentos intermediários ao redor do núcleo, é de se supor que o material citoplasmático perinuclear não reativo ao azul de toluidina nas células HeLa submetidas ao choque seja de caráter protéico.

A nítida metacromasia citoplasmática abolida com RNase e principalmente localizada nas proximidades do plasmalema denota a presença de RNA aí concentrado.

4.2 Índice mitótico, número de núcleos e nucléolos e micronucleação

A investigação da atividade citotóxica ou cicloativa (isto é, da atuação de agentes causadores da diminuição ou atraso da proliferação ou a morte celular, modificando o funcionamento do aparelho mitótico ou deprimindo a síntese de macromoléculas essenciais à vida celular) pode ser feita avaliando-se a taxa de proliferação celular pelo parâmetro do índice mitótico (I.M.). Os critérios para a estimativa do I.M. têm variado, sendo utilizadas: (1) a frequência de células em metáfase, (2) a frequência de células que apresentam cromossomos como filamentos identificáveis, o que já ocorre a partir da prófase mediana ou (3) a taxa de síntese de DNA e de proteínas, através da proporção de células em G1, S e G2 + M, com base em estimativa de quantidade de DNA (VARELLA-GARCIA, 1987).

O critério utilizado na execução deste trabalho foi o (2), e seus resultados permitiram verificar uma diminuição do I.M. em células submetidas ao choque térmico quando comparadas aos respectivos controles. Essa diminuição pode ser atribuída às alterações nos padrões de transcrição gênica, a qual estaria voltada para síntese das *hsp*, resultando em uma repressão da síntese de proteínas normais necessárias para a ocorrência da divisão celular (ARRIGO & WELCH, 1987). Por outro lado, a diferença de valores do I.M. entre as situações controle está justificada considerando-se os diferentes tempos de cultivo dessas células.

Quanto aos dados referentes ao número de núcleos por célula e número de nucléolos por núcleo nas várias situações consideradas, não se observaram diferenças profundas, através de uma análise puramente descritiva. A decisão por uma análise descritiva para esses dados foi tomada a conselho da assessoria em estatística, que se baseou na grande variabilidade da amostra, a qual diminuiu a possibilidade de aplicação de um teste estatístico eficaz.

A presença de multinucleação tem sido relacionada a baixo potencial clonogênico, e parece aumentar sob ação do choque de temperatura, além de ser acompanhada pela presença de núcleos de tamanhos reduzidos (VIDAIR & DEWEY, 1988), entretanto este aumento não foi verificado neste estudo.

Com respeito aos dados de micronucleação, deve ser lembrado serem estes disponíveis para a avaliação da atividade clastogênica e/ou aneugênica dos xenobióticos (VARELLA-GARCIA, 1987). Os micronúcleos são núcleos pequenos localizados em meio ao citoplasma ou até fora deste, originados de fragmentos acêntricos, de cromossomos dicêntricos ou em forma de anel, ou de cromossomos inteiros que

não são capazes de participar normalmente do movimento anafásico da divisão celular. Podem se originar também de processos necróticos, neste caso se apresentando picnóticos. Em qualquer um dos casos a avaliação é feita estimando-se a proporção de micronúcleos em relação ao total de núcleos analisados e pode ser aplicada a praticamente qualquer população de células que esteja em divisão.

Os resultados deste trabalho revelam um aumento na micronucleação em células HeLa submetidas ao choque à temperatura mais drástica (43 °C) embora os dados tenham sido considerados do ponto de vista de uma análise descritiva.

Pode-se assim concluir que com o choque à temperatura mais elevada a quantidade de aberrações cromossômicas e/ou a incapacidade de algumas células sobreviverem nas condições de cultura tenha aumentado.

4.3 Tamanhos nucleares e nucleolares

No presente trabalho, ao nível dos testes estatísticos utilizados, não foram registradas diferenças significativas entre os valores de áreas nucleares nas diversas situações experimentais no que se refere ao choque de temperatura a 40 °C, com exceção de diferenças entre os grupos controle (C1 e C2) e entre os grupos tratados (HS1 e HS2). Isso encontra possível justificativa no fato destes grupos possuírem diferentes tempos de cultivo. Os dados concordam ainda com constatações da literatura em que a elevação de temperatura até 41 °C é considerada moderada, não induzindo alterações pronunciadas em células HeLa (HEINE et alii, 1971).

No entanto, para alguns poucos núcleos mononucleolados da amostra estudada, uma análise descritiva sugere que o choque à temperatura de 40 °C produzia uma retração no tamanho nuclear. Em contrapartida, numa situação de “recuperação”, alguns núcleos mono e binucleolados teriam tendência a um aumento de área. No primeiro caso (HS1) possivelmente tivessem sido considerados alguns núcleos com um ligeiro decréscimo em síntese de RNA ou com perda de porções cromossômicas (micronucleação). No segundo caso (HS2), se eventualmente estiverem presentes proteínas de matriz induzidas por choque (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981; WHEELER & WARTERS, 1982; WARTERS & STONE, 1984; LITTLEWOOD et alii, 1987) originadas, porém, tardiamente após tal tratamento, ocorreria um aumento no tamanho nuclear.

