

SELMA CANDELÁRIA GENARI

"ESTUDO DE UMA POPULAÇÃO CELULAR TRANSFORMADA
DERIVADA DA LINHAGEM VERO".

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada.

G285e

17660/BC

Campinas, 1993.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Selma Candelária

Genari

e aprovada pela Comissão Julgadora.

F. Wada
16/07/93

BC

17660
264/93

x
OR\$ 800,00
24/08/93

CM-00048072-8

"ESTUDO DE UMA POPULAÇÃO CELULAR TRANSFORMADA
DERIVADA DA LINHAGEM VERO".

Aos meus pais,

pelo amor e carinho que sempre

me dedicaram...

AGRADECIMENTOS:

A Profa. Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, pelo carinho e dedicação na orientação deste trabalho, pelo apoio e estímulo a minha vida profissional e sobretudo pela amizade e compreensão que tem me oferecido.

Ao German Alejandro Enriquez, pelo incentivo e pelo amor dedicados, os quais me animaram nos momentos de maior dificuldade.

A Profa. Dra. Mary Anne Heide Dolder, pela sua colaboração e auxílio na análise morfológica do material, nas fotografias das pranchas, assim como na redação do "summary" deste trabalho.

A Profa. Dra. Laurecir Gomes, pelo valioso auxílio e colaboração que possibilitaram a realização da análise eletroforética dos extratos celulares.

A Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel, não só pelas sugestões dadas, mas também pela maneira construtiva com que realizou a crítica deste trabalho.

A Profa. Dra. Regina de Castro Bicudo Pisani, pelas valiosas sugestões dadas durante a análise deste trabalho.

Ao Depto. de Biologia Celular e ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Receptores Hormonais pela utilização dos equipamentos e fornecimento de material para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Genética de Reprodução pelo uso de salas e equipamentos.

Aos demais professores, funcionários e colegas de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e do Laboratório de Cultura de Tecidos, que na amizade e convívio diário contribuíram para o presente trabalho.

A Cordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido, o qual contribuiu para a realização de grande parte deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS:

A.T.V.	- Associação tripsina e versene
B.S.A.	- Albumina Sérica Bovina
Cels.	- células
2-Me	- 2-Mercaptoetanol
EDTA	- Acido etilenodiaminotetracético
KCl	- Cloreto de potássio
kDa	- KiloDalton
mA	- MiliAmpère
ml	- MiliLitros
mM	- MiliMolar
No.	- número
P.A.S.	- Reação com ácido periódico e reativo de Schiff
P.B.S.	- Solução salina tamponada com fosfato
PM	- Peso Molecular
RPM	- Rotações por minutos
SFB	- Soro Fetal Bovino
SDS	- Sulfato Dodecil de Sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
V	- Volt
v/v	- volume por volume

- Vero-N - linhagem Vero inicial com padrão normal de crescimento
- Vero-T - população celular transformada derivada da linhagem Vero inicial
- ul - Microlitro
- ug - Micrograma
- XP - Xilidine Ponceau

ÍNDICE:

I - INTRODUÇÃO:.....	01
II - MATERIAIS E MÉTODOS:.....	12
1 - MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA:.....	12
2 - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS:.....	13
3 - ANÁLISE MORFOLÓGICA:.....	13
4 - CURVA DE CRESCIMENTO DA FASE PROLIFERATIVA E TEMPO DE DUPLICAÇÃO:.....	14
4.1 - Curva de Crescimento da Fase Proliferativa:.....	14
4.2 - Tempo de Duplicação:.....	16
5 - CURVA DE ADESAO:.....	17
6 - CULTURA EM MEIO SEMI-SÓLIDO DE ÁGAR:.....	18
6.1 - Cultura em meio semi-sólido de ágar I:.....	18
6.2 - Cultura em meio semi-sólido de ágar II:.....	20
7 - ESTUDO CITOGENÉTICO:.....	22
7.1 - Odtensão das Metáfases:.....	22
7.2 - Número Modal de Cromossomos:.....	23

7.3 - Índice Mitótico:.....	23
7.4 - Frequência de Poliploidia:.....	23
7.5 - Análise do Cariótipo:.....	24
8 - CITOQUÍMICA:.....	25
8.1 - Xilidine Ponceau - pH 2,5 - para detecção de proteínas:.....	25
8.2 - Reação de P.A.S. - para detecção de polissacarídeos e glicoproteínas:.....	26
9 - LISE CELULAR E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS CELULARES:.....	27
10 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS:.....	27
11 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS:.....	28
III - RESULTADOS:.....	29
1 - ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS:.....	29
2 - ANÁLISE DOS CORTES SEMI-FINOS:.....	32
3 - CURVA DE CRESCIMENTO DA FASE PROLIFERATIVA E TEMPO DE DUPLICAÇÃO:.....	32
3.1 - Curva de Crescimento da Fase Proliferativa:.....	32
3.2 - Tempo de Duplicação:.....	37
4 - CURVA DE ADESAO:.....	37
5 - CULTURA EM MEIO SEMI-SÓLIDO DE ÁGAR:.....	40
5.1 - Cultura em meio semi-sólido de ágar I:.....	40

5.2 - Cultura em meio	
semi-sólido de ágar II:.....	41
6 - CITOGENÉTICA:.....	47
6.1 - Número Modal de Cromossomos:.....	47
6.2 - Índice Mitótico:.....	47
6.3 - Frequência de Poliploidia:.....	47
6.4 - Análise do Cariótipo:.....	48
7 - CITOQUÍMICA:.....	58
7.1 - Xilidine Ponceau - pH 2,5:.....	58
7.2 - Reação de P.A.S.:.....	58
8 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS:.....	61
9 - ELETROFORESE EM GEL DE	
POLIACRILAMIDA COM SDS.....	61
IV - DISCUSSÃO:.....	66
RESUMO:.....	89
SUMMARY:.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	93

I - INTRODUÇÃO:

Muitas células embrionárias e alguns tipos celulares removidos de tecidos de indivíduos adultos, podem crescer e se dividir "in vitro", desde que um número suficiente de células esteja presente para desencadear esse processo. Para que estas células possam crescer e se dividir em cultura é necessário um conjunto de condições tais como meio de cultura contendo os nutrientes adequados e a manutenção das condições ideais do ambiente como temperatura e concentração de O₂ e CO₂ (EAGLE, 1959; WADA, 1987).

Vários tratamentos diferentes das células em cultura como, infecção por vírus (DUESBERG & VOGT, 1970; NUSSE & VARMUS, 1982; DeCAPRIO et alii, 1988; KLEIN, 1989), exposição à carcinógenos químicos (OLSSON & LINDAHL, 1980; BROWN, et alii, 1986) e agentes físicos (BOREK & SACHS, 1966; CIFONE & FIDLER, 1981), podem mudar consideravelmente as propriedades do crescimento celular "in vitro". Estas células, quando inoculadas em animais susceptíveis, podem causar a formação de tumores (CIFONE & FIDLER, 1981; DARNEL, 1986; EBERT et alii, 1990).

As alterações nas propriedades de crescimento destas células, assim como o subsequente desenvolvimento da capacidade de formar tumores, são coletivamente referidos como transformação maligna ou simplesmente transformação celular. Assim, a transformação "in vitro" pode ser definida como a aquisição permanente de distúrbios no crescimento e/ou controle de locomoção (PONTEN, 1976).

Como a transformação celular pode ser induzida em cultura, ela tem sido muito estudada como um análogo da indução do câncer em animais, embora a correspondência exata entre estes dois processos não tenha sido estabelecida (PONTEN, 1976; SMETS, 1980). Atualmente, o objetivo do estudo da transformação "in vitro" é entender a tumorigênese em organismos vivos, assim como os eventos moleculares no processo de oncogênese (BISHOP, 1991).

Estudos utilizando cultura celular e transformação têm apresentado vantagens decisivas sobre experimentos "in vivo", principalmente com relação ao controle celular, além de constituírem atualmente, a única possibilidade de estudos experimentais com pacientes humanos (PONTEN, 1976; SMETS, 1980). No estudo da transformação celular "in vitro" com a utilização de culturas celulares, o "meio ambiente" em que as células se desenvolvem pode ser manipulado pelo investigador (FLEMING & KISTLER, 1977) e as interações entre os grupos celulares adjacentes podem ser observadas (FRIDMAN et alii. 1985; HOLZER et alii, 1986), o que é difícil a nível de tumores induzidos em animais. Além disso, as células em cultura oferecem um vasto espectro de possibilidades

analíticas e experimentais em diversos campos de pesquisa (SMETS, 1980).

A transformação envolve mudanças num grande conjunto de propriedades celulares. Frequentemente é detectada por alterações morfofuncionais tais como aderência celular, troca na morfologia típica e alterações nos padrões de crescimento em cultura (HEIDELBERGER & YPE, 1966; BOREK, 1972). Assim, células transformadas quando comparadas as suas progenitoras normais, podem ser distinguidas ao nível de microscopia óptica por características específicas como rápido crescimento celular e/ou crescimento em múltiplas camadas (ABERCROMBIE, 1979; GOLOMBICK et alii, 1990); alta taxa núcleo/citoplasma, nucléolos proeminentes, muitas mitoses (GILVARRY et alii, 1990) e relativamente poucas estruturas especializadas (DARNEL, 1986).

A partir dos estudos acerca dos agentes transformantes e do processo de transformação celular, concluiu-se que esse é basicamente um evento, ou uma somatória de eventos, que afeta o genoma celular (SMETS, 1980). Desta forma, o evento inicial seria causado por uma ou mais mutações, e as mutações individuais acumuladas em uma única célula levariam ao fenótipo transformado (PONDER, 1980; SMETS, 1980).

E improvável que o produto de genes transformados por ação viral, por exemplo, possam estar diretamente envolvidos em todos os aspectos do metabolismo celular afetados pela transformação. É muito mais plausível, que o(s) produto(s) do gene transformado tenha(m) ação sobre um ou alguns sítios celulares, produzindo uma sequência de eventos em cascata, levando a even-

tual expressão do fenótipo transformado. Como a maioria dos aspectos do fenótipo transformado são comuns em células transformadas por diferentes agentes, é de se esperar que alguns dos componentes desse evento em cascata sejam também comuns, mesmo que o produto do gene inicialmente transformado seja diferente (SENGER et alii., 1979).

A transformação celular "in vitro" é geralmente acompanhada por mudanças no complemento cromossômico (BIANCHI & AYRES, 1971). As células normais apresentam conteúdo cromossômico diplóide, enquanto as transformadas obtidas a partir destas apresentam, geralmente, número cromossômico inconstante e são aneuplóides (PONDER, 1980; GILVARRY et alii, 1990).

As células não transformadas, tanto fibroblásticas como epiteliais, apresentam crescimento dependente de ancoragem, ou seja, para poderem proliferar necessitam estar aderidas a um substrato (VASILIEV, 1985). A transformação dessas células com crescimento dependente de ancoragem, envolve mudanças de âmbito geral nas propriedades celulares. Muitas destas mudanças estão inter-relacionadas, mas algumas parecem ocorrer de forma independente das outras e nem todas as células transformadas mostram todo o conjunto de alterações que podem ser induzidas pela transformação (MURRAY, et alii, 1980; KESKI-OJA et alii, 1985; NERMUT et alii, 1991).

As células normais não transformadas parecem apresentar um mecanismo fisiológico ativo que é responsável por um tempo de vida limitado (CAIRNS, 1975). Esse mecanismo, atualmente chamado apoptose, controla o tempo de vida da célula através de uma pré-

programação para um número limitado de divisões celulares, assim como a morte celular pré-programada (WILLIAMS, 1991).

Provavelmente a mudança mais observada depois da transformação celular é a capacidade de crescer infinitamente em cultura (SMETS, 1980). As células transformadas, ao contrário das normais, crescem contínua e desordenadamente, mesmo com a densidade populacional saturada, perdendo a pré-programação para um número limitado de divisões como possuem as células normais. Esta característica é considerada uma importante analogia ao crescimento das células malignas em mamíferos (SMETS, 1980), sendo que as células aberrantes sobreviventes ao mecanismo de apoptose, têm sido associadas ao processo de oncogênese (WILLIAMS, 1991).

A transformação pode causar alterações nas interações célula-célula (LOEWENSTEIN, 1979; KLAUNIG & RUCH, 1990; REN et alii, 1990; YAMASAKI, 1990), célula-substrato (MURRAY et alii, 1980; KESKI-OJA et alii, 1985; NERMUT, 1991)) e célula-meio (HOLZER et alii, 1986; CROSS & DEXTER, 1991), induzindo a mudanças no arranjo, modelo de crescimento e densidade celular.

A transformação morfológica, inclui fenômenos bem conhecidos como: a perda de inibição por contato (ABERCROMBIE, 1979), redução no requerimento de soro (MULDER & BRATTAIN, 1989; MULDER & CHILDRESS-FIELDS, 1990), alterações nas propriedades de adesividade (ROOS & DINGEMANS, 1979; ROOS, 1984), mudanças na atividade das proteases de superfície (PARDEE, 1975) e mudanças na capacidade e facilidade para aglutinar lectinas vegetais como a Concanavalina A (SMETS, 1980). Além disso, as células transformadas possuem citoesqueleto pouco desenvolvido ou disperso, mos-

trando mudanças características na taxa de transporte de glicose e de aminoácidos (HATANAKA, 1974; BEN-ZE'EV, 1985).

As células transformadas podem, geralmente, perder os requisitos para aderência, crescendo sem se fixar a um substrato (VAHERI & MOSHER, 1978; HAYMAN et alii, 1981; ALITALO et alii, 1982). O indicativo disto é que células transformadas podem crescer e se dividir suspensas em meio semi-sólido de ágar, formando colônias (COOK & CHEN, 1988; PERSKY et alii, 1989; SRIDHAR et alii, 1989). Se células normais são suspensas nesse meio, estas irão metabolizar, porém não irão crescer ou se dividir (DARNEL, 1986).

Algumas modificações das propriedades celulares decorrentes da transformação, envolvem alterações dos componentes e/ou das funções da superfície celular (HYNES, 1976; VAHERI & MOSHER, 1978; SMETS & VAN BEEK, 1984). Várias proteínas e glicoproteínas de superfície são alteradas com a transformação. A maioria das alterações envolve reduções quantitativas de proteínas, porém algumas delas têm suas quantidades aumentadas depois da transformação (HYNES, 1976).

Os glicolipídios padrões, abundantemente encontrados na superfície das células normais, também sofrem modificações nas células transformadas. Em estudos utilizando fibroblastos normais provenientes de rim de hamster jovem, e células transformadas obtidas a partir destas, espontaneamente ou por indução através do vírus do polioma, observou-se um decréscimo e um complementar aumento de algumas classes específicas de glicolipídeos. Estas alterações encontram-se associadas a mudanças na capacidade de

aglutinar lectinas observada em células transformadas (HAKOMORI, 1975).

Provavelmente uma das mais importantes diferenças entre a superfície das células normais e das células transformadas é que nas últimas, as proteínas de superfície são mais móveis (BUCK et alii, 1970; HYNES, 1976). Este fato pode ser evidenciado pois as células transformadas apresentam capacidade de aglutinar lectinas a concentrações mais baixas do que a requerida para células normais (MONSIGNY et alii, 1983).

Outra importante diferença entre células normais e transformadas, ao nível de superfície celular, é a composição da rede fibrilar. Células normais quiescentes ou na fase de crescimento em culturas de monocanada, tornam-se cobertas por uma densa rede fibrilar, constituída principalmente por fibronectina (YAMADA & OLDEN, 1978; HYNES & YAMADA, 1982). As células transformadas possuem uma quantidade insuficiente de fibronectina ou não a possuem. Esta deficiência ou ausência da fibronectina contribui para as alterações na capacidade de adesão ao substrato, achatamento e migração celular (HAYMAN et alii, 1981; AKIYAMA et alii, 1989), observadas nas células transformadas.

O tipo celular que usualmente predomina nas culturas de células animais é chamado "fibroblasto", pois essas células secretam tipos de proteínas semelhantes as secretadas pelos fibroblastos que formam o tecido conjuntivo em animais. Fibroblastos em cultura têm a morfologia dos fibroblastos teciduais, embora eles não sejam diferenciados como os fibroblastos verdadeiros. Os fibroblastos teciduais, constituem um tipo celular derivado do

mesoderma embrionario e as células que crescem em cultura parecem ir de encontro às células mesodérmicas. Com estimulação adequada estas podem se diferenciar para vários tipos celulares: células adiposas, células do tecido conjuntivo, células musculares e outras. Na maioria dos estudos, todavia, os "fibroblastos" cultivados têm sido tratados convenientemente como células prototípicas e comumente referidas como: células tipo-fibroblastos (DARNEL, 1986).

As células Vero, uma linhagem celular estabelecida a partir de células renais de macaco verde da Africa (Cercopithecus aethiops), são consideradas "normais". Esta linhagem apresenta padrão de crescimento característico em cultura, sendo constituída por células tipo-fibroblastos, possui caracteres morfológicos estabelecidos, crescendo em monocamadas e possuindo, portanto, inibição por contato (JANIK & GREKO, 1976; FLEMING & KISTLER, 1977; LEE & ENGELHARDT, 1977/ 1978; ARAKI & NAKAMURA, 1978; McCLANE & MacDONEL, 1979; LEARY & BLAIR, 1980).

Mantidas em condições de cultura aparentemente normais, as células Vero de alguns frascos, passaram a apresentar uma série de alterações morfológicas, comportamentais e de crescimento, em relação ao padrão observado na cultura inicial. Dentre essas alterações foi observada a formação de grumos. Esses, foram isolados em tubos de "Leighton" e repicados sucessivamente. As referidas alterações mantiveram-se ao longo dos repiques, sendo consideradas portanto, irreversíveis e provavelmente resultantes de um processo de transformação sofrido pelas células da linhagem inicial.

De acordo com esses fatos, o objetivo geral deste trabalho refere-se a um estudo comparativo das alterações celulares ocorridas nas células dessa população aparentemente transformada (Vero-T) em relação à sua linhagem parental (Vero-N). Este estudo visa contribuir para o entendimento do processo de malignidade e com o aprimoramento das técnicas de diagnóstico de populações transformadas "in vitro".

Os objetivos específicos desse trabalho são:

1 - Observar as alterações comportamentais das duas populações em condições normais de cultura.

2 - Detectar as alterações morfológicas ocorridas na população aparentemente transformada, relacionando-as com as características da linhagem inicial, sempre utilizada como controle.

3 - Estudar a proliferação celular através da curva de crescimento, índice mitótico e tempo de duplicação das células das duas populações.

4 - Detectar eventuais alterações ao nível de superfície celular, estudando comparativamente a velocidade de adesão das duas populações ao substrato, através da obtenção das suas respectivas curvas de adesão em meio suplementado com soro fetal bovino.

5 - Verificar a habilidade de formação de colônias e crescimento com independência de ancoragem, através do cultivo em meio semi-sólido de ágar nas duas populações.

6 - Detectar as possíveis alterações cromossômicas das células transformadas, em relação às suas progenitoras normais, através da determinação do número modal e estudo do cariótipo.

7 - Verificar a frequência de divisões celulares anormais, através da determinação do índice de poliploidia e presença de metáfases tri ou multipolares.

8 - Efetuar estudo citoquímico através de técnicas de coloração específicas para proteínas e polissacarídeos, para observar os padrões de coloração das duas populações.

9 - Detectar através da dosagem de proteínas totais e análise eletroforética em gel de poliacrilamida, possíveis alterações na concentração e o padrão de proteínas presentes nos extratos celulares das duas populações.

II - MATERIAIS E MÉTODOS:

1 - MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA:

Células da linhagem estabelecida Vero - passagem 295 -, provenientes do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, foram mantidas em cultura no meio Ham - F10 (SIGMA) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (NUTRICELL). As células foram cultivadas em sistema fechado, em frascos de vidro tipo xarope e garrafas de polipropileno para cultura celular, mantidas em estufa à 37°C. O meio de cultura foi trocado sempre que houve variação do pH, o que normalmente aconteceu a cada 48 horas.

Sempre que a camada celular, aderida à superfície dos frascos, atingisse a confluência, efetuou-se o subcultivo ou repique das mesmas com a utilização de solução de A.T.V. - Associação Tripsina e Versene (tripsina 0,2% e versene 0,1%).

As células transformadas provenientes da linhagem inicial foram mantidas nas mesmas condições de cultura que as suas genitoras.

2 - ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS:

Para a observação das alterações comportamentais entre as células Vero-N - da linhagem inicial controle e as transformadas Vero-T, surgidas a partir da linhagem inicial, foi feito acompanhamento visual diário dos frascos de cultura em microscópio invertido.

3 - ANÁLISE MORFOLÓGICA:

As células da população Vero-T foram submetidas a inclusão em Epon, para a análise estrutural em microscopia de luz, para isso, efetuou-se o deslocamento mecânico dos grumos da parede dos frascos.