Dados de imagens de interferência discutidos mais para a frente são sugestivos de que essas proteínas possam estar presentes nos núcleos mais tardiamente após o choque, no caso do mesmo ter sido efetuado à temperatura de 40 °C.

Quanto aos dados referentes ao choque à temperatura de 43 °C , houve alteração na distribuição dos valores de áreas nucleares após o choque em relação ao controle C1-1* (17h / 37 °C), podendo-se atribuir este fato à hipertermia, visto se dar num sentido diferente daquele assumido por esse controle após 1 hora de cultivo em relação à C1*. Esta alteração num sentido de diminuição de área para parte da população nuclear considerada, após o choque, foi demonstrada por análise descritiva, mas os testes estatísticos não consideram significativa esta diferença. Aqui a hipótese de perda de porções cromossômicas ao lado de decréscimo em síntese de RNA encontra maior apoio, não só da literatura (HEINE et alii, 1971), mas também do fato de ter sido constatada nesta situação maior porcentagem de micronúcleos nas preparações.

No que se refere aos nucléolos, confirmou-se a constatação de que o número, a forma e o tamanho dos mesmos em células HeLa é altamente variável (HEINE et alii, 1971). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores de suas áreas em células submetidas ao choque e seus controles para nenhuma das temperaturas experimentais, o que estaria de certa forma de acordo com os achados ultraestruturais de Heine e colaboradores (1971), segundo os quais a forma nucleolar irregular das células HeLa não sofre alteração mesmo quando as células são submetidas à temperatura de 43 °C por 3 horas.

No entanto há um aumento de área nucleolar com o tempo de cultivo, possivelmente devido a uma atividade transcritiva mais intensa no nucléolo. Além disso constatou-se um aumento altamente significativo na área nucleolar na situação de "recuperação" comparada ao respectivo controle e ao próprio choque, quando este foi efetuado à temperatura de 43 °C . Isto é sugestivo de um significativo aumento de atividade transcritiva pós-choque, visando recuperação das atividades normais celulares (McCORMICK & PENMAN, 1968).

Com relação às análises de correlação entre dados de área nuclear e nucleolar deste trabalho, são necessárias algumas considerações iniciais. Um fator fundamental no estudo de variáveis é sua análise simultânea, com a finalidade de averiguar se existe alguma correlação significativa entre elas, ou de investigar a possibilidade de se fazer previsões a respeito dos valores de uma das variáveis correlacionadas, com base no conhecimento dos valores das outras. A determinação de correlação significativa demonstra a existência de interdependência entre duas ou mais variáveis, e o fato da correlação ser positiva ou direta indica que o valor de uma variável aumentará ou diminuirá conforme o da outra sofra aumento ou diminuição, isto é, as variações ocorrem no mesmo sentido.

Os resultados aqui obtidos apontam a existência de correlação significativa direta entre os valores de áreas nucleares e nucleolares em todas as situações experimentais estudadas. Quando se comparou o grau de interdependência entre os valores de áreas observaram-se diferenças significativas entre choque e controle, ou seja, existe uma probabilidade de 95 % de que as diferenças existentes não sejam devidas ao acaso na temperatura de 40 °C e de 99 % na temperatura de 43 °C . Portanto, embora os valores de áreas nucleares variem no mesmo sentido que os valores de áreas nucleolares em ambos os casos, eles o fazem em graus diferentes.

No caso do choque a 40 °C , haveria nos núcleos maiores um ligeiro aumento de área nucleolar, acima do esperado com base no respectivo controle. Já no caso do choque a 43 °C , as áreas nucleares maiores não estariam sendo acompanhadas por áreas nucleolares compatíveis ao tamanho nuclear, tendo-se por base seu respectivo controle. Em outras palavras, sob a temperatura mais elevada, a participação de outro elemento, além dos nucléolos, seria responsável pelos valores mais elevados de áreas nucleares. Tal elemento seria provavelmente representado pelas proteínas armazenadas nos núcleos, ao redor dos nucléolos e constituindo o carioesqueleto, em condição de choque hipertérmico, como propõem Littlewood e colaboradores (1987).

Também foram demonstradas diferenças significativas entre o choque e a recuperação, nas duas condições de temperatura estudadas, embora relativamente ao controle, a interdependência das variáveis na recuperação seja diferente apenas quanto a um dos parâmetros considerados (altura ou ângulo da reta de regressão). Isto, porque na recuperação após o choque a 40 °C as áreas nucleolares de núcleos de mesmo tamanho que o controle não atingiam valores compatíveis aos deste, enquanto na recuperação após choque a 43 °C o fenômeno contrário acontecia nos núcleos de maior tamanho. Possivelmente tais achados se devam a que a recuperação de atividades nucleolares pós-choque tenha se processado mais lentamente para todos os núcleos, no caso do choque ter sido realizado a 40 °C .