Os grumos celulares da população Vero-T, foram fixados por duas horas em glutaraldeído 3%, imerso em gelo. A imersão do material em gelo foi mantida ao longo de todo o procedimento, até parte da desidratação. Após a fixação efetuou-se a lavagem do material em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 - 7,4, por aproximadamente uma hora. Ao final dessa, retirou-se o tampão e o material foi imerso em tetróxido de ósmio previamente preparado (1,0 ml de tetróxido de ósmio, 2,5 ml de tampão fosfato 0,2 M - pH 7,2 - 7,4 e 1,0 ml de água destilada), por aproximadamente uma hora. Posteriormente, o material foi colocado em imersão em ácido tânico 2% diluído em tampão fosfato de sódio 0,1 M, por uma hora. Lavou-se em água destilada, e então, o material foi submetido a

desidratação em soluções crescentes de etanol 50, 75, 95 e 100%, durante 15 minutos em cada um deles, sendo que nas duas últimas concentrações de etanol (95 e 100%), o procedimento foi repetido três vezes sem a imersão do material em gelo. Após a desidratação, o material foi embebido em solução de Epon/acetona 1:1 (v/v), por uma noite em recipiente aberto e à temperatura ambiente. No dia seguinte procedeu-se a inclusão do material em Epon e a polimerização foi efetuada em estufa a 37°C por três dias. Foram efetuados cortes semi-finos, corados com Azul de Toluidina - pH 11 - a 1% em carbonato de sódio a 0,5%, para observação em microscópio de luz.

4 - CURVA DE CRESCIMENTO DA FASE PROLIFERATIVA E TEMPO DE DUPLICAÇÃO:

Todo procedimento para obtenção das curvas de crescimento da fase proliferativa e tempo de duplicação, foi efetuado em duplicata.

4.1 - Curva de Crescimento da Fase Proliferativa:

Monocamadas confluentes das duas populações celulares, Vero-N e Vero-T, foram tripsinizadas com solução de A.T.V. e uma alíquota foi removida para se determinar a concentração celular. Após a determinação da concentração celular em hemocitômetro e a

diluição adequada, foi obtida uma suspensão celular das duas populações contendo 4×10^3 cels./ml em meio Ham - F10 suplementado com 5% de SFB. A suspensão celular das duas populações foi semeada em tubos de "Leighton", de tal forma que cada tubo recebeu 2 ml da suspensão celular ou 8×10^3 cels./tubo.

Os tubos foram mantidos em estufa à 37°C por um período de incubação de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas.

Ao final de cada tempo, os tubos de cultura das duas populações celulares foram submetidos à contagem do número de células presentes.

Procedimento para a contagem:

Após o tempo de cultura para cada tubo, efetuou-se a lavagem da superfície deste com solução salina 0,9% pré-aquecida à 37°C e, posteriormente, a tripsinização com 1 ml da solução de A.T.V., para que as células aderidas se desprendessem da superfície do tubo. Após a interrupção da ação da tripsina, com 1 ml de meio Ham - F10 suplementado com 5% de SFB, a suspensão celular foi submetida à contagem em hemocitômetro.

A média do número de células/ml presentes em cada tempo de cultura foi lançada no programa "BASICA EXPOCELL", que ajusta os valores obtidos na contagem possibilitando a construção do gráfico exponencial que representa a curva de crescimento.

4.2 - Tempo de Duplicação:

O cálculo do tempo de duplicação das duas populações celulares Vero-N e Vero-T foi efetuado segundo o método descrito por PASTAN, 1979, utilizando-se o número de células obtidas nos tempos de cultura referentes a 48 e 72 horas, como se segue:

Cálculo do número de duplicações:

Vero-N

48 horas = 10.000 cels./ml

no. de duplicações = $\log_2 10.000 \times 3,3219^*$

72 horas 18.000 cels./ml

no. de duplicações = $\log_2 18.000 \times 3,3219^*$

Vero-T

48 horas 10.000 cels./ml

no. de duplicações = $\log_2 10.000 \times 3,3219^*$

72 horas 17.500 cel./ml

no. de duplicações = $\log_2 76.875 \times 3,3219^*$

(*)- $\log_2 10$.

Cálculo do tempo de duplicação:

tempo de duplicação = $\frac{\text{no. de horas}}{\text{no. de duplicações}}$

5 - CURVA DE ADESAO:

O procedimento para a obtenção das curvas de adesão das populações Vero-N e Vero-T, foi modificado do método utilizado por MURRAY et alii, 1980.

Monocamadas confluentes das duas populações celulares Vero-N e Vero-T, foram tripsinizadas com solução de A.T.V. e uma alíquota foi removida para se determinar a concentração celular. Após a determinação da concentração celular e a diluição adequada, foi obtida uma suspensão celular das duas populações contendo 10^4 cels./ml em meio Ham - F10 suplementado com 5% de SFB. As suspensões celulares das respectivas populações, foram semeadas em placas descartáveis de 35 mm de diâmetro (DESCARPLAST), sendo que cada placa recebeu 2 ml da suspensão ou 2×10^4 cels./placa.

As placas foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO_2 , nos seguintes tempos de cultura: 10, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos.

Ao final dos respectivos tempos, as placas de cultura das populações Vero-N e Vero-T foram submetidas à contagem para determinação do número de células aderidas.

Procedimento para a contagem:

As placas foram retiradas da estufa e o meio desprezado. Efetuou-se a lavagem da superfície das placas com solução salina 0,9% e a fixação do material em etanol/ácido acético - 3:1

(v/v), por 15 minutos. Depois de fixado, o material foi corado com Giensa a 5% diluída em água destilada por 10 minutos.

Todo o procedimento para a obtenção das curvas de adesão das populações Vero-N e Vero-T foi efetuado em triplicata.

A contagem foi feita através do número de células aderidas em dez campos aleatórios de cada uma das três placas de cada tempo de cultura, obtendo-se ao final a média do número de células contadas por campo para cada tempo de cultura.

6 - CULTURA EM MEIO SEMI-SÓLIDO DE ÁGAR:

A cultura em meio semi-sólido de ágar foi efetuada utilizando-se dois métodos. O primeiro deles, denominado Meio Semi-Sólido de Agar - I, baseado nos trabalhos de BOREK, 1972 e PERSKI et alii, 1989, e o segundo, Meio Semi-Sólido de Agar - II, modificado do trabalho de EBERT et alii, 1990.

Em ambos os métodos, utilizou-se como culturas controles a linhagem estabelecida a partir de células de mieloma de camundongo, denominada "sp2", que cresce em cultura sem depender de ancoragem, com o objetivo de se verificar a eficiência do meio.

6.1 - Cultura em Meio semi-sólido de Ágar - I:

A cultura em meio semi-sólido de ágar utiliza o nutriente Ham - F12. O meio de cultura Ham - F12 (SIGMA) foi preparado a partir do pó conforme as especificações do produto, po-

rêm utilizando-se o dobro da concentração indicada. Após a filtração do meio, acrescentou-se a esse 20% de SFB.

O ágar (Agar for Cell Culture - SIGMA) foi diluído a uma concentração de 0,6% em 50 ml de água destilada e aquecido a 45°C até que ficasse homogêneo. Posteriormente, esterilizou-se essa solução em calor úmido a 180°C por 25 minutos.

Semeadura nas Placas:

Monocamadas confluentes das duas populações celulares, Vero-N e Vero-T, foram tripsinizadas com solução de A.T.V. e uma alíquota foi removida para determinação da concentração celular. As células "sp2" não necessitam ser tripsinizadas, sendo obtida uma suspensão celular apenas com a agitação do frasco de cultura. Após a determinação da concentração celular e a diluição adequada, foi obtida uma suspensão celular de cada uma das três linhagens contendo 2×10^5 cels./ml.

No momento da semeadura nas placas o meio Ham - F12 e o ágar foram mantidos em banho-maria a 45°C. As células foram inicialmente homogeneizadas em um volume de meio Ham - F12 e posteriormente foi adicionado o mesmo volume de ágar, portanto, ao final do procedimento obteve-se o meio Ham - F12 na sua concentração normal, suplementado com 10% de SFB e com 0,3% de ágar. A mistura foi homogeneizada e cada placa de 25 mm (CORNING) recebeu 3 ml de meio semi-sólido de ágar perfazendo um total de 6×10^5 cels./placa.

O procedimento foi repetido para as três populações celulares, sendo semeadas dez placas para cada uma delas. As placas foram mantidas em cultura em estufa à 37°C com 5% de CO₂ no ar, por um período de 20 dias.

6.2 - Cultura em Meio semi-sólido de Ágar - II:

Neste método de cultura em meio semi-sólido de ágar preparou-se inicialmente uma camada de fundo, constituída por meio Ham - F12 e 0,6% de ágar pelo mesmo princípio descrito no método acima. A camada de fundo, correspondente a 1,5 ml desse meio, foi semeada em todas as placas, que posteriormente foram colocadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂ no ar.

No dia seguinte procedeu-se o preparo do meio Ham - F12 a uma concentração correspondente à metade da utilizada no método anterior e suplementado com 10% de SFB. O ágar foi preparado a uma concentração de 0,6%.

Semeadura nas Placas:

Monocamadas confluentes das duas populações celulares, Vero-N e Vero-T, foram tripsinizadas com solução de A.T.V.. A suspensão celular de "sp2", e das populações Vero-N e Vero-T foram submetidas a contagem do número de células. Determinou-se, então, o número de células presentes em cada suspensão e a dilui-

ção adequada para se obter uma concentração de 2×10^5 cels./ml.

No momento da semeadura nas placas o meio Ham - F12 e o ágar foram mantidos em banho-maria à 45°C. As células foram inicialmente homogeneizadas em um volume do meio Ham - F12 e posteriormente foi adicionado o mesmo volume de ágar, portanto, ao final deste procedimento obteve-se o meio Ham - F12 na metade da sua concentração normal, suplementado com 5% de SFB e com 0,3% de ágar. A mistura foi homogeneizada e cada placa recebeu 2 ml de meio semi-sólido de ágar, perfazendo um total de 2×10^5 cels./ml.

O procedimento foi repetido para as três populações celulares, sendo semeadas dez placas para cada uma delas. As placas foram mantidas em cultura em estufa à 37°C com 5% de CO₂ no ar, por um período de 20 dias.

As culturas celulares em meio semi-sólido de ágar I e II foram observadas diariamente em microscópio invertido, para se detectar e acompanhar o início e desenvolvimento de colônias celulares.

7 - ESTUDO CITOGENÉTICO:

Para a investigação das possíveis alterações no número modal de cromossomos, no índice mitótico, na frequência de poli-

ploidia e no cariotipo das duas populações, foram feitas preparações citogenéticas para se obter lâminas com o maior número possível de metáfases analisáveis.

7.1 - Obtenção de Metáfases:

Monocamadas confluentes das duas populações celulares, Vero-N e Vero-T, foram submetidas à ação da colchicina, numa concentração de 100 ug/ml, por três horas, para que todas as células em divisão fossem bloqueadas na metáfase. Após o tratamento com a colchicina, o meio de cultura foi desprezado e as paredes do tubo lavadas com 0,5 ml de solução de A.T.V.. Posteriormente, efetuou-se o descolamento das células da parede do frasco com o mesmo volume da solução de A.T.V. e ao final a interrupção da ação da tripsina com meio Ham - F10 suplementado com 5% de SFB.

Desta forma, obteve-se uma suspensão celular que foi submetida ao processo de hipotonia progressiva com KCl 0,75 M. Após o processo de hipotonia, o material foi fixado em metanol/ácido acético 3:1 (v/v) e submetido a quatro lavagens sucessivas com o mesmo fixador por centrifugação (1.000 RPM/10 minutos) e ressuspensão. Ao final dessas, a suspensão celular foi espalhada em lâminas que depois de secas foram coradas com Giensa a 5% diluído em água destilada, por 15 minutos.

7.2 - Número Modal de Cromossomos:

Para a determinação do número modal, contou-se o número de cromossomos de cem metáfases de células integras, consideradas de bom nível para análise e sem a interferência de cromossomos de metáfases vizinhas (BIANCHI & AYRES, 1971).

7.3 - Índice Mitótico:

Para a determinação do índice mitótico, foram contadas o número de células em metáfase num total de 1.000 células contadas. Assim, o índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de metáfases pelo número total de células contadas ($IM [\%] = \text{no. de células em metáfase} / 1.000 \times 100$) (DEITCH & SAWICKI, 1978).

7.4 - Frequência de Poliploidia:

Para a determinação da frequência de células poliplóides presentes na população, contou-se o número de metáfases poliplóides num total de 1.000 metáfases contadas. Assim a frequência de poliploidia foi obtida, dividindo-se o número de metáfases poliplóides pelo número total de metáfases contadas ($FP [\%] = \text{no. de metáfases poliplóides} / 1.000 \times 100$). A frequência de poliploidia em cultura, também foi efetuada através da contagem de metáfases poliplóides multipolares anormais, em relação a metáfa-

ses bipolares normais, presentes em laminulas que foram fixadas em metanol/ácido acético 3:1 (v/v) e, coradas com Giensa a 5% diluído em água destilada (GILVARRY et. alii., 1990).

7.5 - Análise do Cariótipo:

Para o estudo do cariótipo das duas populações Vero-N e Vero-T e detecção das possíveis alterações cromossômicas, o material foi submetido à chamada técnica de Banda "Q", para identificação e pareamento dos cromossomos.

Inicialmente o material foi hidratado em soluções decrescentes de etanol 100, 70, 50 e 20% por 5 minutos em cada uma delas. Depois da hidratação procedeu-se a imersão em tampão McIlvaine pH 4,5 por 5 minutos à 37°C. Posteriormente, o material foi mergulhado em solução de quinacrina mostarda 5% em tampão McIlvaine pH 4,5 e mantida em banho-maria a 37°C por aproximadamente uma hora. Depois da lavagem as lâminas foram montadas com o mesmo tampão, sob lamínula fixa com esmalte, para fotografia em microscópio de fluorescência (BEIGUELMAN, 1982).

Os cromossomos foram pareados e classificados de acordo com o tamanho, do maior para o menor, e com a posição do centrômero em três grupos: metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos, respectivamente. Os cromossomos sexuais foram considerados como par número um conforme o trabalho de BIANCHI & AYUB, 1971.

8 - CITOQUÍMICA:

Para o estudo citoquímico as células das duas populações Vero-N e Vero-T, foram mantidas em tubos de "Leighton" munidos de lamínulas, sobre as quais as células cresceram aderidas. Após a confluência da monocamada, o material aderido às lamínulas foi submetido ao processo de fixação adequado a cada reação efetuada.

8.1 - Xilidine Ponceau - pH 2,5 - para detecção de proteínas:

O material a ser corado com Xilidine Ponceau foi inicialmente submetido ao processo de fixação em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2 M - pH 7,0, por 2 horas à 4°C.

Solução Corante: 0,1 g de Xilidine Ponceau em 100 ml de ácido acético 2%.

Lamínulas contendo as células aderidas da população Vero-N e Vero-T, foram imersas em solução corante por 15 minutos. Posteriormente lavou-se o material em ácido acético 2% e em água. Seguiu-se, então, a desidratação em soluções com concentrações crescentes de etanol e a diafanização em álcool/xilol 1:1 (v/v) e em xilol 100%. As lamínulas foram montadas em Bálsamo do Canadá (VIDAL, 1970).

8.2 - Reação de P.A.S. - para detecção de polissacarídeos e glicoproteínas:

O material a ser corado pela reação com ácido periódico e reativo de Schiff foi inicialmente submetido ao processo de fixação em metanol/ácido acético 3:1 (v/v), por 10 minutos.

Laminulas contendo as células aderidas das duas populações Vero-N e Vero-T, foram inicialmente oxidadas pelo ácido periódico 0,5%, por 10 minutos. Depois da lavagem em água destilada por cinco minutos, o material foi submerso no Reativo de Schiff na ausência de luz, por 9 minutos e posteriormente lavado em água sulfurosa (1 parte de metabissulfito de sódio 10%, 1 parte de HCl 1N e 18 partes de água destilada). Após a lavagem em água destilada, o material foi desidratado em soluções crescentes de etanol e diafanizado respectivamente em soluções de álcool/xilol 2:1, 1:1 e 1:2 (v/v) e xilol 100%. As laminulas foram montadas em Bálsamo do Canadá (MAIA, 1979).

9 - LISE CELULAR E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS CELULARES:

Para se proceder a lise e obter os extratos celulares das duas populações Vero-N e Vero-T, foi necessário o acúmulo de grande volume de células. A obtenção de um grande volume de células se deu através de sucessivos subcultivos ou repiques em volumes crescentes de meio de cultura.

Inicialmente, o meio de cultura dos frascos foi desprezado e suas paredes lavadas com P.B.S. (Phosphate Buffer Solution), em seguida, procedeu-se a tripsinização para que as células descolassem da superfície.

Após a tripsinização foi obtida uma suspensão celular, que permaneceu em meio Ham-F10 suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino por aproximadamente duas horas. Após a contagem do número de células e feita a diluição adequada, obteve-se suspensões das duas populações contendo um total de 6×10^7 cels. As suspensões celulares das duas populações Vero-N e Vero-T foram lavadas duas vezes em PBS por centrifugação a 1.000 RPM/10 minutos e ressuspendidas. O sobrenadante foi dispensado, restando apenas o precipitado contendo as células.

As células foram lisadas com Triton X100 1% diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M - pH 7,5 (1:1 (v/v)). O material foi centrifugado a 9.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante recolhido, foi homogeneizado e distribuído em alíquotas de 50 µl as quais foram congeladas para posterior dosagem das proteínas totais e eletroforese.

10 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS:

A dosagem de proteínas totais foi feita pelo método de BRADFORD, 1976.

11 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS - PAGE):

As sub-frações protéicas dos extratos celulares das populações Vero-N e Vero-T, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (ZINGALES, 1984).

As amostras com 50 µg de proteínas foram preparadas em tampão Tris-HCl 62 mM - pH 6,8 (SDS 2%; glicerol 10%; EDTA 10 mM; Azul de Bromofenol 0,01%) sem ou com 2-mercaptoetanol (2-Me) 0,2%.

As amostras foram fervidas por 5 minutos. O tampão utilizado na eletroforese foi o Tris 25 mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%. As condições de corrida foram 25 mA, 100 V. Padrões de peso molecular (Pharmacia Fine Chemicals - Uppsala, Sweden) contendo Beta-galactosidase (116.000), Fosforilase B (94.000), Albumina Bovina (67.000), Ovalbumina (43.000), Anidrase Carbônica (30.000) e Inibidor de Tripsina (20.000), foram sempre analisados em paralelo. Após a corrida o gel foi corado pelo Comassie Blue G-250 2%.

III - RESULTADOS:

1 - ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS:

Através do estudo das alterações comportamentais em cultura, observou-se que as células da população Vero-N possuem morfologia alongada, típica de células normais tipo-fibroblastos, apresentando pouca granulação citoplasmática (Figura 01).

A população Vero-T, apresentou morfologia mais variada e irregular, com células de tamanho acentuadamente maior que o padrão normal observado e com muita granulação citoplasmática (Figura 02). A população Vero-T, apresentou também, antes da confluência da monocamada, células de morfologia estrelada atípica (Figura 03).

As células da população Vero-N, quando atingiam a confluência, necessitavam do repique ou subcultivo, do contrário, entravam em senescência e descolavam-se da superfície dos frascos de cultura. As células da população Vero-T, quando atingem a confluência, continuavam a se desenvolver indefinidamente, passando a crescer empilhadas ou em múltiplas camadas. Após aproximadamente 96 horas de cultura, as células da população Vero-T, começavam a apresentar a formação de pequenos agregados ou grumos ce-

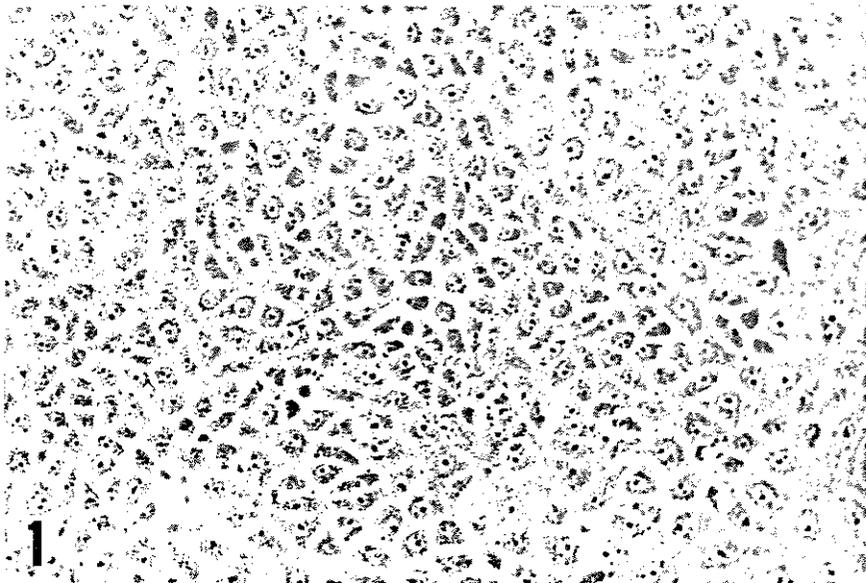


Figura 01 - Monocamada confluyente da população Vero-N com 48 horas de cultura. Contraste de fase. Aumento: 200x.

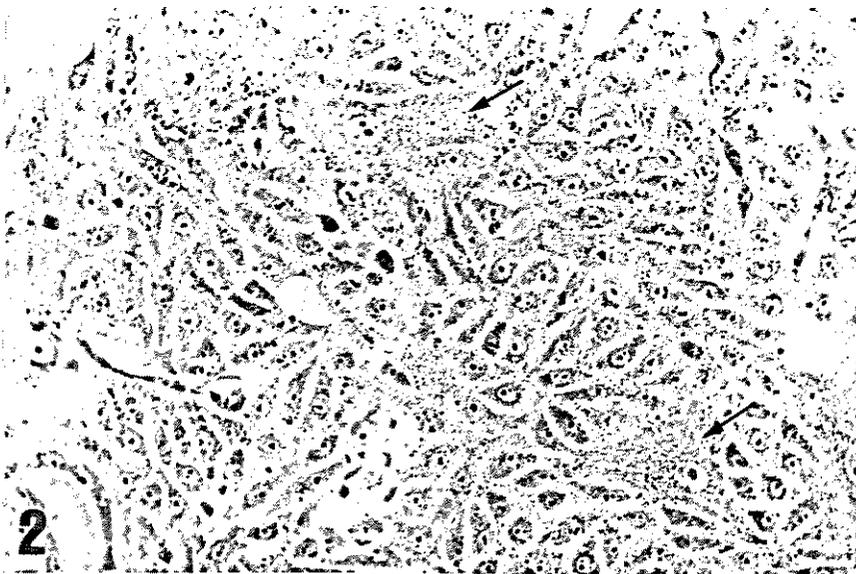


Figura 02 - Monocamada confluyente da população Vero-T com 48 horas de cultura. Células de tamanho superior ao padrão normal observado nas demais (→). Contraste de fase. Aumento: 200x.

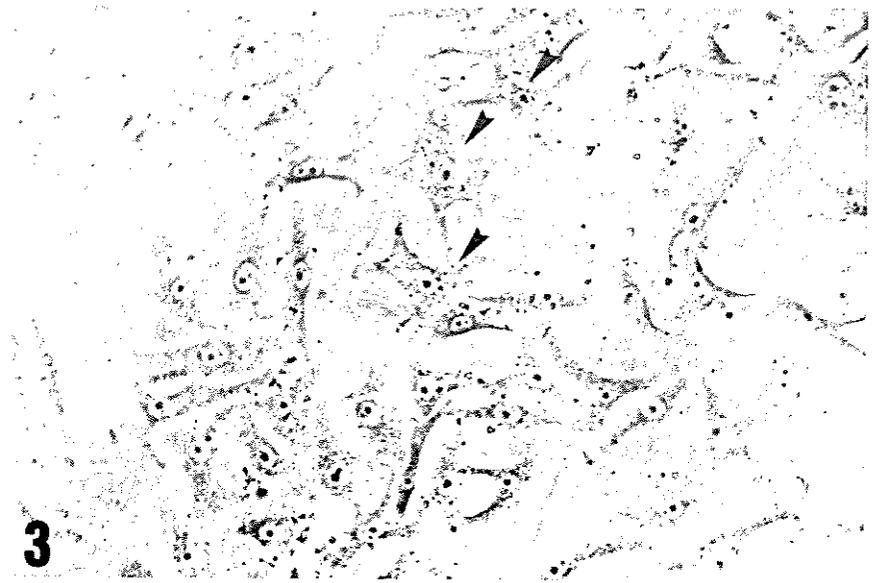


Figura 03 - Células da população Vero-T, antes de atingir a confluência da monocamada, com 18 horas de cultura, apresentando morfologia estrelada atípica (►). Contraste de fase. Aumento: 200x.

lulares, que aumentavam de tamanho com o tempo de cultura, podendo até, serem vistos macroscopicamente (Figuras 04 e 05).

2 - ANÁLISE DOS CORTES SEMI-FINOS:

Pela análise dos cortes semi-finos, observou-se que as células dos grumos da população Vero-T, encontravam-se mais achatadas na superfície deste (Figura 06), enquanto as células do interior do grumo apresentavam-se globosas. Pode-se observar também, a presença de material extracelular no interior dos grumos da população Vero-T (Figura 07).

3 - CURVA DE CRESCIMENTO DA FASE PROLIFERATIVA E TEMPO DE DUPLICAÇÃO:

3.1 - Curva de Crescimento da Fase Proliferativa:

Os valores ajustados relativos ao número de células/ml presentes em cada tempo de cultura, encontra-se no Quadro - I. A curva de crescimento das duas populações encontra-se representada no Gráfico I.

Esses resultados mostram que não ocorreram diferenças significativas de crescimento na fase proliferativa entre as duas populações celulares.



Figura 04 - Células da população Vero-T com 22 dias de cultura, apresentando agregados ou grumos celulares (\blacktriangleright). Contraste de fase. Aumento: 37x.

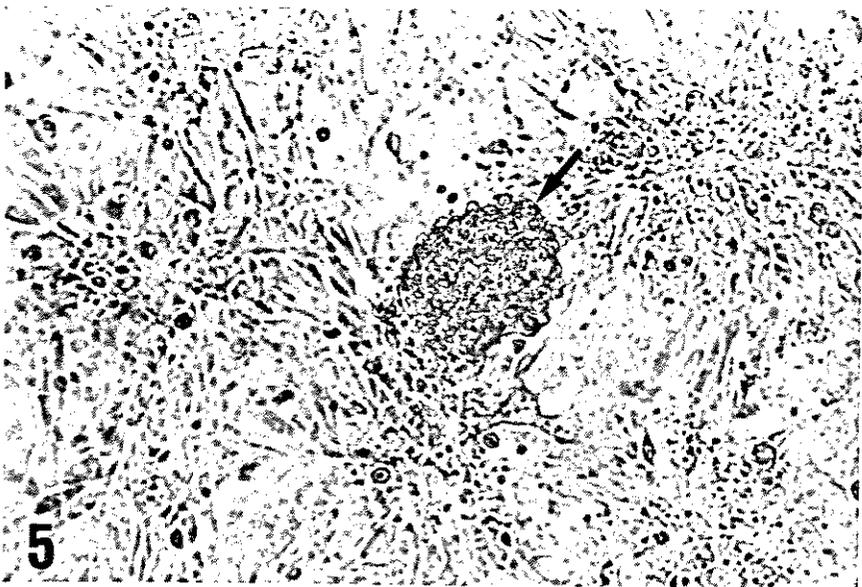


Figura 05 - Células da população Vero-T com 26 dias de cultura, apresentando grumo celular (\blackrightarrow). Contraste de fase. Aumento: 100x.

6

Figura 06 - Corte semi-fino do grumo celular da população Vero-T corado com Azul de Toluidina a 1% - pH 11, mostrando células mais achatadas em sua superfície (▶). Aumento: 1.350x.

7

Figura 07 - Corte semi-fino do interior do grumo celular da população Vero-T corado com Azul de Toluidina a 1% - pH 11, mostrando células mais globosas e presença de material extracelular (→). Aumento: 1.350x

Quadro I - Curva de Crescimento da Fase Proliferativa		
VERO-N		
Tempo de Cultura (horas)	Nº de cels. (cels/ml)	Valores Ajustados (*)
24	5000	4804
48	10000	8982
72	18000	16792
96	25000	31394
120	46875	58693
144	118750	109730
168	240000	205147
Constante=2569.8; B=0.6256;		
Coef. Corr.=0.9931; Coef. Determ.=0.9864		
VERO-T		
Tempo de Cultura (horas)	Nº de cels. (cels/ml)	Valores Ajustados (*)
24	5000	4643
48	10000	9252
72	17500	18439
96	27500	36746
120	76875	73228
144	169375	145931
168	288750	290815
Constante=2329.9; B=0.6895;		
Coef. Corr.=0.9954; Coef. Determ.=0.9864		

(*) - Obtidos através do Programa "BASICA EXPOCELL".

Quadro I - Valores correspondentes a Curva de Crescimento da fase proliferativa das populações celulares Vero-N e Vero-T.

Gráfico I - Curva de Crescimento da Fase Proliferativa:

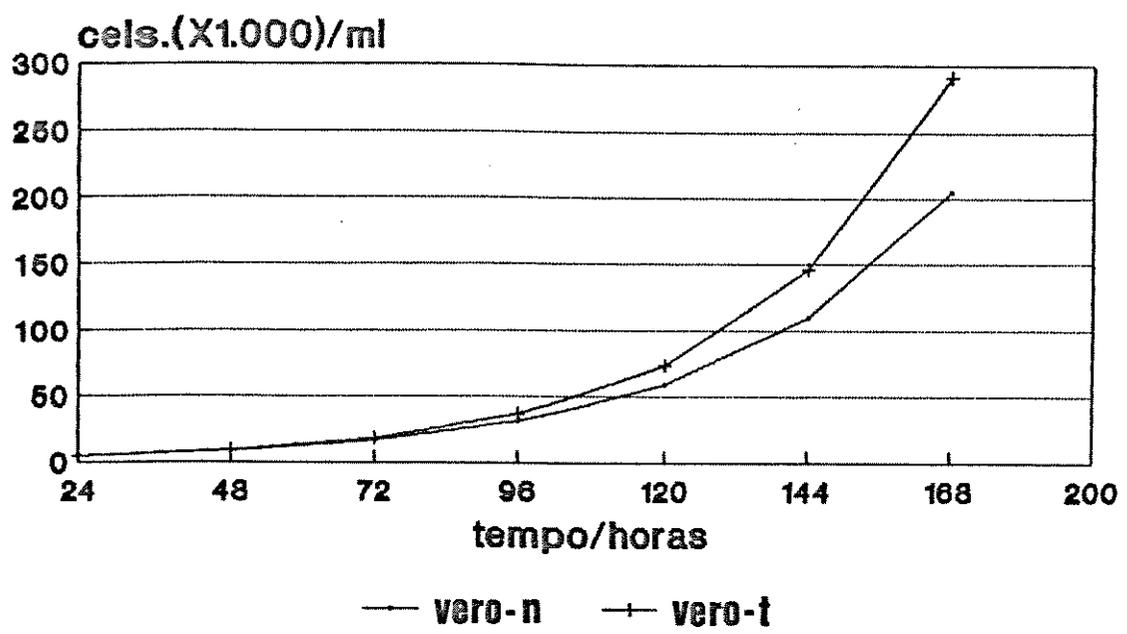


GRÁFICO I: - Curva de crescimento da fase proliferativa das populações Vero-N e Vero-T construída a partir dos valores ajustados.

3.2 - Tempo de Duplicação:

Os valores de tempo de duplicação obtidos para as duas populações estudadas, segundo o método descrito por PASTAN, 1979, foram:

Tempo de duplicação Vero-N = 28,3 hs

Vero-T = 29,7 hs

Esses valores indicam que não ocorreram mudanças significativas entre os tempos de duplicação das duas populações celulares.

4 - CURVA DE ADESAO:

Os resultados obtidos, relativos à média do número de células aderidas por campo, contadas em dez campos aleatórios de cada uma das três placas por tempo de cultura, encontram-se no quadro II. A curva de adesão das duas populações encontra-se representada no gráfico II.

Esses resultados indicam que a população Vero-T apresentou menores índices de adesão em relação a Vero-N.

Quadro II - Curva de adesão:		
Tempo de Cultura (minutos)	Nº de cels aderidas/campo	
	Vero-N	Vero-T
10	3.10	0.56
20	7.73	2.60
40	12.20	7.33
60	17.33	13.66
80	14.96	11.56
100	14.53	11.73

Quadro II - Curva de Adesão das células da população Vero-N e Vero-T.

Gráfico II - Adesão:

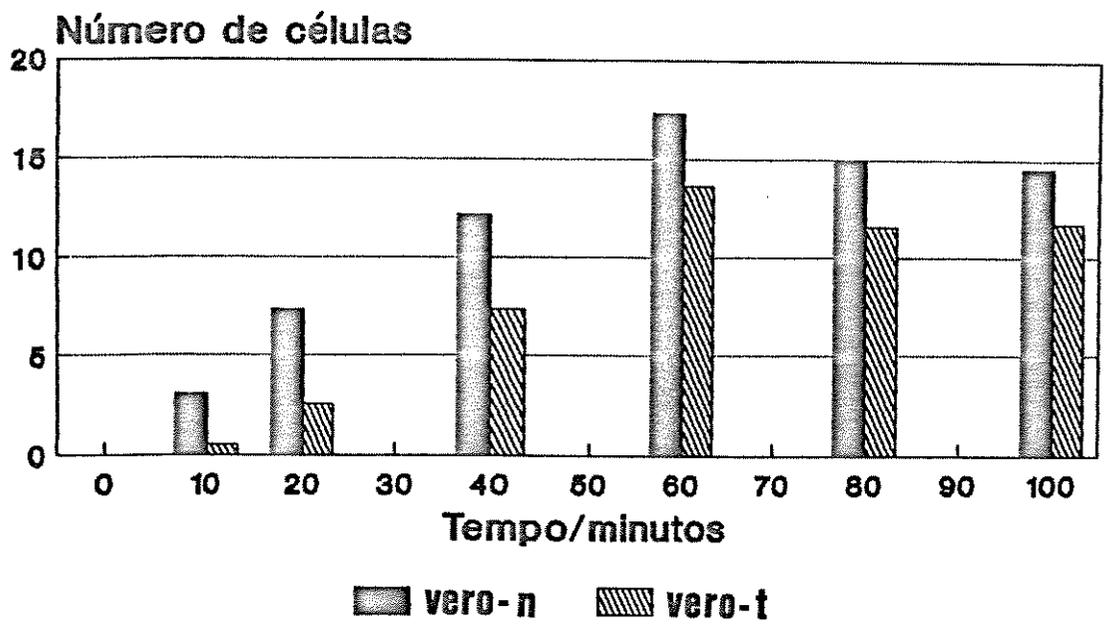


GRÁFICO II: - Histograma de adesão das populações Vero-N e Vero-T construída a partir da média do número de células aderidas/campo em função do tempo.

5 - CULTURA EM MEIO SEMI-SÓLIDO DE ÁGAR:

Em ambos os métodos utilizados neste trabalho para o cultivo celular em meio semi-sólido de ágar, utilizou-se como cultura controle a linhagem estabelecida a partir de células de mieloma de camundongo, denominada "sp2", que cresce "in vitro" sem depender de ancoragem (Figura 08 e 09).

5.1 - Cultura em Meio semi-sólido de ágar - I:

No primeiro método de cultivo em meio semi-sólido de ágar utilizado, observou-se o crescimento das três linhagens celulares usadas, Vero-N, Vero-T e a linhagem "sp2". O crescimento foi observado em todas as dez placas de cultura semeadas para cada tipo celular.

Com a observação diária das placas, detectou-se nitidamente o início da formação de colônias celulares nas populações Vero-N e Vero-T com 48 horas de cultura (Figura 10 e 11).

As células da população Vero-N e Vero-T, continuaram a se dividir levando ao crescimento das colônias em meio semi-sólido de ágar. Com 96 horas de cultura, observou-se, além das colônias crescendo em suspensão, células que cresceram aderidas à superfície das placas de cultura (Figura 12 e 13).

A formação e crescimento de colônias celulares da linhagem "sp2", ocorreu mais lentamente do que nas demais, sendo

que as primeiras colônias foram detectadas com aproximadamente 96 horas de cultivo (Figuras 14 e 15).

5.2 - Meio Semi-sólido de ágar - II:

No segundo método de cultura em meio semi-sólido de ágar utilizado, observou-se um crescimento positivo somente na população Vero-T (Figura 18), enquanto a população Vero-N e a linhagem "sp2", não apresentaram a formação de colônias celulares (Figura 16 e 17).

O início da formação de colônias celulares em meio semi-sólido de ágar da população Vero-T, foi observado no oitavo dia de cultura em todas as dez placas semeadas, porém, as colônias eram de tamanho menor, comparadas ao procedimento anterior, e cresceram lentamente por um pequeno período de tempo, de aproximadamente três dias (Figura 18)

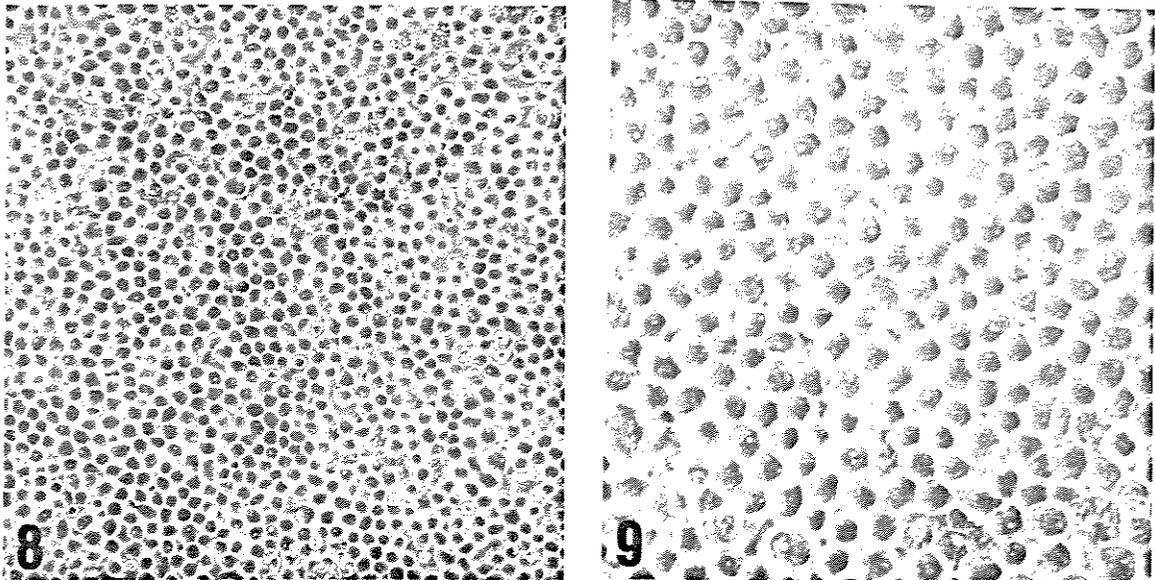


Figura 08 e 09 - Células da linhagem estabelecida de mieloma de camundongo denominada "sp2", com 96 horas de cultura, crescendo em suspensão de ancoragem, em meio Ham-F10 suplementado com 5% de soro fetal bovino. Contraste de fase. Aumento: 100x e 400x respectivamente.

10

Figura 10 - Células da população Vero-N, com 48 horas de cultura em meio semi-sólido de ágar I, apresentando colônias celulares em crescimento (→). Contraste de fase. Aumento: 200x.

11

Figura 11 - Células da população Vero-T, com 48 horas de cultura em meio semi-sólido de ágar I, apresentando colônias celulares em crescimento (→). Contraste de fase. Aumento: 200x.

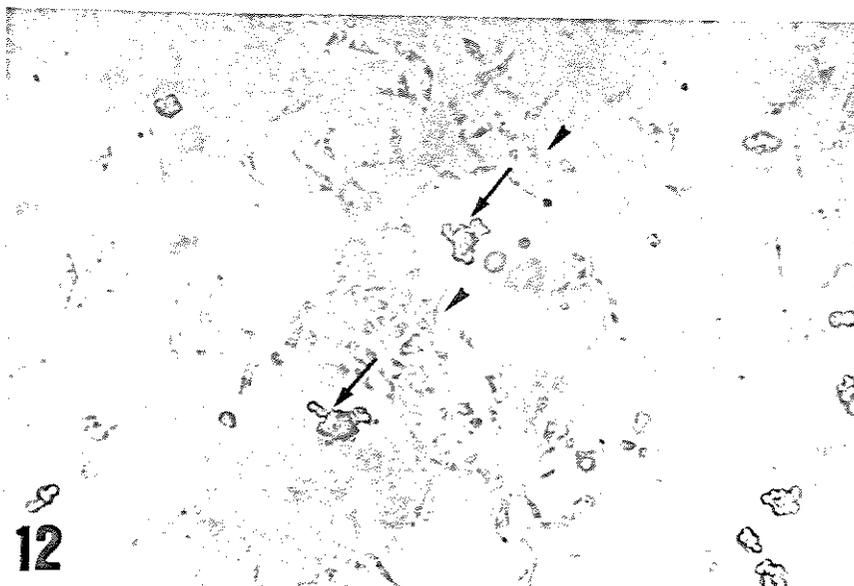


Figura 12 - Cultura de 96 horas em meio semi-sólido de ágar I da população Vero-N, apresentando colônias celulares crescendo em suspensão (►) e células crescendo aderidas à superfície da placa (→). Contraste de fase. Aumento: 100x.