4.4 Imagens de Interferência

Os resultados obtidos com a microscopia de interferência, dado o salto de cores para padrões superiores na escala de Michel-Lévy, na maioria das células submetidas ao choque a 43 °C , indicam aumento de massa seca na sua região nuclear e perinuclear. Tais achados encontram suporte nas observações para alguns outros materiais de que, com o choque hipertérmico seriam produzidas proteínas que no interior dos núcleos se apresentariam com alto grau de agregação e de estabili-

dade frente a extrações salinas (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981; WHEELER & WARTERS, 1982; WARTERS & STONE, 1984; LITTLEWOOD et alii, 1987; McCONNELL et alii, 1987). Também estariam de acordo com a constatação de que filamentos intermediários se agregariam ao redor dos núcleos nessas condições de estresse (WELCH & SUHAN, 1985). Por outro lado, ainda, concordariam com os achados de resposta negativa à coloração com azul de toluidina a pH 4.0 ao redor dos núcleos, e com os dados morfométricos para núcleos e nucléolos, discutidos acima.

Também com base nos padrões de cores de interferência pode-se pressupor que, na situação de recuperação após o choque a 43 °C, o padrão de distribuição de massa seca retorne ao da condição controle, o que estaria em conformidade com a literatura e os dados morfométricos para o mesmo material.

O tratamento com NaCl 2M, afetando ligeiramente as imagens de interferência das células submetidas a hipertermia, ajusta-se aos dados sobre a natureza dos agregados protéicos que surgem nos núcleos com o choque hipertérmico (LEVINGER & VARSHAVSKY, 1981; LITTLEWOOD et alii, 1987; McCONNELL et alii, 1987).

Já na situação do choque à temperatura de 40 °C, alterações nas imagens de interferência ocorreram apenas em parte da população celular na situação de recuperação, comparada à do controle e à do próprio choque. Este fato, aliado a que as imagens alteradas eram semelhantes às das células submetidas ao choque na temperatura mais elevada, levam à suposição de que alterações no sentido do aparecimento de novos complexos protéicos, com diferente estado de agregação, poderiam ocorrer mais tardiamente quando a temperatura do choque fosse de 40 °C. Dados cariométricos para a mesma situação são condizentes com essa hipótese.

Os valores de área nuclear variam de acordo com a quantidade e com o estado de agregação do material contido no núcleo. Eventuais alterações podem ser detectadas através das imagens interferométricas, devido a existência de uma relação direta entre a concentração e o índice de refração de um dado material. As metodologias corroboram entre si, podendo ser consideradas complementares, embora a ocorrência de dados diretamente correlacionados não seja obrigatória.

5 CONCLUSÕES

1. As células HeLa apresentam diversidade morfológica, tanto em situações controle quanto nas de hipertermia a 40 °C e 43 °C .
2. A ocorrência de projeções citoplasmáticas e seu desprendimento das células se intensifica sob ação do choque térmico, em função da temperatura empregada.
3. O choque térmico altera a basofilia de células HeLa coradas com azul de toluidina a pH 4.0 ao nível citoplasmático. A presença, ao redor do núcleo, de componentes não reativos ao método, certamente protéicos, se reflete através da não disponibilidade de radicais aniônicos neste local.
4. A diminuição do índice mitótico em células submetidas ao choque térmico aponta este estresse como um agente citotóxico, de ação não reversível dentro do tempo experimental utilizado.
5. Não ocorrem alterações no número de núcleos por célula e de nucléolos por núcleo nas situações consideradas. Já o aumento na micronucleação em células submetidas ao choque térmico drástico (43 °C) reflete uma elevação na quantidade de aberrações cromossômicas e/ou incapacidade de sobrevivência de algumas células nas condições da cultura.
6. Não são registradas diferenças estatisticamente significativas entre os valores de áreas nucleares com o choque, mas a retração do tamanho nuclear observada em alguns casos pode indicar decréscimo na síntese de RNA ou perda de porções cromossômicas, e o aumento da área observado na “recuperação” pode ser resultado da presença de proteínas de matriz nuclear originadas tardiamente pelo choque.
7. Não ocorrem diferenças significativas entre os valores de áreas nucleolares em nenhuma das temperaturas experimentais, exceto no caso da recuperação ao choque a 43 °C , sugerindo um aumento de atividade transcritiva pós-choque que possibilitaria a recuperação de condições celulares normais.
8. O grau de interdependência entre os valores de áreas nucleares e nucleolares das células submetidas aos choques comparadas aos seus controles difere significativamente.

9. Ocorrem mudanças na distribuição de massa seca nuclear e perinuclear em células HeLa submetidas a choque térmico em função da temperatura do choque. O choque à temperatura moderada (40 °C) parece resultar em uma resposta tardia em relação àquela observada em temperatura mais drástica (43 °C).
10. Células submetidas ao choque hipertérmico a 43 °C recuperam seus padrões de distribuição de massa seca quando retornadas às condições controle por 4h. Dada a aparente demora em resposta ao choque em algumas das células submetidas ao tratamento a 40 °C, supõe-se que sua recuperação seja também posterior.
11. Admite-se que agregados protéicos, parte dos quais sensível ao tratamento com NaCl 2M mesmo em células fixadas em formol, sejam responsáveis pela elevação de massa seca com o choque hipertérmico.

6 RESUMO

Células HeLa, mantidas por 16 horas a 37 °C e submetidas a choque de temperatura de 40 °C e 43 °C por 1 hora, foram estudadas comparativamente quanto ao fenótipo celular; propriedades de basofilia; número e tamanho nuclear e nucleolar; valores de índice mitótico; micronucleação; e padrão de distribuição de massa seca, este último antes e após tratamento com solução salina concentrada. Estas características foram também investigadas em culturas que retornaram às condições controle, por 4 horas após a hipertermia (recuperação).