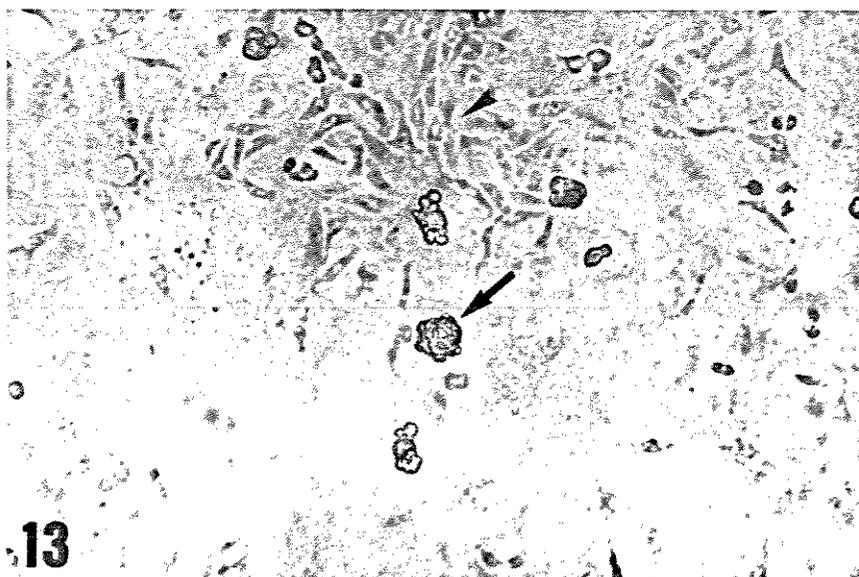


Figura 13 - Cultura de 96 horas em meio semi-sólido de ágar I da população Vero-T, apresentando colônias celulares crescendo em suspensão (►) e células crescendo aderidas à superfície da placa (→). Contraste de fase. Aumento: 100x.

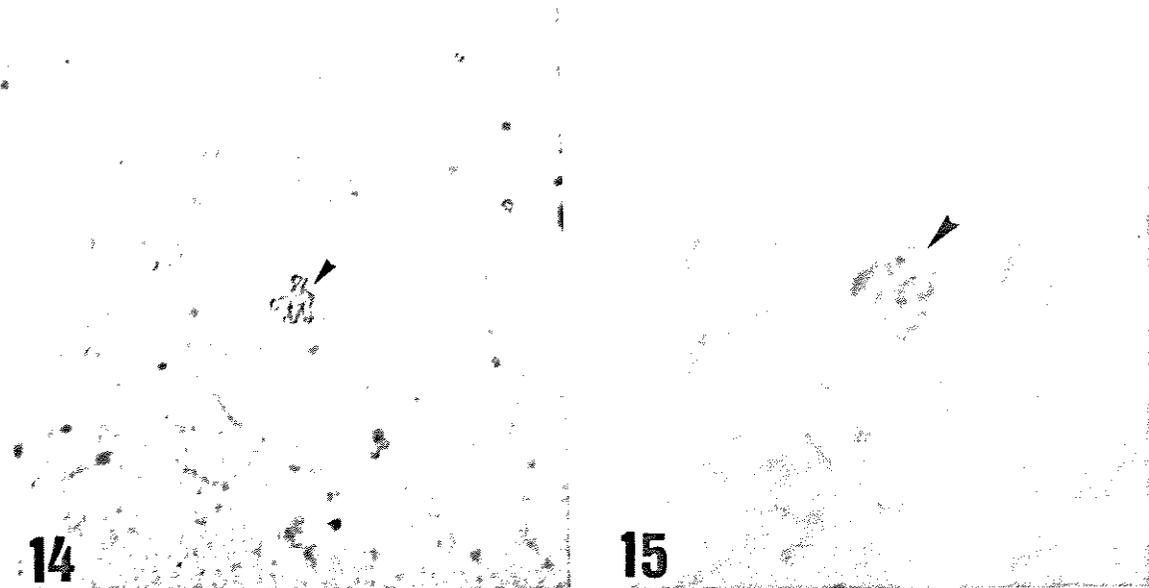


Figura 14- Cultura de 96 horas em meio semi-sólido de ágar I da linhagem estabelecida "sp2", apresentando colônias celulares crescendo em suspensão (►). Contraste de fase. Aumento: 100x.

Figura 15 - Células da linhagem "sp2", com 96 horas de cultura em meio semi-sólido de ágar I, apresentando colônias celulares em crescimento (►). Contraste de fase. Aumento: 400x.

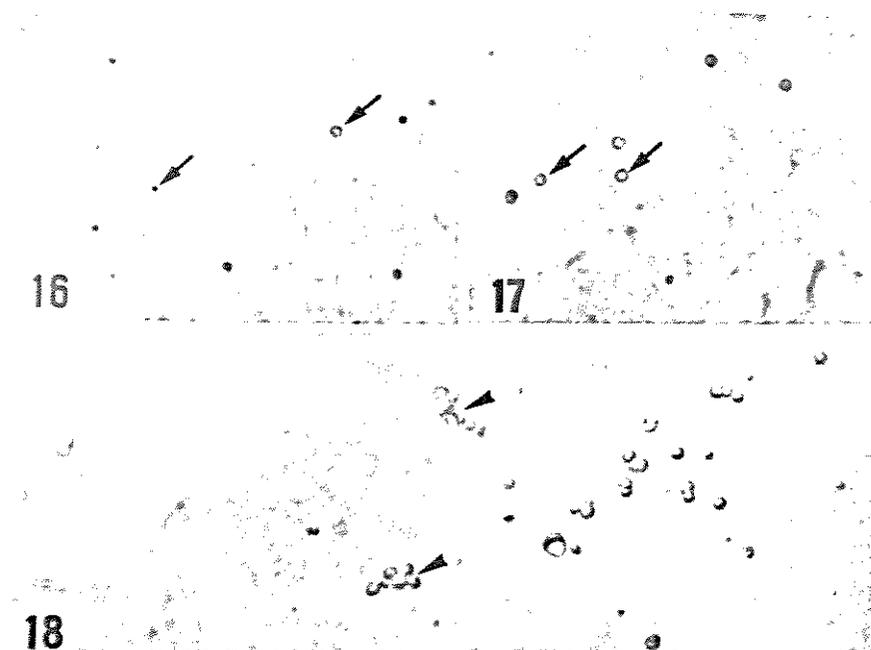


Figura 16 - Células da linhagem estabelecida "sp2", com oito dias de cultura em meio semi-sólido de ágar II, sem a formação de colônias celulares, apresentando apenas células isoladas (→). Contraste de fase. Aumento: 100x.

Figura 17 - Células da população Vero-N, com oito dias de cultura em meio semi-sólido de ágar II, sem a formação de colônias celulares, apresentando apenas células isoladas (→). Contraste de fase. Aumento: 100x

Figura 18 - Células da população Vero-T, com oito dias de cultura em meio semi-sólido de ágar II, com a formação de colônias celulares (➤). Contraste de fase. Aumento: 100x.

6 - CITOGENÉTICA:

6.1 - Número Modal de Cromossomos:

Quanto à determinação do número modal (Quadro - III), observou-se que 58% das células da população Vero-N apresentaram 54 cromossomos, enquanto 47% das células da população Vero-T apresentaram 56 cromossomos.

Esses dados indicam que a população Vero-T, quando comparada a Vero-N, apresentou dois cromossomos extras presentes em 47% das células analisadas.

6.2 - Índice Mitótico:

Os dados obtidos quanto ao índice mitótico foi semelhante entre as duas populações Vero-N e Vero-T (Quadro - IV).

6.3 - Frequência de Poliploidia:

A população Vero-N, apresentou frequência de poliploidia igual a 5% (Quadro V), enquanto que na população Vero-T a frequência encontrada foi de 19%, sendo este valor maior do que o encontrado para a linhagem inicial. Nas culturas sobre lâminulas, a população Vero-N caracterizou-se por apresentar metáfases

bipolares normais (Figura 19). A população Vero-T, além de metáfases bipolares, apresentou metáfases tripolares anormais (Figura 20), as quais indicam também alteração do grau de ploidia da célula.

6.4 - Análise do Cariótipo:

Pela análise do cariótipo das duas populações Vero-N e Vero-T (Figuras 21 a 26), observou-se que ambas apresentavam monossomia dos pares cromossômicos 11, 21, 24 e 30 e uma constrição secundária no braço longo do par 25. O par cromossômico número um não se encontra indicado nos cariótipos por ser considerado como par de cromossomos sexuais, conforme o trabalho de BIANCHI & AYRES, 1971.

A população normal Vero-N, apresentou monossomia dos pares cromossômicos 8 e 27 (Figura 21 e 22), enquanto a população transformada Vero-T, apresentou os dois homólogos correspondentes (Figura 23, 24 e 25). O par cromossômico 22, na população Vero-N, apresentou sempre uma deleção na região distal de um dos homólogos (Figura 21 e 22), enquanto que na população Vero-T, esse par apresentou-se inconstante nas metáfases analisadas (Figura 23, 24 e 25).

Quadro III - Número Modal de Cromossomos		
Número de Cromossomos	Número de células	
	Vero-N	Vero-T
51	03	05
52	04	07
53	13	05
54 ▶	58 ▶	15
55	04	11
56 ▶	14	47 ▶
57	02	00
58	01	00
59	01	00

Quadro III: - Número Modal de Cromossomos. O quadro acima indica o número de cromossomos das células das populações Vero-N e Vero-T. O número modal encontrado foi de 54 e 56 cromossomos, respectivamente (▶).

Quadro IV - Índice Mitótico:		
	Vero-N	Vero-T
Total de cels.	1000	1000
Cels. em divisão	62	65
Índice Mitótico	6,2%	6,5%

Quadro IV - Índice Mitótico das populações celulares Vero-N e Vero-T.

Quadro V - Frequência de Poliploidia:		
	Vero-N	Vero-T
Total de cels.	1000	1000
Cels. poliplóides	50	190
Freq. Poliploidia	5,0%	19,0%

Quadro V - Frequência de Poliploidia encontrada nas populações Vero-N e Vero-T.

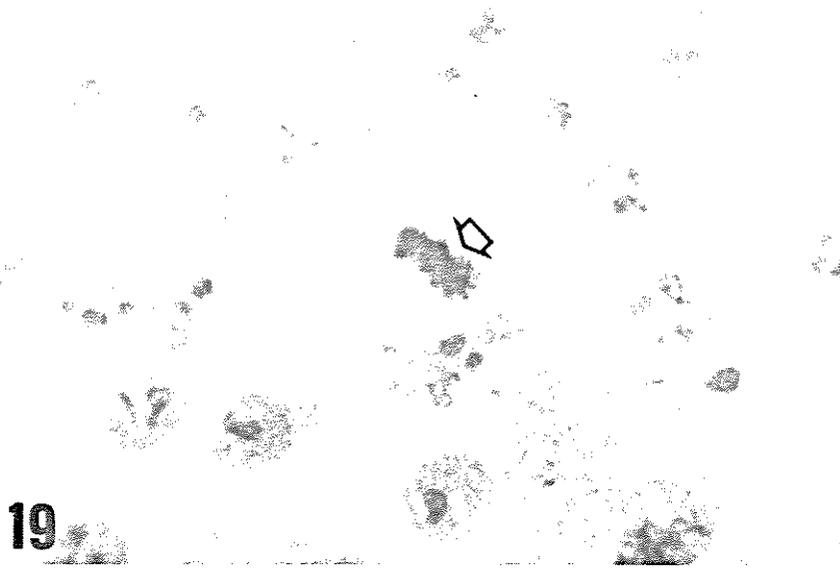


Figura 19 - Metáfase bipolar normal da população Vero-N em cultura sobre laminula (). Aumento: 400x.

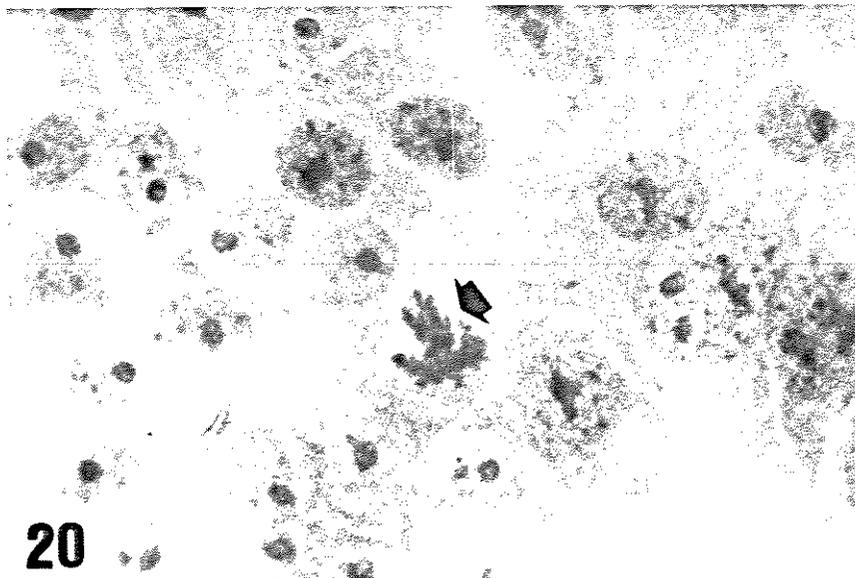


Figura 20 - Metáfase tripolar anormal, poliplóide, da população Vero-T em cultura sobre laminula (). Aumento: 400x.

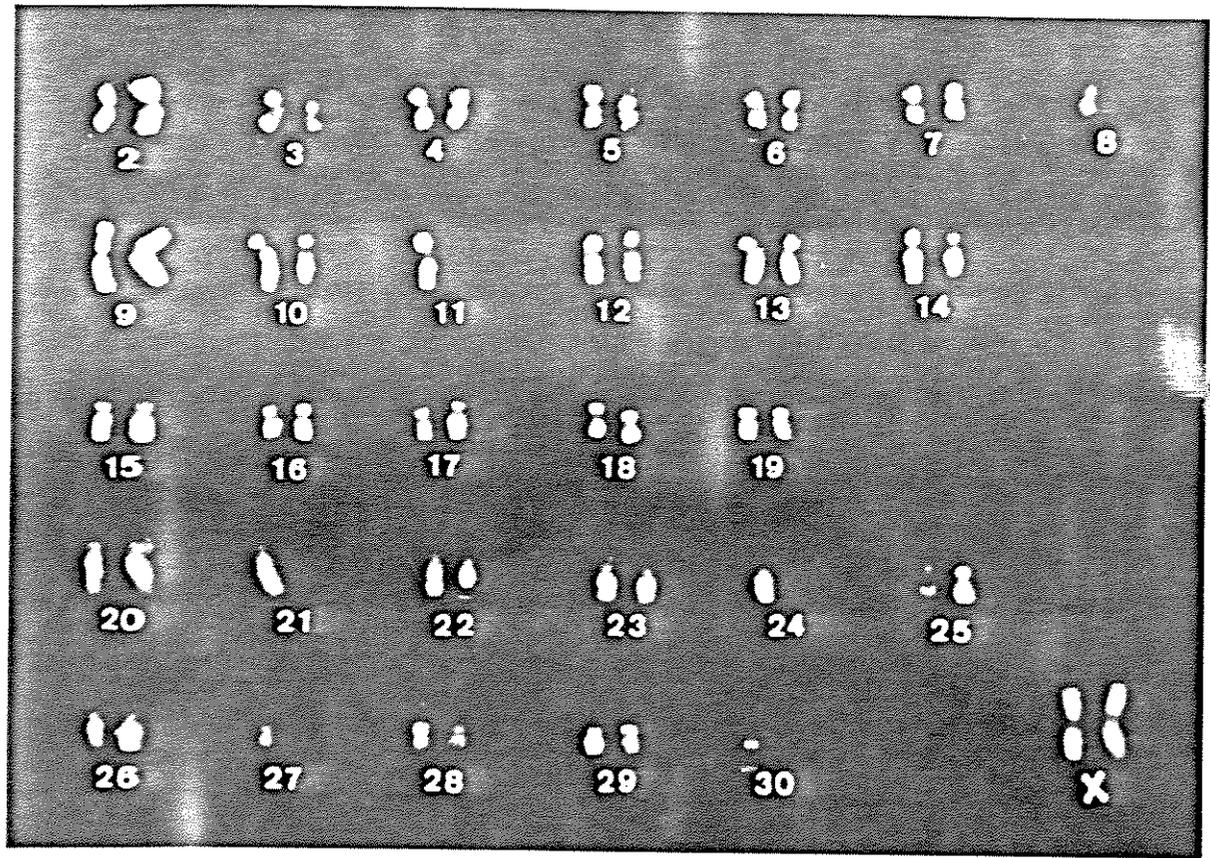
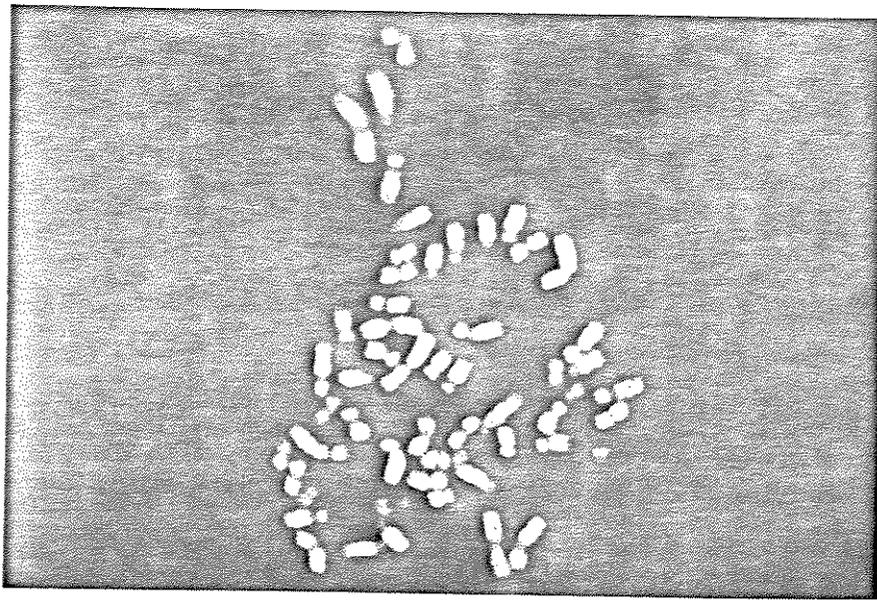


Figura 21 - Cariótipo da população Vero-N: 54,XX; -8, -11, -21, -24, -27 e -30; apresentando deleção na região distal do braço longo do cromossomo 22 e uma constrição secundária no braço longo do par 25. Aumento: 1800x.

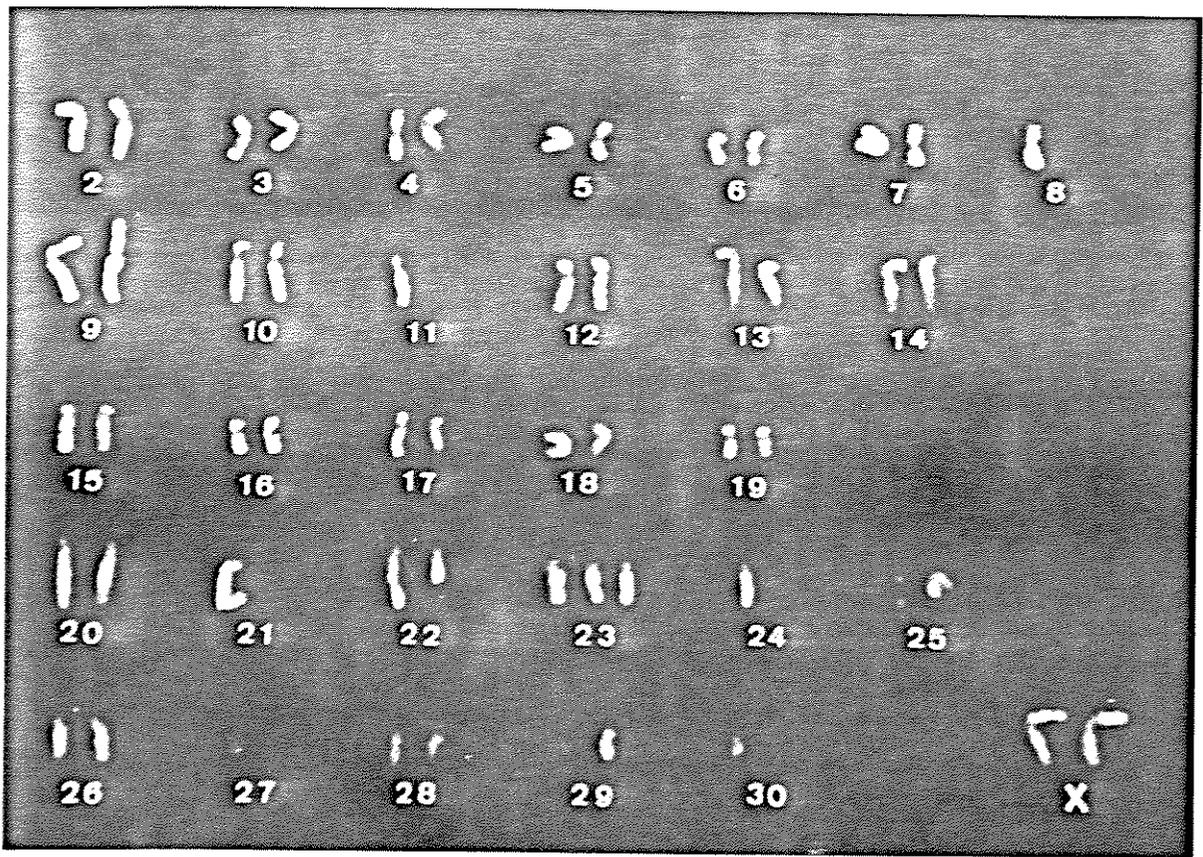
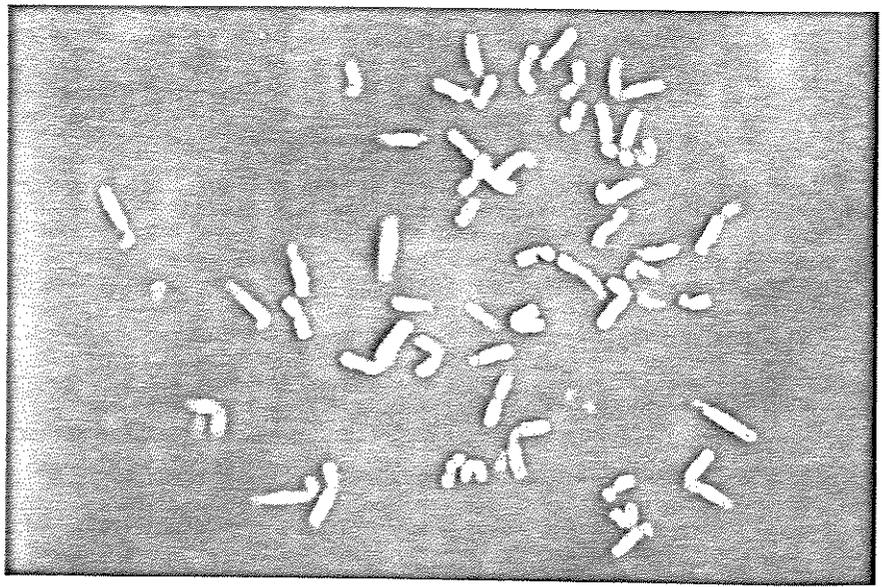


Figura 22 - Cariótipo da população Vero-N: 55,XX; -8, -11, -21, -24, -27 e -30; apresentando trissomia do 23, deleção na região distal do braço longo do cromossomo 22 e uma constrição secundária no braço longo do par 25. Aumento: 1800x.