Ao lado de diversidade morfológica observável mesmo nas células em situação controle, foram detectadas projeções citoplasmáticas se desprendendo das células submetidas ao estresse térmico. As características de metacromasia exibidas pelas células indicaram que, sob choque de temperatura, passam a existir ao redor do núcleo componentes não reativos ao método de coloração com azul de toluidina a pH 4.0, certamente de caráter protéico.

Os valores de índice mitótico diminuíram quando comparados com seus respectivos controles. Os números de núcleos por célula e de nucléolos por núcleo não apresentaram diferenças relevantes. Os resultados revelaram um aumento na micronucleação indicando ser a hipertermia drástica (43 °C) um agente causador de aberrações cromossômicas e/ou incapacidade de sobrevivência de algumas células.

As diferenças entre os valores de áreas nucleares não foram significativas, mas pôde-se observar sob ação do choque alguns casos de retração do tamanho nuclear, indicativos possivelmente de decréscimo na síntese de RNA ou perda de porções cromossômicas, e na recuperação um aumento da área nuclear representado por proteínas originadas tardiamente.

O aumento da área nucleolar registrado na condição de recuperação do choque à temperatura de 43 °C sugere um aumento da atividade transcritiva, possibilitando provavelmente o retorno às atividades celulares normais.

A análise de imagens de interferência demonstrou mudanças na distribuição de massa seca nuclear sendo mais imediatas e mais freqüentes as alterações quando o choque se processou a 43 °C. Estas alterações refletem aumento de massa provavelmente de agregados protéicos, parte dos quais é sensível à remoção com NaCl 2M mesmo após fixação com formol.

Os padrões de massa seca normais foram recuperados quando as células submetidas ao choque a 43 °C retornaram às condições controle por 4h. Dada a aparente demora em resposta ao choque em algumas das células submetidas ao trata-

mento a 40 °C , supõe-se que sua recuperação deva ocorrer após as 4 horas de cultivo a 37 °C .

7 SUMMARY

HeLa cells, held at 37 °C for 16 hours and subsequently submitted to heat shock at 40 °C and 43 °C for 1 hour, were studied comparatively with respect to cellular phenotypes, basophilia properties, nuclear and nucleolar number and sizes, mitotic index values, micronucleation and dry mass distribution patterns both before and after treatment with a concentrated saline solution. These characteristics were also investigated in cultures which had been returned to the control conditions for 4 hours after the hyperthermic treatment (recovery).

In addition to the morphological diversification, which could be observed even in the control situation, cytoplasmic projections were detected separating from the cells which had been submitted to thermal stress. The characteristics of metachromasy shown by the cells indicated that during thermal shock components which were not stained by toluidine blue at pH 4.0, appeared around the nucleus. These were certainly of a proteic nature.

The mitotic index values diminished when compared to their respective controls. The numbers of nuclei per cell and nucleoli per nucleus showed no relevant differences. The results revealed an increase in micronucleation indicating that drastic hyperthermal treatment (43 °C) be an agent causing chromosome aberrations and/or loss of the survival capacity of some cells.

No significant difference between the nuclear areas was detected, although some cases of nuclear shrinkage under shock were observed, possibly indicating a decrease in RNA synthesis or loss of some chromosome portions, and during recovery an increase in nuclear area due to late produced proteins.

The increase in nucleolar area registered during recovery from the thermal shock at 43 °C suggested an increase in transcriptional activity probably allowing for the return to normal cellular activities.

An analysis of the interference images showed changes in the nuclear dry mass distribution, the alterations being more immediate and more frequent when the shock occurred at 43 °C . These alterations reflected an increase in mass probably due to proteic aggregates, part of which were sensitive to removal with 2M NaCl even after fixing with formol.

The normal dry mass patterns were recovered when cells submitted to shock at 43 °C were returned to their control conditions for 4 hours. Considering the apparent delay in the reaction to the shock in some of the cells submitted to treatment at 40 °C , it was supposed that their recovery should occur after the 4

hours of cultivation at 37 °C .

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANHANTAN, J.; GOLDBERG, A.L. & VOELLMY, R. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat-shock genes. *Science* **232**: 522-24, 1986.
- ARRIGO, A.P. & WELCH, W.J. Characterization and purification of the small 28.00 dalton mammalian heat shock protein. *J. Biol. Chem.*, **262**(32): 15359-69, 1987
- ASHBURNER, M. Function and structure of polytene chromosomes during insect development. *Adv. Insect Physiol.*, **7**: 1-95, 1970.
- ATKINSON, B.G. Synthesis of heat-shock proteins by cells undergoing myogenesis. *J Cell Biol.*, **89**: 666-73, 1981.
- ATKINSON, B.G.; CUNNINGHAM, T.; DEAN, R.L. & SOMERVILLE, M. Comparison of the effects of heat-shock and metal-ion stress on gene expression in cells undergoing myogenesis. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **61**: 404-13, 1983.
- ATKINSON, B.G.; DEAN, R.L. & BLAKER, T.W. Heat shock induced changes in the gene expression of terminally differentiating avian red blood cells. *Can. J. Genet Cytol.*, **28**: 1053-63, 1986.
- AUJAME, L. Murine plasmocytomas constitute a class of natural heat-variants in which the major inducible hsp-68 gene is not expressed. *Can. J. Genet. Cytol.*, **28**: 1064-75, 1986.
- AUJAME, L. The major heat-shock protein hsp 68 is not induced by stress in mouse erythroleukemia cell lines. *Biochem. Cell Biol.*, **66**: 691-701, 1988.
- BAKER, D.G.; SAGER, H.; CONSTABLE, W. & GOODCHILD, N. The response of previously irradiated skin to combinations of fractionated X radiation, hyperthermia and cis-Diamminedichloroplatinum. *Radiat. Res.*, **98**: 176-81, 1984.

- BAKER, D.G.; CONSTABLE, W.C. & SAGER, H. The effect of hyperthermia on radiation-induced carcinogenesis. *Radiat. Res.*, **115**: 448-60, 1988.
- BARBE, M.F.; TYTELL, M.; GOWER, D.J. & WELCH, W.J. Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science*, **241**: 1817-20, 1988.
- BASZCZYNSKI, C.L. Immunochemical analysis of heat-shock protein synthesis in maize (*Zea mays* L.). *Can. J. Genet. Cytol.*, **28**: 1076- 87, 1986.
- BASZCZYNSKI, C.L.; WALDEN, D.B. & ATKINSON, B.G. Regulation of gene expression in corn (*Zea mays* L.) by heat shock. *Can. J. Biochem.*, **60**(5): 569-79, 1982.
- BECKMANN, R.; MIZZEN, L. & WELCH, W.J. Interaction of hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science*, **248**: 850-4, 1990.
- BERENDES, H.D. Factors involved in the expression of gene activity in polytene chromosomes. *Chromosoma*, **24**: 418- 37, 1968.
- BONATO, M.C.M. & JULIANI, M.H. Choque hipertérmico. *Ciê. Hoje*, **6**:55-60, 1987.
- BORRELLI, M.J.; WONG, R.S.L. & DEWEY, W.C. A direct correlation between hyperthermia-induced membrane blebbing and survival in synchronous G1 CHO cells. *J. Cell. Physiol.*, **126**: 181-90, 1986.
- BURRELS, W. *Microscope Technique*, New York, Halsted, 1961, 574p.
- CELIS, J.E.; LAURIDSEN, J.B. & BASSE, B. Cell cycle-associated change in the expression of the proliferation-sensitive and heat-shock protein hsp70 (IEF14): Increase in synthesis during mitosis. *Exp. Cell Res.*, **177**: 176-85, 1988.
- CERVERA, J. Effects of thermic shock on HEP-2 cells. An ultrastructural and high resolution autoradiographic study. *J. Ultrastruct. Res.*, **63**(1): 51-63, 1978.

- COLE, A. & ARMOUR, E.P. Ultrastructural study of mitochondrial damage in CHO cells exposed to hyperthermia. *Radiat. Res.*, **115**: 421-35, 1988.
- COLLIER, N.C.; HEUSER, J.; LEVY, M.A. & SCHLESINGER, M.J. Ultrastructure and biochemical analysis of the stress granule in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **106**: 1131-39, 1988.
- CURLE, C.A. & KAPOOR, M. Expression of heat shock genes of *Neurospora crassa* effect of hyperthermia and other stresses on mRNA levels. *Biochem. Cell Biol.* **66**: 81-92, 1988.
- DANTAS, M.M.; MELLO, M.L.S.; RODRIGUES, V.L.C.C. & FERRAZ FILHO, A.N. Fenótipos nucleares em células de *Triatoma infestans* após choque hipotérmico. *Ciênc. Cult. São Paulo*, **41** (7 suppl.): 726, 1989.
- DANTAS, M.M. & MELLO, M.L.S. Heat shock-induced change in chromatin protamin binding. In: Congresso da Associação Panamericana das Sociedades de Bioquímica 6, São Paulo, 1990. *Abstracts and Program* p. 188.
- DE BENEDETTI, A. & BAGLIONI, C. Ativation of Hemin-regulated initiation factor-kinase in heat-shocked HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **261**(1): 338-42, 1986.
- DE BENEDETTI, A. & BAGLIONI, C. Translational regulation of the synthesis of major heat shock protein in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, **261**(33): 15800-4, 1986.
- DEWEY, W.C.; HOPWOOD, L.E.; SAPARETO, S.A. & GERWECK, L.E. Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology*, **123**: 463-74, 1977.
- DIAS, M.; PAVAN, C. & BASILE, R. Effects of a virus and microsporidian infection in chromosomes of various tissues of *Rhynchosciara angela*. *Revta. bras. Biol.* **29**: 191-206, 1969.
- DICKSON, J.A. & SHAH, D.M. The effects of hyperthermia (42 °C) on the biochemistry and growth of a malignant cell line. *Eur. J. Cancer*, **8**: 561-71, 1972.