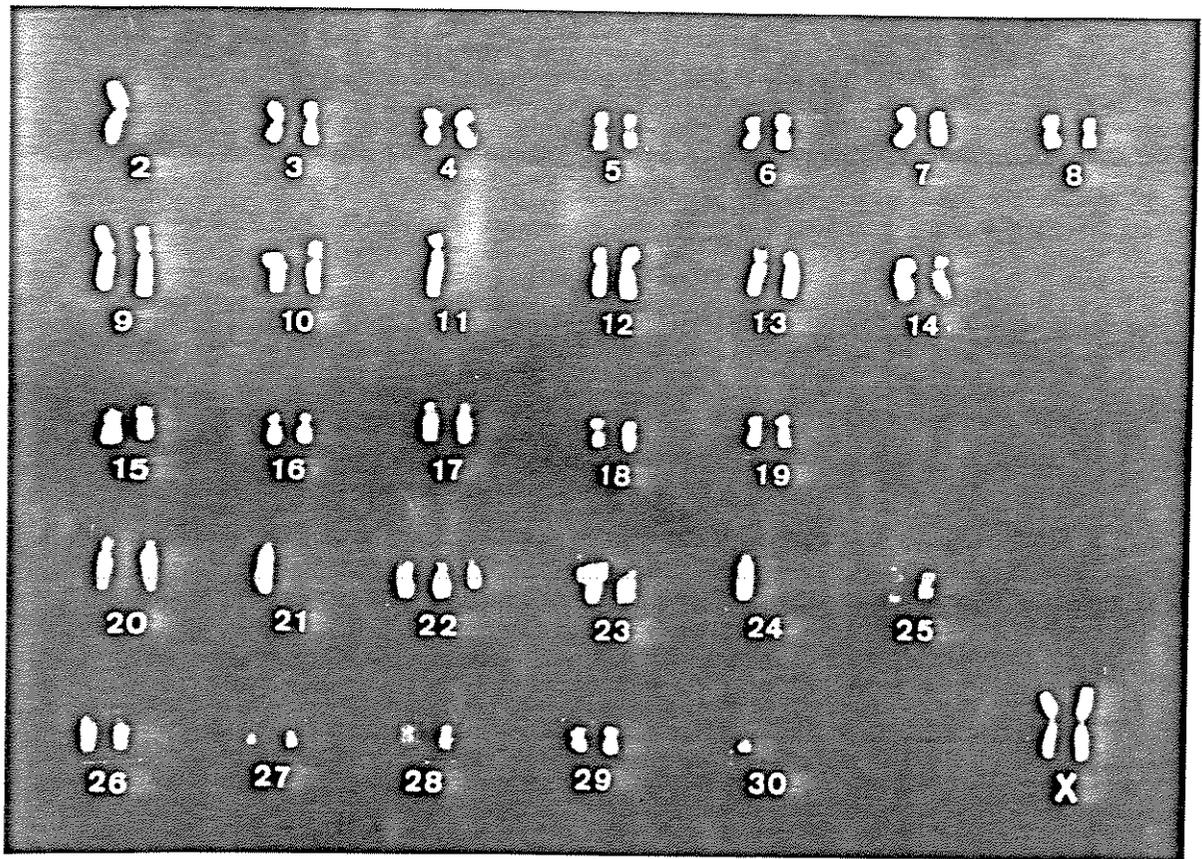
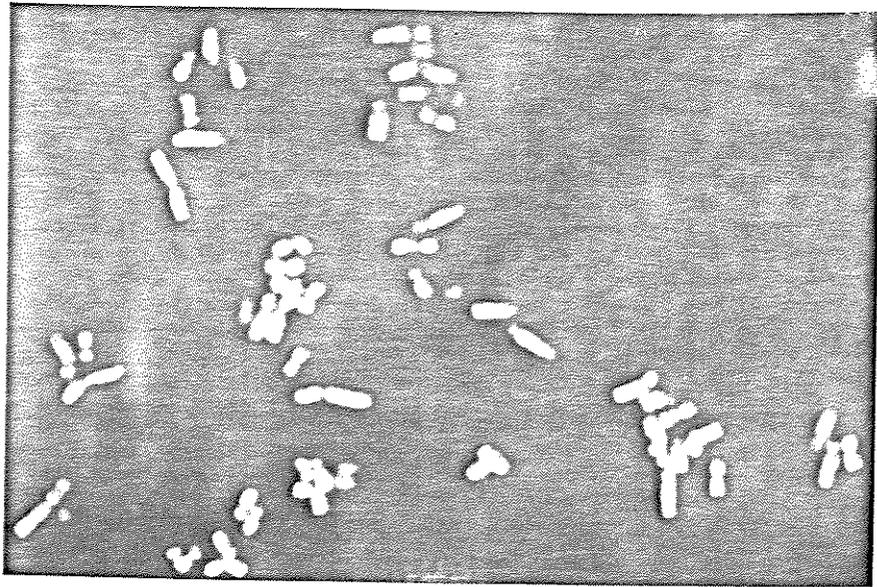


Figura 23 - Cariótipo da população Vero-T: 56,XX; -2, -11, -21, -24 e -30; apresentando trissomia do 22 e uma constrição secundária no braço longo do par 25. Aumento: 1800x.

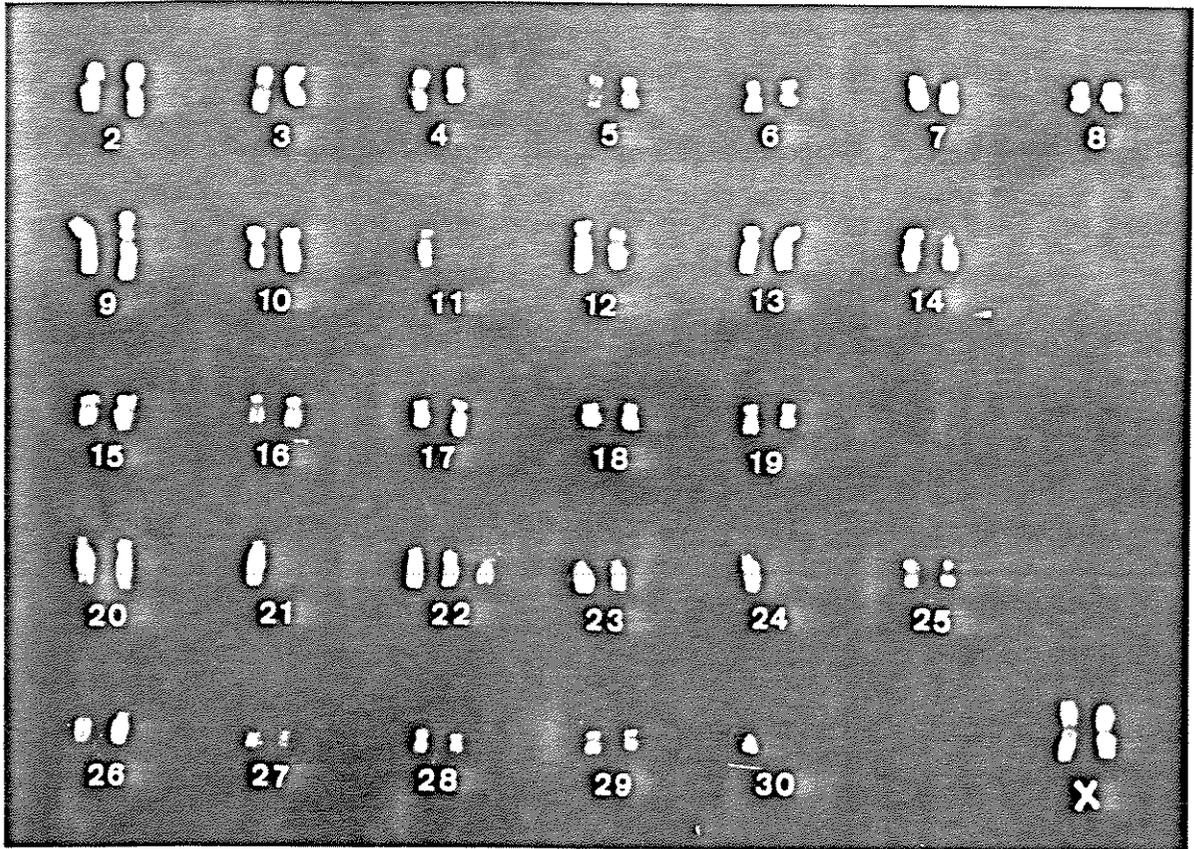
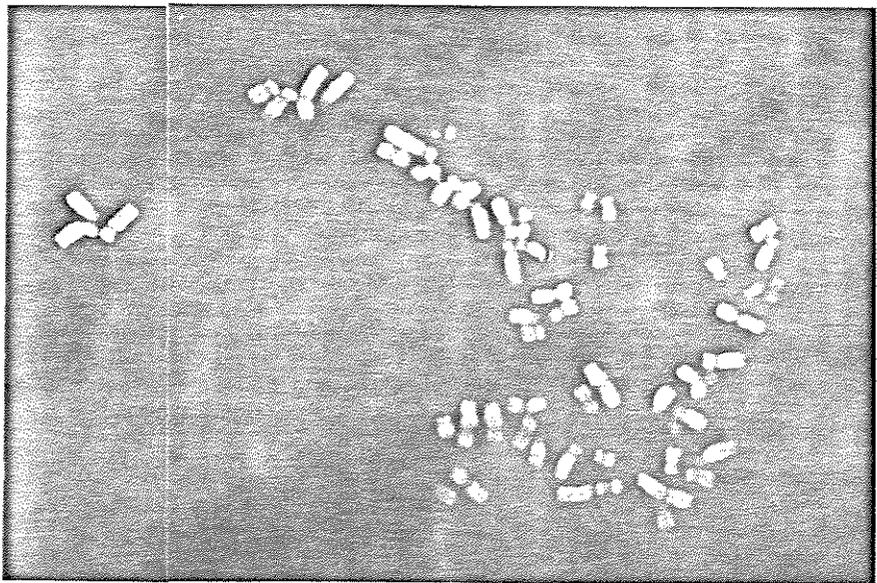


Figura 24 - Cariótipo da população Vero-T: 57,XX; -11, -21, -24 e -30; apresentando trissomia do 22 e uma constrição secundária no braço longo do par 25. Aumento: 1800x.

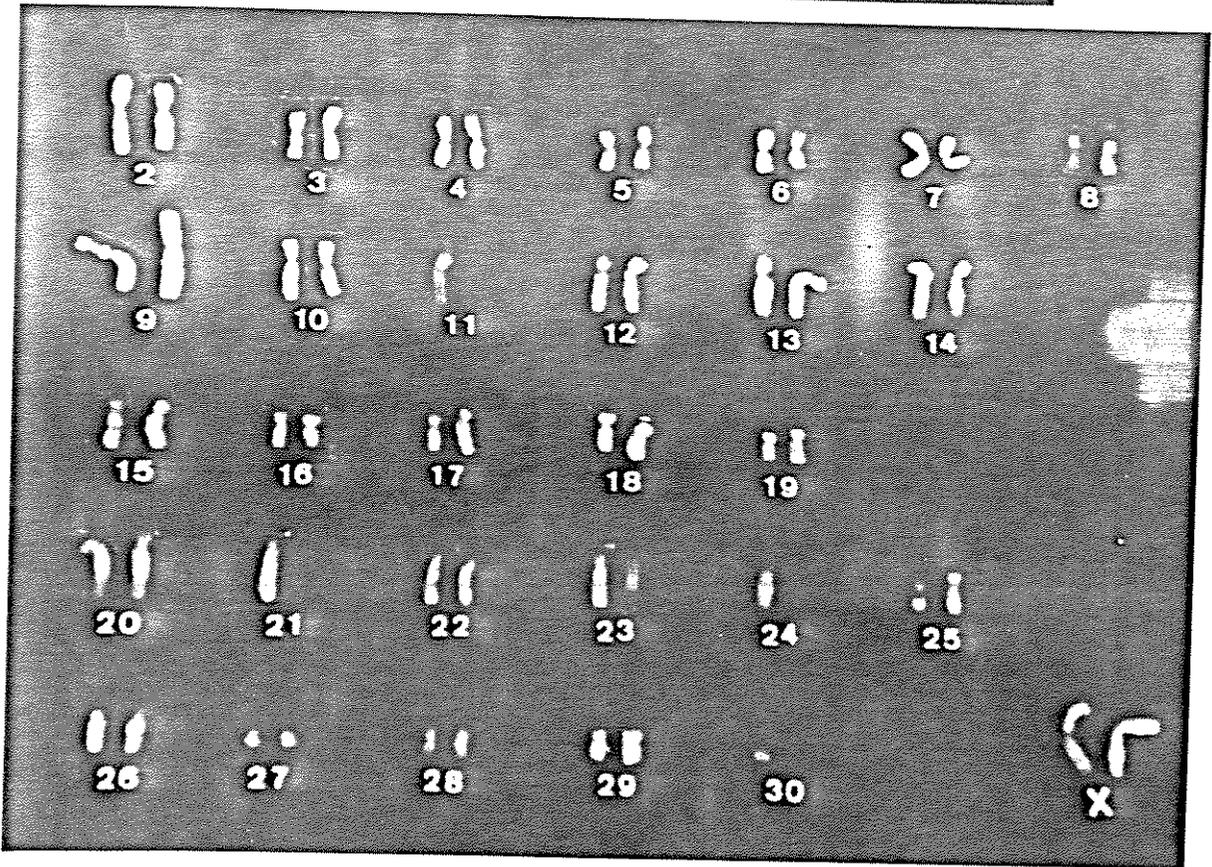
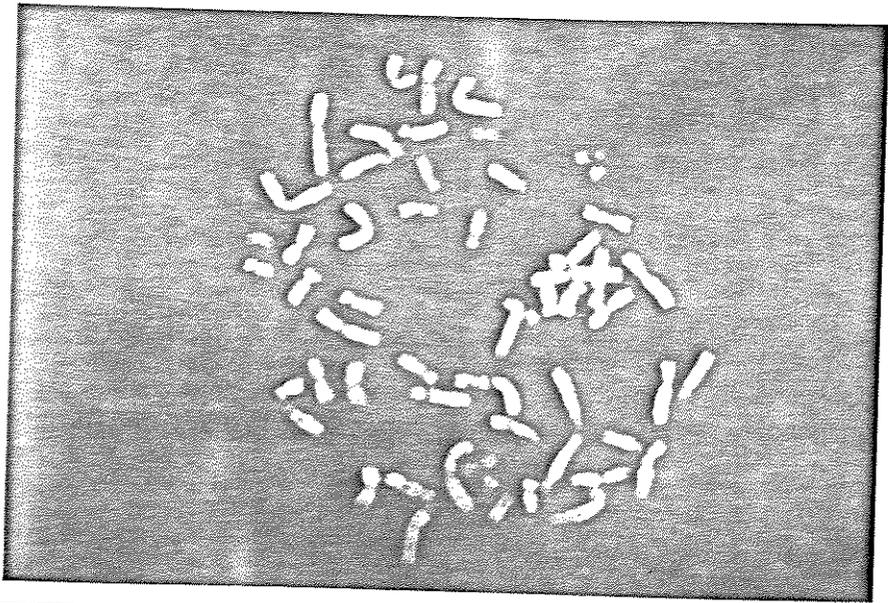


Figura 25 - Cariótipo da população Vero-T: 56,XX; -11, -21, -24 e -30; apresentando uma constrição secundária no braço longo do par 25. Aumento: 1800x.

7 - CITOQUÍMICA:

7.1 - Xilidine Ponceau - pH 2,5:

Submetidas a coloração com Xilidine Ponceau a pH 2,5, as células da população Vero-N apresentaram, quando observadas ao microscópio de luz em menor aumento, um padrão de coloração homogêneo (Figura 26). As células da população Vero-T, diferentemente dessas, apresentaram um padrão heterogêneo, com algumas regiões da camada celular mais intensamente coradas do que outras (Figura 27).

As células da população Vero-N submetidas a coloração com Xilidine Ponceau - pH 2,5, apresentaram citoplasma e núcleo fracamente corados e nucléolos evidentes (Figura 28). As células da população Vero-T, apresentaram citoplasma, núcleos e nucléolos mais intensamente corados do que na população Vero-N (Figura 29). A camada celular da população Vero-T mostrou regiões onde parece haver concentração de material extracelular, apresentando-se fracamente coradas e com aspecto finamente granular (Figura 29).

7.2 - Reação de P.A.S.:

Submetidas a reação de P.A.S. as células da população Vero-N apresentaram, quando observadas ao microscópio de luz em menor aumento, um padrão de coloração homogêneo (Figura 30). As

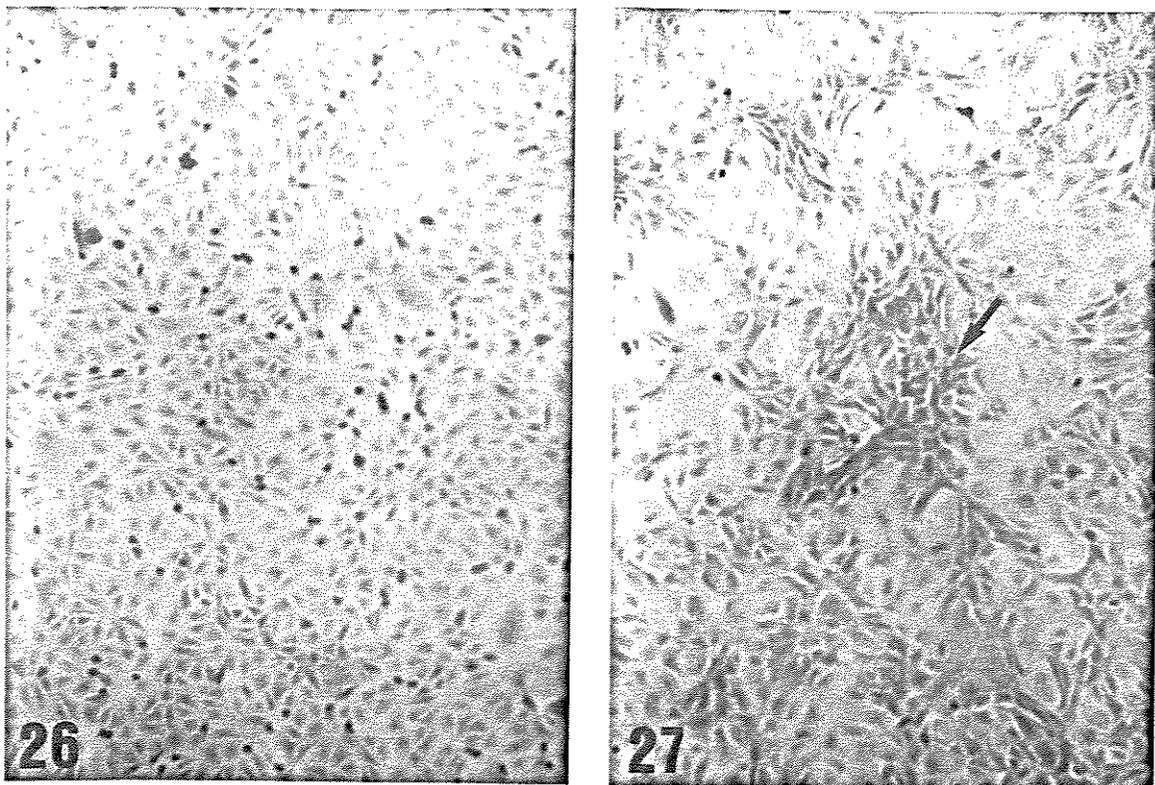


Figura 26 - Camada confluyente da população Vero-N com 72 horas de cultura sobre lamínula, submetida a reação com Xilidine Ponceau - pH 2,5, apresentando padrão de coloração homogêneo. Aumento: 100x.