- DUBAND, J.L.; LETTRE, F.; ARRIGO, A.P. & TANGUAY, R.M. Expression and localization of hsp-23 in unstressed and heat-shocked *Drosophila* cultured cells. **Can. J. Genet. Cytol.**, **28**: 1088-92, 1986.
- EARNSHAW, W.C. & LAEMMLI, U.K. Architecture of metaphase chromosomes and chromosome scaffolds. **J. Cell Biol.**, **96**(1): 84-93, 1983.
- FAJARDO, L.F.; PRIONAS, S.D.; KOWALSKI, J. & KWAN, H.H. Hyperthermia inhibits angiogenesis. **Radiat. Res.**, **114**: 297-306, 1988.
- FLYNN, G. C.; CHAPPELL, T.G. & ROTHMAN, J.E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. **Science**, **245**(4916): 385-90, 1989.
- FOX, M.H.; READ, R.A. & BEDFORD, J.S. The cell cycle dependence of thermotolerance III. HeLa cells heated at 45.0 °C. **Radiat. Res.**, **104**: 429-42, 1985.
- FRANCIS, D. & LIN, L. Heat shock response in a cellular slime mold, *Polysphondylium pallidum*. **Dev. Biol.**, **79**: 238-42, 1980.
- GEY, G.O.; COFFMAN, W.D. & KUBICEK, M.T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, **12**: 264-65, 1952.
- HADLACZKY, G.; SUMNER, A.T. & ROSS, A. Protein-depleted chromosomes II. Experiments concerning the reality of chromosome scaffolds. **Chromosoma (Berl.)**, **81**: 557-67, 1981.
- HAMMOND, G.L.; LAI, Y-K & MARKERT, C.L. Diverse forms of stress lead to new patterns of gene expression through a common and essential metabolic pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **79**(11): 3485-88, 1982.
- HAUSER, L. & LEVY-WILSON, B. Kinetic changes in protein synthesis in response to a sublethal heat-shock in starved *Tetrahymena thermophila*. **J. Biol. Chem.**, **256**(8): 3612-14, 1981.

- HEINE, U.; SVERAK, L.; KONDRATICK, J. & BONAR, R.A. The behavior of HeLa-S cells under the influence of supranormal temperatures. **J. Ultrastruc. Res.**, **34**: 375-96, 1971.
- JOHNSTON, D.; OPPERMAN, H.; JACKSON, J. & LEVINSON, W. Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite. **J. Biol. Chem.**, **255**(14): 6975-80, 1980.
- JORRITSMA, J.B.M. & KONINGS, W.T. The occurrence of DNA strand breaks after hyperthermic treatments of mammalian cells with and without radiation. **Radiat Res.**, **98**: 198-208, 1984.
- KAMPINGA, H.H.; WRIGHT, W.D.; KONINGS, W.T. & ROTI, J.L.R. The interaction of heat and radiation affecting the ability of nuclear DNA to undergo supercoiling changes. **Radiat. Res.**, **116**: 144-23, 1988.
- KELLEY, P.M. & SCHLESINGER, M.J. The effect of heat-shock and amino acid analogues on gene expression in chicken embryo fibroblasts. **Cell**, **15**: 1277-86, 1978.
- KEY, J.L.; LIN, C.Y. & CHEN, Y.M. Heat shock proteins of higher plants. **Proc Natl. Acad. Sci. USA.**, **78**(6): 3526-30, 1981.
- KOTHARY, R.K. & CANDIDO, E.P.M. Induction of a novel set of polypeptides by heat shock or sodium arsenite in cultured cells of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. **Can J. Biochem.**, **60**(3): 347-55, 1982.
- LEENDERS, H.J. & BERENDES, H.D. The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in *Drosophila* I: the induction of gene activity. **Chromosome** **37**: 433-44, 1972.
- LEVINGER, L. & VARSHVSKY, A. Heat-shock proteins of *Drosophila* are associated with nuclease-resistant, high-salt-resistant nuclear structures. **J. Cell Biol.**, **90**(3): 793-6, 1981.
- LINDQUIST, S. Varying patterns of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock: implications for regulation. **Dev. Biol.**, **77**(2): 463-79, 1980.

- LINDQUIST, S. The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 1151-91, 1986
- LING, C.C. & ROBINSON, E. Moderate hyperthermia and low dose rate irradiation. *Radiat. Res.*, **114**: 379-84, 1988.
- LISON, L. *Histochimie et Cytochimie Animales Principes et Méthodes*. Paris: Gauthier - Villars, 1960, v.1.
- LITTLEWOOD, T.D.; HANCOCK, D.C. & EVAN, G.I. Characterization of a heat shock-induced insoluble complex in the nuclei of cells. *J. Cell Sci.*, **88**(1): 65-72, 1987.
- LOOMIS, W.F. & WHELLER, S. Heat shock response of *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **79**(2): 399-408, 1980.
- LUNEC, J.; HESSLEWOOD, I.P.; PARKER, R. & LEAPER, S. Hyperthermic enhancement of radiation cell killing in HeLa S3 cells and its effect on the production and repair of DNA strand breaks. *Radiat. Res.*, **85**: 116-25, 1981.
- McALISTER, L. & FINKELSTEIN, D.B. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**(3): 819-24, 1980.
- McCONNELL, M.; WHALEN, A.M.; SMITH, D.E. & FISHER, P.A. Heat shock-induced changes in the structural stability of proteinaceous karyoskeletal elements *in vitro* and morphological effects *in situ*. *J. Cell Biol.*, **105**(3): 1087-98, 1987.
- McCORMICK, W. & PENMAN, S. Regulation of protein synthesis in HeLa cells: translation at elevated temperatures. *J. Mol. Biol.*, **39**: 315-33, 1969.
- MELLO, M.L.S. Estudo citoquímico e citofísico quantitativo de algumas hetero- e eucromatinas. Tese (Livre Docência) Campinas, 1976. 205p. UNICAMP, Instituto de Biologia.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, **74**: 387-92, 1982.

- MELLO, M.L.S. Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. **Histochem. J.**, **15**: 739-51, 1983.
- MELLO, M.L.S. & CORDEIRO, J.A. Changes in fast green-histone amounts with NaCl and HCl treatments in the salivary glands of *Bradysia spatiatrum*. **Cell. Mol. Biol.**, **31**(1): 17-25, 1985.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, *Staurorhectus longicornis* Gigliotoss. **Inv. Rep.**, **I**: 75-83, 1977.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciênc. Cult. São Paulo**, **30**(6): 665-76, 1978.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. **Práticas de Biologia Celular**, São Paulo, Edgar Blucher, 1980. 71p.
- MELLO, M.L.S.; RAYMUNDO, H.H. & PRETTI, M.C.M. Action of hycanthone methane sulfonate on chromatin basophilia and anisotropy in onion meristems. **Cytologia** **43**: 397-404, 1978.
- MINTON, K.W.; KARMIN, P.; HAHN, G.M. & MINTON, A.P. Nonspecific stabilization of stress-susceptible proteins by stress-resistant proteins: A model for the biological role of heat shock proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**: 7107-111, 1982.
- MIZZEN, L.A. & WELCH, W.J. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. **J. Cell Biol.**, **106**: 1105-116, 1988.
- MONDOVI, B.; ARGO, A.F.; ROTILIO, G.; STROM, R.; MORICCA, G. & FANELLI, A.R. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. I. Studies on nucleic acids and protein synthesis. **Eur. J. Cancer**, **5**: 137-46, 1969.
- NAGATA, K.; SAGA, S. & YAMADA, K.M. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. **J. Cell Biol.**, **103**: 223-29, 1986.

- ORNELLES, D.A. & PENMAN, S. Prompt heat shock and heat-shifted proteins associated with the nuclear matrix-intermediate filament scaffold in *Drosophila melanogaster* cells. **J. Cell Sci.**, **95**(3): 393-404, 1990.
- OVERGAARD, J. Ultrastructure of a murine mammary carcinoma exposed to hyperthermia *in vivo*. **Cancer Res.**, **36**: 983-88, 1976.
- PALKÓVITS, M. & FISHER, J. **Karyometric investigations**, Budapest, Akad. Kiadó 1968.
- PIPKIN, A.C. & MACK, A.D. A new tissue culture flask with demountable bottom. **Exp Cell Res.**, **14**: 219-21, 1958.
- PRIMMETT, D.R.N.; STERN, C.D. & KEYNES, R.J. Heat shock causes repeated segmental anomalies in the chick embryo. **Development**, **104**(2): 331-9, 1988.
- PUVION, E.; VIRON, A. & BERNHARD, W. Unusual accumulation of ribonucleoprotein constituents in nucleus of cultured rat liver cells after hypothermal shock. **Biol Cell.**, **29**: 81-8, 1977.
- RAAPHORST, G.P.; VADASZ, J.A. & AZZAM, E.I. Thermal sensitivity and radiosensitization in V79 cells after BrdUrd or IdUrd incorporation. **Radiat. Res.**, **98** 167-79, 1984.
- REITER, T. & PENMAN, S. "Prompt" heat shock proteins: translationally regulated synthesis of new proteins associated with the nuclear matrix-intermediate filament as an early response to heat shock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **80**: 4737-41 1983.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, **18**(12): 571-3, 1962.
- ROSE, G.G. A separable and multipurpose tissue culture chamber. **Texas Rep. Biol Med.**, **12**: 1074-83, 1954.
- ROSE, G.G. Special uses of the multipurpose tissue culture chamber. **Texas Rep**