Figura 27 - Camada confluyente da população Vero-T com 72 horas de cultura sobre lamínula, submetida a reação com Xilidine Ponceau - pH 2,5, apresentando padrão de coloração heterogêneo com regiões mais intensamente coradas (→). Aumento: 100x.

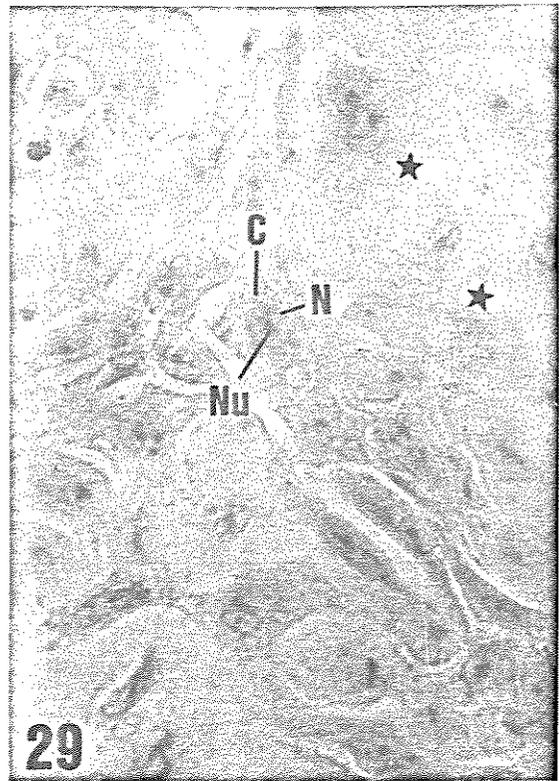
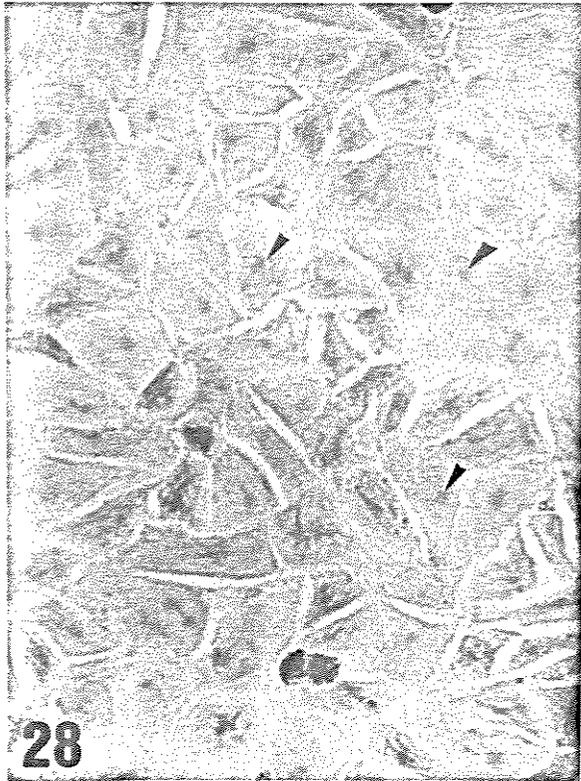


Figura 28 - Camada confluenta da população Vero-N com 72 horas de cultura sobre lamínula, submetida a reação com Xilidine Ponceau a pH 2,5, apresentando citoplasma e núcleo fracamente corados e nucléolos evidentes (▶). Aumento: 400x.

Figura 29 - Camada confluenta da população Vero-T com 72 horas de cultura sobre lamínula, submetida a reação com Xilidine Ponceau a pH 2,5, apresentando citoplasma (C), núcleos (N) e nucléolos (Nu) mais intensamente corados e regiões onde parece haver concentração de material extracelular (★). Aumento: 400x.

células da população Vero-T, ao contrário das Vero-N, apresentaram um padrão heterogêneo, com algumas regiões da camada celular mais intensamente coradas que outras (Figura 31).

As células da população Vero-N, submetidas à reação com P.A.S., apresentaram citoplasma fracamente corado com aspecto granular, enquanto os núcleos e os nucléolos não se coraram (Figura 32). As células da população Vero-T apresentaram citoplasma com aspecto bastante granular e intensamente corado, enquanto os núcleos e os nucléolos não se coraram (Figura 33).

8 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS:

A concentração de proteínas totais presentes no extrato celular da população Vero-N foi 8,7 ug/ul, enquanto no extrato da população Vero-T observou-se uma concentração de proteínas totais significativamente maior de 21 ug/ul.

9 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS:

Analisando os padrões eletroforéticos dos extratos celulares da população Vero-N e Vero-T, verificou-se algumas variações que podem ser observadas na Figura 34; onde, 1 - padrão de peso molecular; 2 - soro albumina bovina; 3 - extrato celular da população Vero-N com 2-Me; 4 - extrato celular da população

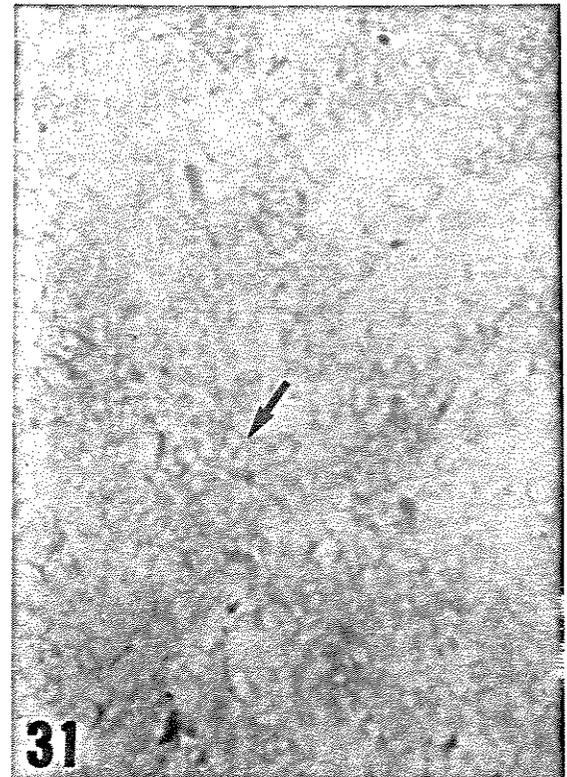
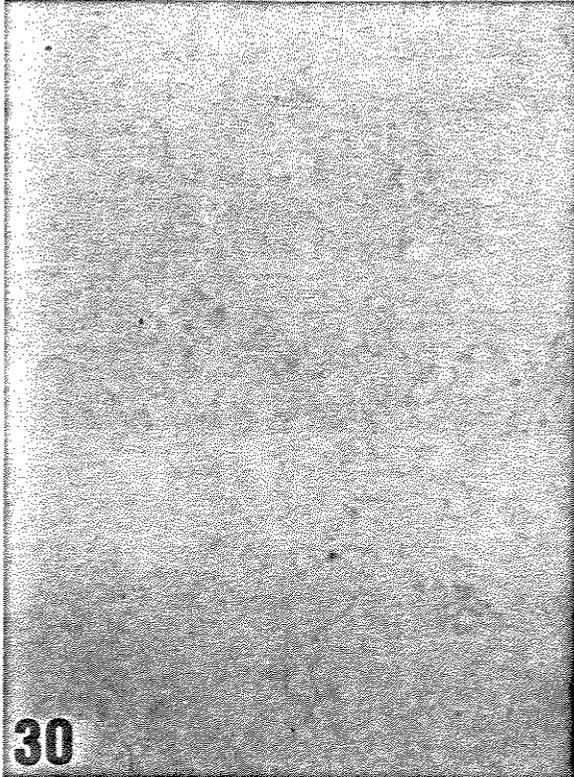


Figura 30 - Camada confluyente da população Vero-N com 72 horas de cultura sobre laminula, submetida à reação de P.A.S., apresentando padrão de coloração homogêneo. Aumento: 100x.

Figura 31 - Camada confluyente da população Vero-T com 72 horas de cultura sobre laminula, submetida à reação de P.A.S., apresentando padrão de coloração heterogêneo, com regiões da camada celular mais intensamente coradas (—→). Aumento: 100x.

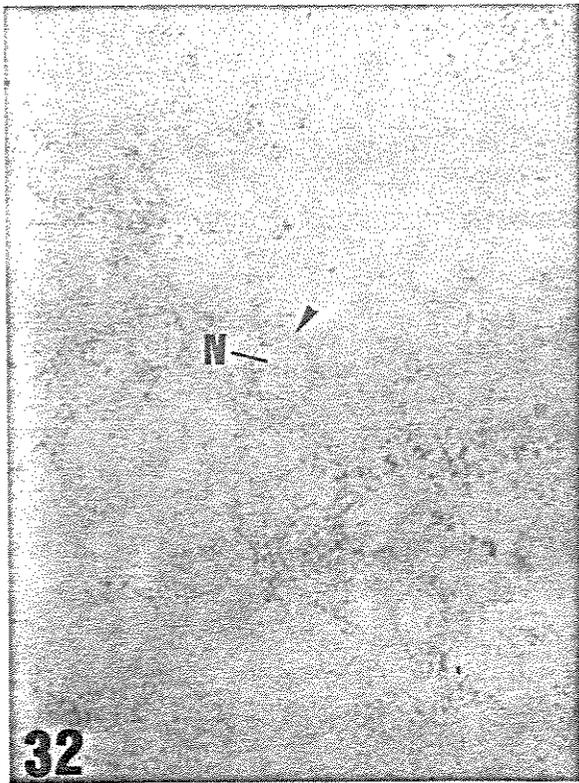


Figura 32 - Camada confluyente da população Vero-N com 72 horas de cultura sobre laminula, submetidas à reação de P.A.S., apresentando citoplasma com aspecto granular fracamente corado (►) e núcleos e nucléolos não corados (N). Aumento: 400x.

Figura 33 - Camada confluyente da população Vero-T com 72 horas de cultura sobre laminula, submetidas à reação de P.A.S., apresentando citoplasma com aspecto granular intensamente corado (►) e núcleos e nucléolos não corados (N). Aumento: 400x.

Vero-N sem 2-Me; 5 - extrato celular da população Vero-T com 2-Me e 6 - extrato da população Vero-T sem 2-Me.

A população Vero-T, tanto na presença quanto na ausência do 2-Me, apresentou duas proteínas com peso molecular de 78 e 16 kDa respectivamente, que estão menos evidentes na população Vero-N.

Em Vero-N, com e sem 2-Me, observou-se a presença de uma proteína com 100 kDa fracamente corada, que está ausente na população Vero-T.

A diferença mais significativa entre o padrão de proteínas das duas populações, refere-se a uma proteína de 36 kDa bastante evidenciada em Vero-T (coluna 5 e 6), com e sem 2-Me, e ausente na população Vero-N (coluna 3 e 4).

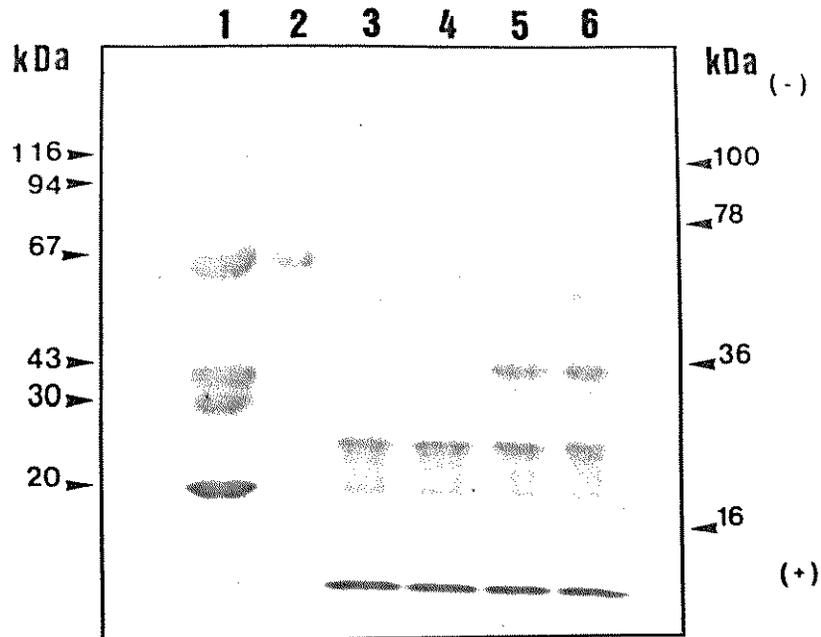


Figura 34 - SDS-PAGE (10% de concentração de acrilamida) dos extratos celulares da população Vero-N e Vero-T. 1 - padrão de PM; 2 - B.S.A; 3 - extrato celular Vero-N com 2-Me; 4 - extrato celular Vero-N sem 2-Me; 5 - extrato celular Vero-T com 2-Me e 6 - extrato celular Vero-T sem 2-Me.

Condições de corrida: 25 mA, 100 V, durante quatro horas a temperatura ambiente. Coloração: Coomassie Blue.

IV - DISCUSSÃO:

Diferentes manifestações da transformação têm sido observadas em uma variedade de sistemas celulares e, descritas em forma de alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas. A transformação pode causar uma série de alterações nas interações célula-célula, célula-substrato e célula-meio, levando a mudanças no arranjo, padrão de crescimento e densidade celular. Este comportamento social anormal é convenientemente chamado transformação morfológica (SMETS, 1980).

Geralmente, considera-se que as células normais em cultura permanecem em monocamadas, enquanto as células transformadas perdem a inibição por contato podendo passar a crescer empilhadas (HEIDELBERGER & IYPE, 1966). Assim, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos, nos quais observa-se a perda de inibição por contato em tipos celulares transformados por ação viral, carcinógenos químicos, irradiação e outros (BOREK & SACHS, 1966; BOREK, 1972; HEIDELBERGER & IYPE, 1966; ABERCROMBIE, 1979), assim como em células retiradas de tumores malignos e mantidas em cultura (PERSKY et alii, 1989; SRIDHAR et alii, 1989; EBERT et alii, 1990; BRIDGES et alii, 1991). Essas células apresentam principalmente alterações de crescimento associadas ao potencial de invasividade

e metástase.

Através do estudo das alterações comportamentais, observou-se que a população Vero-N cresce em cultura formando monocamadas e uma vez atingida a confluência, se não for efetuado o repique ou subcultivo, as células param de se dividir, entram em senescência e morrem. As células da população Vero-T, surgida a partir de Vero-N, entretanto, continuam a se multiplicar mesmo após as culturas terem atingido a confluência formando agregados ou grumos celulares. Estas alterações de comportamento em cultura, observadas na população Vero-T, ajustam-se ao fenômeno de transformação morfológica descrito anteriormente, bem como indicam que a população Vero-T apresenta perda de inibição por contato.

O fato da população Vero-T apresentar crescimento mesmo após atingida a confluência celular, pode estar associado também à ação de fatores de crescimento. Classicamente estes fatores agem na célula via ativação de receptores transmembranares específicos e modificam o mecanismo regulador das proteínas no citoplasma o que afeta decisivamente o controle de proliferação e diferenciação, incluindo mudanças na expressão gênica e na reatividade a outros fatores. A produção de fatores de crescimento anormais, pode ter uma função decisiva na transformação e tumorigênese aumentando a taxa de proliferação e o grau de autonomia celular (CROSS & DEXTER, 1991).

Considerando que a população Vero-T mostrou diferenças nos aspectos comportamentais de sobrevivência e proliferação, é possível supor que nessas células os fatores de crescimento te-

nham sofrido alterações, ou estejam mais ativos pela presença de receptores ou de agentes estimulantes nessas culturas.

Embora as células normais tenham estrutura independente suficiente para manter suas próprias funções, as interações celulares são essenciais para a manutenção da homeostase do tecido e da sociedade celular. Contrariamente às células normais, as células transformadas e neoplásicas tornam-se rebeldes a esta sociedade celular organizada, diminuindo o controle entre células ou tecidos vizinhos (YAMASAKI, 1990), devido principalmente à mudanças estruturais, frequentemente associadas às junções celulares de comunicação, denominadas junções "gap", e ao citoesqueleto que se encontram alterados (BEN-ZE'EV, 1985).

Essas alterações do citoesqueleto são responsáveis por modificações na forma da célula (FOLKMAN & MOSCONA, 1978), além disso, vários autores têm descrito situações em que não só a geometria de uma célula mas também a configuração geométrica de uma população está intimamente associada com o crescimento e a diferenciação celular (FOLKMAN & GREENSPAN, 1975; FOLKMAN & MOSCONA, 1978). Considerando portanto, as afirmações desses autores, parece que a forma mais arredondada das células de tamanho superior ao padrão normal, observadas na monocamada de Vero-T, poderia também ser explicada por alterações do citoesqueleto nessas células, embora não tenhamos utilizado nenhuma técnica específica para esse tipo de avaliação.

A forma arredondada das células Vero-T foi observada também quando do crescimento em massas celulares. A análise dos cortes semi-finos desses grumos, mostrou células mais achatadas

estudos efetuados neste trabalho acerca da proliferação celular através da obtenção da curva de crescimento da fase proliferativa, determinação do tempo de duplicação e índice mitótico, não mostraram diferenças entre as duas populações celulares.

As modificações do citoesqueleto além de alterarem a forma celular afetam também a adesão das células ao substrato (BEN-ZE·EV, 1985). Quando a interação entre microtúbulos e filamentos intermediários é rompida, muitas mudanças são observadas com relação a organização dos microfilamentos e sua associação com as proteínas nas células neoplásicas. Estas mudanças incluem a desorganização da placa de adesão e seus componentes (vinculina e talina), o que interfere na função da fibronectina da superfície celular, reduzindo a adesão, levando a uma morfologia celular mais arredondada (BEN-ZE·EV, 1985). Assim, os menores índices de adesão apresentados pela população Vero-T quando comparada a Vero-N, poderiam ser interpretados desta forma.

Existem evidências de que a adesão desempenha uma importante, se não decisiva, função na invasão e metástase. A redução da adesão entre células cancerosas tem sido proposta como a causa para o descolamento de uma célula do tumor primário, desencadeando o processo metastático (ROOS, 1984).

Esta importante propriedade celular é mediada por um conjunto de interações entre receptores que se localizam na superfície celular e proteínas, incluindo a fibronectina, a laminina, a vitronectina e o colágeno presentes no meio extracelular (AKIYAMA et alii, 1989). Assim, mudanças na superfície celular são comumente observadas no fenótipo transformado. A alteração

mais sensível, associada à superfície celular, refere-se à diminuição ou perda das glicoproteínas (proteínas de alto peso molecular), fato esse, detectado independentemente por vários grupos de pesquisadores (VAHERI & MOSHER, 1978; HAYMAN et alii, 1981; ALITALO et alii., 1982; NERTMUT et alii, 1991).

Uma das proteínas que participa do processo de adesão é a fibronectina. Tem sido demonstrado que essa glicoproteína de peso molecular de 200.000-220.000, está presente em quantidades reduzidas na superfície celular após a transformação por agentes químicos ou por vírus (BLUMBERG et alii, 1976; HAYMAN et alii, 1981; ALITALO et alii, 1982; NERMUT et alii, 1991) e em células cultivadas obtidas de alguns tumores (HYNES, 1976; MURRAY, 1980). O decréscimo desta proteína pode ser devido à diminuição da síntese protéica na célula transformada ou à inabilidade desta célula de reter a fibronectina na superfície celular (HYNES & YAMADA, 1982).

Durante os últimos anos, pesquisadores têm analisado a expressão, a função e a estrutura da fibronectina. Estes estudos tem revelado que a fibronectina apresenta uma complexa estrutura molecular consistindo de múltiplos sítios específicos de ligação. Desta forma, o complexo fenômeno biológico no qual ela participa pode agora ser considerado em termos de sua estrutura (HYNES & YAMADA, 1982).