- Biol. Med.**, **15**: 310-12, 1957.
- ROSE, G.G. Evidence for an intercellular exchange of cytoplasmic components between associated cells in tissue culture. **Texas Rep. Biol. Med.**, **18**: 103-15, 1960.
- ROSE, G.G. The morphological diversity of Gey's strain HeLa after ten years in tissue culture. **Texas Rep. Biol. Med.**, **20**(3): 308-37, 1962.
- ROTI, J.L.R. & PAINTER, R.B. Effects of hyperthermia on the sedimentation of nucleoid from HeLa cells in sucrose gradients. **Radiat. Res.**, **89**: 166-75, 1982.
- ROTI, J.L.R.; HIGASHIKUBO, R. & MACE, M. Protein cross-migration during isolation of nuclei from mixtures of heated and unheated HeLa cells. **Radiat. Res.**, **98**: 107-14, 1984.
- ROTI, J.L.R.; UYGUR, N. & HIGASHIKUBO, R. Nuclear protein following heat shock. Protein removal kinetics and cell cycle rearrangements. **Radiat. Res.**, **107**: 250-61, 1986.
- RUDER, G.K.; OVSENEK, N.; HEIKKILA, J.J. & DOWNER, R.G.H. Examination of heat shock gene expression in nerve cord isolated from heat-stressed American cockroach, *Periplaneta americana*. **Biochem. Cell Biol.**, **67**(2-3): 168-72, 1989.
- SACKS, M.M. & FREELING, M. Selective synthesis of alcohol dehydrogenase during anaerobic treatment of maize. **Molec. gen. Genet.**, **161**(2): 111-15, 1978.
- SCHAMHART, D.H.J.; VAN WALRAVEN, H.S.; WIEGANT, F.A.C.; LINNEMANS W.A.M.; VAN RIJN, J.; VAN DEN BERG, J. & VAN WIJK, R. Thermotolerance in cultured hepatoma cells: cell viability, cell morphology, protein synthesis and heat-shock proteins. **Radiat. Res.**, **98**: 82-95, 1984.
- SCHLESINGER, M.J. Heat shock proteins. The search for functions. **J. Cell Biol.**, **103**: 321-25, 1986.
- SIMÕES, L.C.C.; AMABIS, J.M. & CESTARI, A.N. Puffs in the heterochromatin in chromosomes of *Rhynchosciara*. **Ciênc. Cult. S. Paulo**, **27**: 159-61, 1975.

- SIMÕES, L.C.C. & CESTARI, A.N. Cromossomos politênicos: sistemas experimentais *in vivo e in vitro*. *Ciênc. Cult.S. Paulo*, **34**: 480-85, 1982.
- SIMONI, I.C. & MELLO, M.L.S. Investigation of hycanthone binding to DNA in chromatin with different supra-organization, composition and function. *Acta histochem.*, **79**: 97-105, 1986.
- SOMERS, D.J.; CUMMINS, W.R. & FILION, W.G. Characterization of the heat-shock response in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Biochem. Cell Biol.* **S, 67**(2-3): 113-20, 1989.
- STROM, R.; SANTORO, A.S.; CRIFO, C.; BOZZI, A.; MONDOVI, B. & FANELLI, A.R. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. IV Inhibition of RNA synthesis. *Eur. J. Cancer*, **9**: 103-12, 1973.
- THOMAS, G.P.; WELCH, W.J.; MATHEWS, M.B. & FERAMISCO, J.R. Molecular and cellular effects of heat-shock and related treatments of mammalian tissue-culture cells. *Symp. Quant. Biol.*, **46**(2): 985-96, 1981.
- VAN RIJN, J.; VAN DEN BERG, J.; KIPP, J.B.A.; SCHAMHART, D.H.J. & VAN WIJK, R. Effect of hypothermia and X ray. *Radiat. Res.*, **101**: 292-305, 1985.
- VARELLA-GARCIA, M. *Apostila de Princípios Básicos de Genética Toxicológica* Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 1987 127 p.
- VIEIRA, S. *Uma introdução à Bioestatística*. Piracicaba, Fop. Unicamp 1980, 262 p.
- VIDAIR, C.A. & DEWEY, W.C. Two distinct models of hyperthermic cell death. *Radiat. Res.*, **116**: 157-71, 1988.
- VIDAL, B.C. Cromossomos politênicos: diferenças estruturais reveladas pela basofilia metacromática. *Ciênc. Cult. São Paulo*, **27**: 54-6, 1975.
- VIDAL, B.C. *Métodos em Biologia Celular*. In: VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro, Atheneu, 1987. p. 5-40.

- WALTON, M.I.; BLECHEN, N.M. & WORKMAN, P. Effects of localised tumour hyperthermia on pimonidazole (RO 03-8799) pharmacokinetics in mice. **Br. J. Cancer** **59**: 667-73, 1989.
- WARTERS, R.L. & STONE, O.L. The effects of hyperthermia on DNA replication in HeLa cells. **Radiat. Res.**, **93**: 71-84, 1983.
- WARTERS, R.L. & STONE, O.L. The sedimentation coefficient and buoyant density of nucleosomes from replicating chromatin in heated cells. **Radiat. Res.**, **98**: 354-61, 1984.
- WARTERS, R.L.; ROTI, J.L.R. & WINWARD, R.T. Nucleosome structure in chromatin from heated cells. **Radiat. Res.**, **84**: 504-13, 1980.
- WELCH, W.J. & SUHAN, J.P. Morphological study of the mammalian stress response. Characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleolus and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. **J. Cell. Biol.**, **101**: 1198-1211, 1985.
- WELCH, W.J. & MIZZEN, L.A. Characterization of the thermotolerant cell. II. Effect on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. **J. Cell. Biol.**, **106**: 1117-130, 1988.
- WHEELER, K.T. & WARTERS, R.L. Influence of heat on chromatin structure in HeLa nuclei. **Radiat. Res.**, **90**: 204-15, 1982.
- WOODLIFF, H.J. Glass substrate cultures of human blood and bone marrow cells. **Exp. Cell Res.**, **14**: 368-77, 1958.
- WOODLIFF, H.J. A further use of Rose's tissue culture chamber. **Texas Rep. Biol. Med.**, **16**: 380-84, 1954.
- YACOOB, R.K. & FILION, W.G. Temperature-stress response in maize: a comparison of several cultivars. **Can. J. Genet. Cytol.**, **28**: 1125-31, 1986.