"In vivo" a fibronectina está presente na circulação, faz parte do estroma tecidual e está presente na superfície celular desempenhando importante função fisiológica, pois atua nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular (VAHERI &

MOSHER, 1978). Fibronectina do plasma e celular, embora distinguíveis, são muito similares em estrutura e propriedades. "In vitro" a fibronectina é sintetizada por uma ampla variedade de células, sendo os fibroblastos e células endoteliais as maiores produtoras, embora outros tipos celulares incluindo algumas células epiteliais, sintetizem fibronectina em baixa quantidade (YAMADA & OLDEN, 1978; HYNES & YAMADA, 1982).

A maioria das células pode sintetizar suas próprias proteínas de adesão, mas em culturas de curta duração ou quando um inibidor da síntese protéica está presente no meio, a adesão é estimulada pelo soro e pela fibronectina nele presente (KLEINMAN et alii, 1981). Em cultura, a fibronectina presente no meio de crescimento pode mediar a fixação da célula ao substrato, juntamente com a fibronectina sintetizada pelas células. A falha das células transformadas em sintetizar ou ligar fibronectina é paralela, em alguns sistemas, a falhas na síntese de colágeno e/ou proteoglicanos, o que pode levar ao aparecimento do fenótipo transformado em cultura e ao comportamento maligno de células neoplásicas "in vivo" (PARDEE, 1975; VAHERI & MOSHER, 1978). Células que sintetizam sua própria fibronectina não requerem fibronectinas externas para adesão e espalhamento, mas algumas células que produzem pouca ou nenhuma fibronectina, podem responder à adição desta. Entre estas células algumas são oncogenicamente transformadas e produzem reduzidas quantidades de fibronectina como uma consequência da transformação (HYNES & YAMADA, 1982).

A fibronectina atua nas células via receptores específicos. Os receptores de fibronectina de fibroblastos têm sido pu-

rificados, clonados e sequenciados. Na sua superfície externa, encontra-se o sítio de ligação com alta afinidade pela sequência Arg-Gly-Asp-Ser, que é o segmento encontrado na fibronectina. A fibronectina secretada pelas células em cultura, apresenta sítios de ligação para o colágeno presente na matriz extracelular, e tende a se concentrar em pequenos pontos onde as células irão aderir ao substrato. Na adesão celular participam as fibras de "stress", ricas em actina, que irão manter a forma e a adesão da membrana plasmática, onde essa se liga ao substrato. Várias proteínas ligantes da actina como a vinculina e a talina são abundantes nessas regiões (VAHERI & MOSHER, 1978).

Resumidamente, o processo de adesão celular normal ocorre pela ligação das duas sub-unidades transmembranares do receptor de fibronectina, à molécula de fibronectina na face externa da membrana, e à talina na face citoplasmática. A talina se liga à vinculina e esta, provavelmente, se liga diretamente aos filamentos de actina. A fibronectina, por sua vez, liga-se a fibras de colágeno e com alguns proteoglicanos (DARNEL, 1990).

Para a obtenção das curvas de adesão da população Vero-N e Vero-T, utilizou-se meio de cultura suplementado com 5% de soro fetal bovino. O soro, como já mencionado anteriormente, possui fibronectina e outras proteínas associadas que podem participar do processo de adesão. Assim, considerando a complexidade do processo, os menores índices de adesão observados em Vero-T, podem não estar, obrigatoriamente, associados a alterações qualitativas e/ou quantitativas de fibronectina e/ou de outras proteínas de adesão nas células da população transformada, mas tam-

bem a perda de receptores para fibronectina e/ou para outras proteínas que participam desse processo, encontrados na superfície da membrana celular (HYNES & YAMADA, 1982).

Células não transformadas, de origem fibroblástica ou epitelial, requerem adesão e espalhamento em um substrato como um pré-requisito para o crescimento em cultura (VASILIEV, 1985) e aparentemente a necessidade de adesão e dependência de ancoragem não é apenas uma condição física, mas também nutritiva (SMETS, 1980).

A habilidade das células tumorais para crescer em cultura em meio semi-sólido de ágar é conhecida como independência de ancoragem (BERENBLUM & ARMUTH, 1981).

A partir da análise dos resultados obtidos no meio semi-sólido de ágar I, pode-se observar que as três populações celulares; Vero-N, Vero-T e "sp2", apresentaram formação de colônias. A linhagem "sp2", apresentou a formação de colônias celulares mais tardiamente em relação a população Vero-N e Vero-T, detectada com 96 horas de cultura. Também foi observado, que muitas células da população Vero-N e Vero-T cresceram aderidas à superfície das placas. Isto pode ser explicado pelo fato de que neste método não foi utilizada a camada de fundo com maior concentração de ágar como no procedimento posterior. Desta forma, no momento da semeadura nas placas, as células que se depositaram sobre o fundo desta, passaram a crescer aderidas a superfície.

Com relação ao estudo da dependência de ancoragem através do meio semi-sólido de ágar II, foi observado que as populações celulares Vero-N e "sp2" não apresentaram formação de colô-

nias, enquanto que a população Vero-T apresentou crescimento positivo. Porém, as colônias celulares observadas na população Vero-T, foram somente detectadas no oitavo dia de cultura, indicando um crescimento mais tardio. Observou-se também que essas colônias cresceram lentamente por um período de três dias.

O fenômeno do crescimento com independência de ancoragem tem recebido muita atenção pela sua correlação com o potencial tumorigênico. Em linhagens clonadas de fibroblastos de camundongo, a independência de ancoragem demonstrou uma correlação muito mais evidente com a tumorigênese do que com qualquer outra expressão fenotípica de transformação. Porém, outros estudos têm mostrado que a independência de ancoragem não está obrigatoriamente relacionada a malignidade e pode ser dissociada da presença de alterações tumorais específicas (SMETS, 1980).

Desta forma, pode-se concluir que a independência de ancoragem, que reflete um certo grau de autonomia celular, é uma propriedade presente em muitas, mas não em todas, as células transformadas e de origem maligna (SMETS, 1980).

Em alguns sistemas, o crescimento em meio semi-sólido de ágar, que avalia independência ou não de ancoragem, está ligado ao tipo e a concentração do soro utilizado, a presença de nutrientes especiais e a densidade do inóculo celular. Assim se as células transformadas têm a capacidade de proliferar em suspensão (independência de ancoragem), isso pode significar um baixo requerimento de soro e uma alta eficiência de plaqueamento quando em condições regulares de cultivo (SMETS, 1980; HOLZER et alii, 1986).

Todavia, em estudos com variantes clonais isolados de células transformadas por ação do vírus SV40, mostrou-se que a habilidade para crescer em meio semi-sólido de ágar, pode ser dissociada de outras propriedades dependentes da transformação, incluindo o decréscimo na necessidade de soro (SMETS, 1980).

O desenvolvimento e o uso de procedimentos de cultura celular em meio semi-sólido de ágar, tem contribuído significativamente para o estudo da biologia da célula tumoral, pois ensaios em meio semi-sólido de ágar, oferecem também condições potenciais para estudar a capacidade de formação de colônias e o micro-meio-ambiente dessas colônias, como por exemplo a produção de elementos de matriz extracelular pelas células (PERSKY et alii, 1989).

Com base nas conclusões emitidas por outros autores (BEREMBLUM & ARMUTH, 1981; SMETS, 1980; HOLZER et alii., 1986; PERSKY et alii., 1989), pode-se concluir com relação aos resultados da cultura em meio semi-sólido de ágar I, que tanto a população Vero-N quanto Vero-T apresentam independência de ancoragem, em meio contendo concentração normal de soro e nutrientes quando o inóculo celular é elevado.

O crescimento tardio das colônias de "sp2" em relação às outras duas populações, provavelmente se deve a um maior tempo de adaptação desta às condições de cultura em meio semi-sólido de ágar e\ou a um tempo de duplicação maior.

Na cultura celular em meio semi-sólido de ágar II, observou-se a formação de colônia celulares somente na população Vero-T. Neste protocolo, utilizou-se a metade da concentração

tanto do nutriente Ham - F12, quanto do soro, assim como um inóculo celular três vezes menor que no procedimento anterior. Provavelmente, isso significa que para essa concentração de soro e para esse inóculo, somente a população Vero-T possui independência de ancoragem. Esses fatos, mostram também que a independência de ancoragem de Vero-N depende do inóculo celular e da concentração de soro no meio semi-sólido de ágar como dizem SMETS 1980 e HOLZER et alii, 1986.

Quanto a formação tardia de colônias da população Vero-T, provavelmente se deve ao tempo de adaptação das células às condições de cultura no meio semi-sólido de ágar II, sendo que o crescimento por um período relativamente curto se deve, possivelmente, ao consumo dos nutrientes do soro.

Pelos dados obtidos, pode-se concluir também aqui que a população Vero-T, apresenta independência de ancoragem crescendo em baixa concentração de soro e nutrientes, além de possuir maior eficiência de plaqueamento que as demais populações submetidas às mesmas condições de cultura. Estes dados estão de acordo com observações obtidas em estudos, onde se compara o crescimento de células transformadas e não transformadas em sistemas de cultura. Segundo esses estudos, as células transformadas necessitam menor concentração de soro e de fatores de crescimento para proliferação em cultura (MULDER & BRATTAIN, 1989; MULDER & CHILDRESS-FIELDS, 1990).

A partir de estudos dos agentes transformantes e da cinética do processo de transformação celular, parece que este é basicamente um evento (ou uma acumulação de eventos) afetando o

genoma celular. Este conceito também se aplica ao fenômeno de transformação espontânea, observado em algumas linhagens celulares de roedores, pois princípios carcinogênicos não identificados "in vitro" e a ativação de viroses latentes podem estar associados a muitos desses casos de transformação espontânea (SMETS, 1980).

A questão mais relevante, todavia, refere-se a natureza das mudanças permanentes no funcionamento do genoma, como elas induzem e mantêm o fenótipo transformado e, como essas mudanças podem ser investigadas utilizando-se técnicas "in vitro" (SMETS, 1980).

A transformação celular, assim como a tumorigênese, tem sido frequentemente descrita como um processo clássico de múltiplos passos ou mecanismos de mutação-seleção. Assim, a contribuição potencial de estudos genéticos para se entender a tumorigênese, pode ser facilmente discutida dentro da estrutura das idéias correntes dos estágios e mecanismos envolvidos. As evidências de um número de passos distintos envolvidos na transformação e tumorigênese, vêm de estudos experimentais da indução de câncer em animais, e de estudos epidemiológicos no homem (PONDER, 1980).

Os estudos iniciais demonstraram, em pele de camundongo, duas distintas fases na carcinogênese, chamadas iniciação e promoção. Estes estudos demonstraram que a repetida aplicação de um carcinógeno conhecido, poderia induzir tumores de pele, primeiramente benignos e depois malignos. Uma única aplicação era insuficiente. Se todavia essa aplicação fosse seguida da administração de um segundo agente, o tumor se desenvolvia. Conclui-se, então,

que o primeiro agente causaria uma mudança inicial estável nas células, resultando em células com potencial tumoral. Esse primeiro agente foi chamado "iniciador" de carcinogênese. O segundo agente promoveria a expressão da mudança inicial, provavelmente por causar um ou mais eventos subsequentes nas células iniciais, levando eventualmente ao desenvolvimento do tumor. Esse segundo agente foi chamado "promotor" (PONDER, 1980). Estes dados sugerem que o agente iniciador age primeiramente, e seu efeito pode persistir por um grande tempo de vida do animal. Esta alteração poderia ser permanente e hereditária para as células, passando para cada célula filha e para a prole. Substâncias que agem como iniciadores comumente interagem com o DNA "in vivo" e "in vitro", e são capazes de agir como mutagênicos em vários sistemas teste usando bactérias ou células de mamíferos (PONDER, 1980).

A conclusão lógica é que o evento inicial é causado por uma classe de mutações e os eventos subsequentes, facilitados pela ação do agente promotor, seriam provavelmente necessários para a expressão da mutação e o desenvolvimento do fenótipo transformado (PONDER, 1980).

Assim, todo o fenótipo transformado é resultante de uma sequência de mutações individuais que foram acumuladas em uma única célula. Na transformação viral, o fenômeno pode parecer resultante de um único passo, isso provavelmente devido ao fato de que nesse caso, um único bloco de genes adjacentes é transferido e expressado simultaneamente (SMETS, 1980).

Atualmente a teoria de múltiplos-passos é geralmente aceita, embora a natureza precisa dos passos que a compõem, seja

ainda limitada e matéria de controvérsia (BEREMBLUM & ARMUTH, 1981).

O processo mecânico exibido durante a invasão metastática é dividido em três passos claramente distinguíveis: (1) ligação à matriz extra-celular, (2) degradação da matriz e (3) locomoção ao longo da matriz danificada. Embora o mecanismo molecular presente nestes passos não esteja completamente claro, o processo mecânico envolve a super-expressão de receptores associados à adesão, várias proteases, fatores de mobilidade e certos oncogenes (BEVACQUA et alii, 1988).

Um mecanismo que pode ser adquirido para a super-produção de um oncogene ou de uma proteína específica, é a amplificação gênica. A amplificação do DNA pode estar presente como regiões cromossômicas expandidas, na forma de cromossomos em anel ou micronúcleos ou em cromossomos extra-numerários (BEVACQUA et alii, 1988).

Estudos citogenéticos tem revelado que certos tumores apresentam tipos de alterações cromossômicas específicas, que acredita-se, estejam envolvidas em diferentes mecanismos genéticos. Algumas dessas alterações são as translocações e a amplificação gênica. Uma variedade de translocações podem ser encontradas esporadicamente em alguns tumores malignos. Algumas malignidades no sistema hematopoiético são caracterizados pela presença constante de translocações envolvendo regiões específicas de certos cromossomos, intensamente investigados no homem e em camundongos (HARRIS, 1986).

Alguns exemplos de amplificação gênica tem sido descritos em tumores malignos, tanto na forma de cromossomos extra-numerários como expansões tipo tandem em certos genes particulares. Acerca desses genes pode estar associada a amplificação de certos oncogenes (HARRIS, 1986).

A maioria das evidências sugerem que a amplificação é o último efeito da seleção resultante do crescimento da população celular. Como a amplificação de oncogenes confere uma vantagem seletiva não está totalmente clara, mas sabe-se que a pressão da seleção não está limitada a multiplicação da células malignas "in vivo" mas pode operar em células diploides normais crescendo "in vitro" (HARRIS, 1986).

A transformação de linhagens celulares é geralmente acompanhada por mudanças no complemento cromossômico. A seleção "in vitro" de células com perda de inibição por contato ou com independência de ancoragem, geralmente produz variantes com número de cromossomos diferente do tipo parental. Isto também sugere uma função do efeito da dosagem do gene na manutenção das propriedades fenotípicas da transformação (SMETS, 1980).

Nos estudos citogenéticos, investigou-se inicialmente o número modal, ou seja, o número de cromossomos presentes na maioria das células da população Vero-N e Vero-T. Na população Vero-N 58% das células analisadas apresentaram 54 cromossomos e apenas 14% mostraram 56 cromossomos, enquanto na população Vero-T, cerca de 47% das células caracterizaram-se por apresentar 56 cromossomos e 15% mostraram 54 cromossomos. Desta forma, observou-se que a população Vero-T apresenta predominância de células com dois

cromossomos extras.

Pelo estudo do cariótipo, pode-se observar que ambas as populações celulares Vero-N e Vero-T, apresentam monossomia dos pares cromossômicos 11, 21, 24 e 30. A população Vero-N apresenta monossomia dos pares 8 e 27, enquanto na população Vero-T essa monossomia não ocorre.

Nas metáfases analisadas da população Vero-N, o par cromossômico número 22, caracterizou-se por apresentar constantemente, uma deleção na região distal de um dos homólogos, enquanto na população Vero-T, as alterações relativas a esse cromossomo foram inconstantes nas metáfases analisadas, ora se apresentando na forma de trissomias com a deleção em apenas um dos homólogos, em dois homólogos ou apresentando os dois homólogos normais.

Assim pelo estudo do cariótipo, observou-se nas células analisadas, que os cromossomos extras presentes em Vero-T referem-se a um cromossomo número 8 e a um 27 representados pelos dois homólogos, enquanto na população Vero-N observamos a monossomia desses.

A presença de cromossomos extras no cariótipo da população Vero-T, pode ser interpretada como uma amplificação gênica, geralmente observada em células transformadas ou em tecidos malignos (HARRIS, 1986 and BEVACQUA et alii, 1988). Desta forma, essa amplificação gênica poderia ser responsável pela produção em grandes quantidades de determinada(s) proteína(s) normalmente ausente(s) ou presente(s) em menor concentração, próprias do fenótipo transformado. Além disso, a amplificação gênica, observada em Vero-T, poderia referir-se a amplificação de oncogenes asso-

ciados a produção de proteínas anormais responsáveis pela manutenção das características transformadas. Estes dados, podem estar associados aos resultados obtidos pela eletroforese dos extratos celulares das duas populações, onde detectou-se a produção de uma proteína de 36 kD em grande concentração na população Vero-T, ausente em Vero-N.

Pode-se verificar ainda pela análise dos cariótipos das populações Vero-N e Vero-T, que ambas apresentam uma constricção secundária na região distal do braço longo do par 25. Estes dados foram também observados pelos estudos de Bianchi & Ayres (BIANCHI & AYRES, 1971), quando investigaram a distribuição de heterocromatina nas células Vero.

Assim, as diferenças no comportamento celular e nas características fenotípicas existentes entre as populações Vero-N e Vero-T parecem estar intimamente associadas às alterações cromossômicas presentes no cariótipo desta.

Os estudos citoquímicos, mostraram inicialmente pela coloração com Xilidine Ponceau pH 2,5, que os padrões de coloração observados em Vero-N e Vero-T são diferentes. A camada celular da população Vero-N apresenta coloração homogênea, enquanto a população Vero-T apresenta regiões da camada celular mais intensamente coradas em vermelho alaranjado, as quais representam regiões de concentração de proteínas (MELLO & VIDAL, 1980). Observou-se também, que o citoplasma, os núcleos e nucléolos das células da população Vero-T apresentaram-se mais intensamente corados em vermelho alaranjado, quando comparados as células de Vero-N, sugerindo uma relação com uma atividade de síntese proteica.

ca aumentada nas células de Vero-T. Além disso, na população Vero-T há regiões onde parece haver concentração de material extracelular, que se apresentaram fracamente coradas e com aspecto finamente granular. Essa observação, pode relacionar-se aos dados obtidos com o estudo da estrutura dos grumos celulares da população Vero-T, onde foi evidenciada a presença de material extracelular, presente no interior do grumo.

Esses dados, no seu conjunto, são coerentes com os resultados obtidos na eletroforese dos extratos celulares e na dosagem de proteínas totais, que mostraram uma concentração significativamente maior de proteínas em Vero-T.

Novamente pela reação de P.A.S. observou-se que a camada celular da população Vero-T, apresentou regiões mais intensamente coradas em vermelho púrpura, ao contrário do que ocorreu com Vero-N, indicando regiões de concentração de polissacarídeos neutros e/ou glicoproteínas (MELLO & VIDAL, 1980).

O citoplasma das células da população Vero-N apresentou-se fracamente corado e com aspecto granular, enquanto o citoplasma das células da população Vero-T apresentou-se intensamente corado em vermelho púrpura e mais frequentemente com o aspecto bastante granular.

Esses resultados analisados em conjunto, levam a conclusão de que na população Vero-T ocorre síntese de material proteico, podendo ser glicoproteínas, em concentrações bastante elevadas quando comparadas a Vero-N. Esse material protéico, incluindo material extracelular observado nos cortes semi-finos dos grumos, pode estar representado pelas proteínas presentes na

eletroforese do extrato celular da população Vero-T.

Diferentes linhas de investigação têm mostrado evidências da síntese de novas proteínas durante a carcinogênese, representadas por antígenos específicos de tumores, ou por certas proteínas sintetizadas em tumores humanos que quando colocadas em culturas celulares de fibroblastos normais são capazes de levar a manifestação de fenótipo transformado (BEREMBLUM & ARMUTH, 1981).

Em células de camundongo transformadas pelo "simian virus"- SV40, e em uma variedade de tipos celulares transformados por vírus, de DNA ou de RNA, por agentes químicos ou espontaneamente, observou-se a presença de uma fosfoproteína de 53.000 daltons chamada pp53. Essa fosfoproteína tem sido encontrada somente nas células transformadas e em uma variedade de linhagens celulares de tumores humanos, porém, está ausente nos tipos celulares parentais normais, sugerindo a possibilidade de que a presença dessa fosfoproteína, pp53, esteja associada à manutenção do fenótipo transformado (LANE & CRAWFORD, 1979; SENGER et alii, 1979; GURNEY et alii, 1980; McCORMICK & HARLOW, 1980; CRAWFORD et alii, 1981)

Estudos recentes tem demonstrado que o gene mais comumente afetado nos vários tipos de câncer humanos, é o gene p53. O gene p53 é um gene de controle de crescimento e desempenha uma função chave na supressão da proliferação de células anormais e no desenvolvimento do tumor. Uma mutação no gene p53 está associada com o desenvolvimento de um tumor, e isso pode envolver o funcionamento anormal de uma proteína mutante p53. Esse gene, é altamente conservado entre as espécies, e uma única mutação de

ponto na sequência que codifica p53 é suficiente para causar a perda da função supressora de tumor, podendo levar ao câncer (MILNER, 1991).

Os resultados obtidos, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida dos extratos celulares das duas populações, Vero-N e Vero-T, mostram algumas alterações entre o padrão de proteínas das duas populações. A população Vero-T apresenta duas proteínas com peso molecular de 78 e 16 kDa respectivamente, tanto na presença quanto na ausência de 2-Me, que estão menos evidentes na população Vero-N. Em Vero-N observou-se, com ou sem 2-Me, a presença de uma proteína com 100 kDa que está ausente em Vero-T. Porém, a diferença mais significativa é uma proteína de 36 kDa bastante evidenciada em Vero-T, com ou sem 2-Me, e ausente em Vero-N.

A presença em grande quantidade de um polipeptídeo de peso molecular aproximadamente igual a 35.000 Daltons, foi descrito em uma grande variedade de fibroblastos de camundongo depois da transformação por agentes virais, químicos ou espontaneamente. Esses estudos concluíram ainda, que essa proteína, encontra-se associada com o controle de crescimento e a independência de ancoragem, indicando ser um possível marcador para a transformação e tumorigenicidade (GOTTESMAN, 1978).

Uma proteína de peso molecular igual a 37.000 também tem sido identificada na superfície de células de fibrosarcoma de camundongos, estando envolvida no seu processo de invasividade "in vitro". O bloqueio dessa proteína com anticorpos específicos que inibem a invasão, restaura a inibição por contato (PARISH et

alii, 1987).

As proteínas mais evidenciadas na população Vero-T (78kDa, 16kDa e 36 kDa) podem desempenhar uma função específica na célula, funcionando como fatores de crescimento, fatores de migração ou mesmo modulando a ação de outras proteínas específicas. Desta forma essas alterações encontradas nas proteínas presentes ou ausentes em Vero-T em relação ao padrão encontrado na população Vero-N, podem desempenhar uma importante função na determinação do fenótipo transformado.

Recentemente, foi demonstrado que condições não fisiológicas de tratamento, estão diretamente envolvidas na indução de efeitos genotóxicos em cultura de células de mamíferos (ASHBY & ISHIDATE, 1986; CIFONE et alii, 1987; MORITA et alii, 1989/1990). Células consideradas normais, podem ser transformadas para células que desempenham "in vitro", propriedades associadas com a malignidade, depois de expostas a mudança nutricional do meio, que torna-se depletado, contendo os metabólitos das próprias células, e como consequência o abaixamento do pH (BOREK, 1972). A demonstração do fenômeno de transformação celular por processos de "stress" nutricional, pode ter uma possível aplicação para algumas classes de malignidade desenvolvidas "in vivo" (BOREK, 1972).

Alterações iônicas e do pH, também parecem ser diretamente responsáveis pela indução de efeitos genotóxicos em cultura de células de mamíferos (MATSUOKA et alii, 1979; ZURA & GRANT, 1981). Estudos "in vivo" têm associado a alta concentração iônica e mudanças de pH com o desenvolvimento de tumores estomacais e da

bexiga urinária de camundongos (BRUSICK, 1987; ASHBY & ISHIDATE, 1986)

Com base nos dados acima, acredita-se que a população Vero-T analisada neste trabalho possa ter surgido, em função de condições não fisiológicas de cultura, através de um eventual processo de estresse nutricional, sofrido pelas células da linhagem inicial.

Assim, a comparação entre Vero-N e Vero-T mostrando a presença de menores índices de adesão, aumento do grau de ploidia, a independência de ancoragem em baixa concentração de soro e de nutrientes, a presença de cromossomos extra que pode ser interpretada como amplificação gênica, a presença de três proteínas de 78, 36 e 16 kDa que representam novas proteínas em Vero-T, permitem concluir que essa população não só difere de Vero-N, mas é realmente transformada, podendo ser usada como modelo para estudo de células tumorais.

V - RESUMO

A linhagem celular Vero estabelecida a partir de células renais de macaco verde da Africa (Cercopithecus aethiops), apresenta crescimento característico em cultura sendo considerada normal. Essas células possuem morfologia alongada crescendo em monocamadas quando em cultivo. Mantidas em cultura as células Vero passaram a apresentar alterações morfológicas, comportamento e de crescimento em relação ao padrão normal inicial. A população Vero alterada apresentou células com morfologia mais arredondada que crescem em múltiplas camadas formando grumos celulares. Os grumos celulares apresentaram em sua superfície células achatadas e células globosas e material extracelular no seu interior. As células da população alterada aderiram mais rapidamente ao substrato em meio contendo soro fetal bovino, além disso, podiam se dividir em suspensão em meio semi-sólido de ágar com menor concentração de nutrientes. As células da população alterada apresentaram número modal de cromossomos igual a 56 enquanto a população inicial apresentou 54 cromossomos, sendo que os cromossomos extras presentes na população alterada referem-se a um homólogo do par 8 e um do par 27. O índice de células poliplóides na população alterada foi de 19% enquanto na população inicial este in-

dice era de 5%. Quando submetidas a reações citoquímicas com Xilidine Ponceau - pH 2,5 e a reação de P.A.S. a camada celular da população normal apresentou padrão de coloração homogêneo enquanto que a população alterada apresentou regiões mais intensamente coradas. As células alteradas apresentaram citoplasma e núcleo fracamente corados e nucléolos proeminentes pela coloração com Xilidine Ponceau e citoplasma com aspecto granular intensamente corado indicando regiões de maior concentração de glicoproteínas pela reação de P.A.S.. Em análise eletroforética em gel de poliacrilamida com SDS observou-se a presença de uma proteína de 35 kDa bastante evidenciada na população alterada e ausente na população inicial. Assim, as análises efetuadas demonstraram que a população alterada é realmente transformada, podendo ser usada como um modelo para estudo de células tumorais.

V - SUMMARY

The Vero cell lineage established from kidney cells of the Africa green monkey (Cercopithecus aethiops) normally has a characteristic growth pathern. The cells are elonged and grow in monolayers. Maintained in culture, the Vero cells began to alter their morphology, behavior and growth in relation to their inicial characteristics. These altered Vero population made up rounded cells which grew into layered cellular aggregation. The aggregations consist of rounded cells and extracellular matrix covered by a flattened cellular layer. These altered cells, grow in medium with bovine fetal serum, adhered quick and divided in soft agar medium that contained less concentrated nutrients than normal cells require. A modal number of chromosomes equal to 56 was determined for the altered cells while the inicial population had 54 chromosomes. The additional chromosomes were an homologue to the 8 pair and another to the 27 pair. The polyploidy index in altered cells was 19%, while it was only 5% in the inicial population. Xylidine Ponceau at pH 2,5 and the P.A.S. reaction stained uniformly the normal cells while altered ones showed intencely stained regions. The nuclei and cytoplasm was slightly stained while the nucleoli was deeply stained with Xylidine

Ponceau in altered cells. They had granular cytoplasm after P.A.S. reaction, indicating glycoprotein rich region. Electrophoretic analysis in polyacrilamide gel with SDS revealed a 36 kDa protein that was proeminent in the altered populations and lacking in the inicial group. Thus, the analysis demonstrated that the altered cells constitute a transformed population and it can be used as a model for tumor cell studies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABERCROMBIE, M. (1979). Contact inhibition and malignancy. *Nature*, **281**, 259-62.

AKIYAMA, S. K.; YAMADA, S. S.; CHEN, W. and YAMADA, K. (1989). Analysis of fibronectin receptor functions with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.*, **109**, 863-75.

ALITALO, K., KESKI-OJA, J., HEDMAN, K. and VAHERI, A. (1982). Loss of different pericellular matrix components of rat cells transformed with a T-class ts mutant of Rous Sarcoma Virus. *Virology*, **119**, 347-57.

ARAKI, H. and NAKAMURA, K. (1978). Effect of sera from cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes on glucose metabolism in Vero cells. *The Lancet*, April 15, 793-5.

ASHBY, J. and ISHIDATE, M. Jr. (1986). Clastogenicity "in vitro" of the Na, K, Ca and Mg salts of saccharin; and of the magnesium chloride; consideration of significance. *Mutation Res.*, **163**, 63-73.

- BEIGUELMAN, B. (1982). Técnica de produção de Banda Q. In: Cito-genética Humana. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 85-6.
- BEN-ZE'EV, A. (1985). The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 780, 197-212.
- BEREMBLUM, I. and ARMUTH, V.. (1981). Two independent aspects of tumor promotion. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 651, 51-63.
- BEVACQUA, S. J., GREFF, C. W. and HENDRIX, M. J. C. (1988). Cytogenetic evidence of gene amplification as a mechanism for tumor cell invasion. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 14, 83-91.
- BIANCHI, N. O. and AYRES, J. (1971). Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Exp. Cell Res.*, 68, 253-258.
- BISHOP, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64, 235-48.
- BLUMBERG, P. M., DRIEDGER, P. E. and ROSSOW, P. W.. (1976). Effect of phorbol ester on a transformation-sensitive surface protein of chick fibroblasts. *Nature*, 264, 446-7.
- BOREK, C. (1972). Neoplastic transformation "in vitro" of a clone of adult liver epithelial cells into differentiated Hepatoma-like cells under conditions of nutritional stress.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69,956-959.

BOREK, C. and SACHS, L. (1966). "In vitro" cell transformation by X-irradiation. Nature, 210, 276-8.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

BRIDGES, M. A.; WALKER, D. C.; HARRIS, R. A.; WILSON, B. R. and DAVIDSON, A. G. F. (1991). Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues. Biochem. Cell. Biol., 69, 102-08.

BROWN, K.; QUINTANILLA, M.; RAMSDEN, M.; KERR, I. B.; YOUNG, S. and BALMAIN, A. (1986). *v-ras* genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. Cell, 45, 447-56.

BRUSICK, D. J. (1987). Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation. Mutation Res., 189, 1-6.

BUCK, C. A., GLICK, M. A. and WARREN, L., (1970). Glycopeptides from the surface and virus-transformed cells. Science, 172, 169-71.

CAIRNS, J. (1975). Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, **255**, 197-200.

CIFONE, M. A. and FIDLER, I. J. (1981). Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc. Nat. Acad. USA.*, **78**, no. 11, 6949-52.

CIFONE, M. A.; MYHR, B.; EICHE, A. and BOLCSFOLDI, G. (1987). Effect of pH shifts on the mutant frequency at the thymidine kinase locus in mouse lymphoma L5178Y TK^{+/-} cells. *Mutation Res.*, **189**, 39-46.

COOK, J. R. and CHEN, J. (1988). Enhancement of transformed cell growth in agar by serine protease inhibitors. *J. Cell Physiol.*, **138**, 188-93.

CRAWFORD, L. V., PIM, D. C., GURNEY, E. G. GOODFELLOW, P. and TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. (1981). Detection of a common feature in several human tumor cell lines - a 53.000-dalton protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, n 1, 41-45.

CROSS, M. and DEXTER, T. M. (1991). Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, **64**, 271-80.

DARNEL, J.; LODISH, H. and BALTIMORE, D. (1986). *Cancer In: Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, New York, cap.

23, 1035-1074.

DARNEL, J.; LODISH, H. and BALTIMORE, D. (1990). Cancer In: Molecular Cell Biology. 2th ed., Scientific American Books, New York, cap. 23, 1035-1074.

DeCAPRIO, J. A.; LUDLOW, J. W.; FIGGE, J.; SHEW, J.; HUANG, C.; LEE, W.; MARSILIO, E.; PAUCHA, E. and LIVINGSTON, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. Cell, 54, 275-83.

DEITCH, A. D. and SAWICKI, S. G. (1979). Effects of cordycepin on microtubules of cultures mammalian cells. Expl. Cell Res., 118, 1-13.

DUESBERG, P. H. and VOGT, P. K. (1970). Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, no. 4, 1673-80.

EAGLE, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell culture. Science, 130, 432-37.

EBERT, T., BANDER, N. H., FINSTAD, C. L., RAMSAWAK, R. D. and OLD, L. J., (1990). Establishment and characterization of human renal cancer and normal kidney cell lines. Cancer Res., 50, 5531-6.

FLEMING, N. and KISTLER, G. (1977). Morfology, histochemistry and isozymes of monkey kidney cells during long-term exposure to cigarette smoke. *Acta. Histochem. Bd.*, **60**, 132-45.

FOLKMAN, J. and GREENSPAN, H. P. (1975). Influence of geometry on control of cell growth. *Biochim. et Biophys. Acta*, **417**, 211-236.

FOLKMAN, J. and MOSCONA, A. (1978). Role of shape in growth control. *Nature* **273**, 345-349.

FRIDMAN, R.; ALON Y.; DOLJANSKI, F.; FUKS., Z. and VLODAVSKY, I. (1985). Cell interaction with the extracellular matrices produced by endothelial cells and fibroblasts. *Exp. Cell. Res.*, **158**, 461-76.

GARDNER, E. J. and SNUSTAD, D. P. (1986). *Genética*. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 447 e 455.

GILVARRY, U., FARRELL, D., LYNCH, V., MORIARTY, M., DOOLEY, M., LAW, E. and CLYNES, M. (1990). Cytological differences between normal and malignant human cell populations in culture. *Cancer Res.*, **50**, 3390-93.

GOLOMBICK, T., DANSEY, R., BEZWODA, W. R. and ROSENDORFF, J. (1990). Establishment and characterization of two new human ovarian cancer cells lines UWOV1 and UWOV2 and a subline UWOV2 (Sf) growing in serum-free conditions: growth

characteristics, biochemical and cytogenetic studies. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **26**, 447-54.

GOTTESMAN, M. M. (1978). Transformation-dependent secretion of a low molecular weight protein by murine fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, no. 6, 2767-71.

GURNEY, E. G., HARRISON, R. O. and FENNO, J. (1980). Monoclonal antibodies against Simian Virus 40 T antigens: evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among nonviral T antigens. *J. Virol.*, **34**, 752-63.

HAKOMORI, S. I. (1975). Structures and organization of cell surface glycolipids dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochim. et Biophys. Acta*, **417**, 55-89.

HARRIS, H. (1986). The genetic analysis of malignancy. *J. Cell Sci. Suppl.* **4**, 431-444.

HATANAKA, M. (1974). Transport of sugars in tumor cell membranes. *Biochim. et Biophys. Acta*, **355**, 77-104.

HAYMAN, E., ENGVALL, E. and RUOSLAHTI, E., (1981). Concomitant loss of cell surface fibronectin and laminin from transformed rat kidney cells. *J. Cell Biol.*, **88**, 352-57.

HEIDELBERGER, C. and IYPE, P. T. (1966). Malignant transformation

"in vitro" by carcinogenic hydrocarbons. *Science*, 155, 214-7.

HOLZER, C., MAIER, P. and ZBINDEN, G. (1986). Comparison of exogenous growth stimuli for chemically transformed cells: growth factors, serum and cocultures. *Exp. Cell Biol.*, 54, 237-44.

HYNES, R. O. (1976). Cell surface proteins and malignant transformation. *Biochim. et Biophys. Acta*, 458, 73-107.

HYNES, R. O. and YAMADA, K. M. (1982). Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.*, 95, 369-77.

JANIK, B. and GREKO, M. A. (1976). Secondary association of exogenous polynucleotides with cells and nuclei in uptake experiments. *Exp. Cell. Res.*, 103, 420-423.

KESKI-OJA, J., ALITALO, K., BARLATI, S. and VAHERI, A. (1985). Pericellular matrix changes in fibroblastic and epithelial cells induced by oncogenic transformation. In: *Theories and models in cellular transformation*. Edited by L. Santi and Luciano Zardi, Istituto Scientifico Tumori, Genoa, Italy - Academic Press. 55-70.

KLAUNIG, J. and RUCH, R. J. (1990). Biology of disease - role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 62, no. 2, 135-46.

KLEIN, G. (1989). Viral latency and transformation: the strategy of Epstein-Barr virus. *Cell*, 58, 5-8.

KLEINMAN, H. K., KLEBE, R. and MARTIN, G. R. (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.*, 88, 473-85.

LANE, D. P. and CRAWFORD, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed cell. *Nature*, 278, 261-63.

LEARY, K. and BLAIR, C. D. (1980). Sequential events in the morphogenesis of Japanese Encephalitis Virus. *J. Ultrastruct. Res.*, 72, 123-129.

LEE, G. T. Y. and ENGELHARDT, D. L. (1977). Protein metabolism during growth of Vero cells. *J. Cell Physiol.*, 92, 293-302.

LEE, G. T. Y. and ENGELHARDT, D. L. (1978). Fluctuations in production of specific cellular peptides during the growth of animal cells. *J. Cell Biol.*, 93, R28-R35.

LOEWENSTEIN, W. R. (1979). Junctional intercellular communications and the control of growth. *Biochem. et Biophys. Acta.*, 560, 1-65.

MATSUOKA, A.; HAYASHI, M. and ISHIDATE JR., M. (1979). Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9

mix "in vitro". Mutation Res. **68**, 277-90.

McCLANE, B. A. and McDONEL, J. L. (1979). The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability and macromolecular sintesis in Vero cells. J. Cell. Physiol., **99**, 191-200.

McCORMICK, F. and HARLOW, E. (1980). Association of a murine 53.000-Dalton phosphoprotein with Simian Virus 40-T antigen in transformed cells. J. Virol., **34**, no. 1, 213-24.

MAIA, V. (1979). Técnica Histológica. São Paulo, Atheneu, 2ed, 246p.

MELLO, M. L. S. and VIDAL, B. C. (1980). Práticas de Biologia Celular. Ed. Edgard Blucher Ltda. p.60, 65 e 66.

MILNER, J. (1991). A conformation hypothesis for the suppressor and promoter functions of p53 in cell growth control and in cancer. Proc. R. Soc. Lond. B., **245**, 139-45.

MORITA, T.; WATANABE, Y.; TAKEDA, K. and OKOMURA, K. (1989). Effects of pH in vitro chromosomal aberrations test. Mutation Res., **225**, 55-60.

MORITA, T.; TAKEDA, K. and OKOMURA, K. (1990). Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid

on cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, ~~240~~, 195-202.

MONSIGNY, M.; KIEDA, C. and ROCHE, A. C. (1983). Membrane glycoproteins, glycolipids and membrane lectins as recognition signals in normal and malignant cells. *Biol. Cell.* ~~47~~, 95-110

MULDER, K. M. and BRATTAIN, M. (1989). Continuous maintenance of transformed fibroblasts under reduced serum conditions utility as a model system for investigating growth factor-specific effects in nonquiescent cells. *J. Cell Physiol.*, ~~138~~, 450-58.

MULDER, K. M. and CHILDRESS-FIELDS, K. E. (1990). Characterization of a serum-free culture system comparing growth factor requirements of transformed and untransformed cells. *Exp. Cell Res.*, ~~188~~, 254-61.

MURRAY, J. C., LIOTTA, L., RENNARD, S. I and MARTIN, G. R. (1980). Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells "in vitro". *Cancer Res.*, ~~40~~, 347-51.

NERMUT, M. V., EASON, P., HIRST, E. M. A. and KELLIE, S. (1991). Cell/substratum adhesions in RSV-transformed rat fibroblasts. *Exp. Cell Res.* ~~193~~, 382-97.

NUSSE, R. and VARMUS, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the

same region of the host genome. *Cell*, **81**, 99-109.

OLSSON, M. and LINDAHL, T. (1980). Repairs of alkylates DNA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10569-571.

PARDEE, A. B. (1975). The cell surface and fibroblast proliferation some current research trends. *Biochim. et Biophys. Acta*, **417**, 153,172.

PARISH, R. W.; SCHUMIDHAUSER, C.; SCHIMIDT, T. and DUDLER, R. (1987). Mecanisms of tumor cell metastasis. *J. Cell. Sci.*, suppl. **8**, 181-97.

PASTAN, I. (1979). Cell Transformation. *Methods in Enzymology* LVIII, Cell Culture. 368-70.

PERSKY, B., MEYSKENS, F. L. and HENDRIZ, M. J. C. (1989). Immunohistochemical and ultrastructural study of human melanoma colonies grow in soft agar. *Am. J. Anat.*, **184**, 212-24.

PONDER, B. A. J. (1980). Genetics and cancer. *Biochim. et Biophys. Acta.*, **605**, 369-410.

PONTEN, J. (1976). The relationship between in vitro transformation and tumor formation in vivo. *Biochim. et Biophys. Acta*, **458**, 397-422.

REN, J., HAMADA, J., TAKEICHI, N., FUJIKAWA, S. and KOBAYASHI, H. (1990). Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.*, **50**, 358-62.

ROOS, E. (1984). Cellular adhesion, invasion, and metastasis. *Biochim. et Biophys. Acta.*, **738**, 263-84.

ROOS, E. and DINGEMANS, K. P. (1979). Mechanisms of metastasis. *Biochim et Biophys. Acta.*, **560**, 135-166.

SENGER, D. R., WIRTH, D. F. and HYNES, R. O. (1979). Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*, **16**, 885-93.

SMETS, L. A. (1980). Cell transformation as a model for tumor induction and neoplastic growth. *Biochim. et Biophys. Acta*, **605**, 93-111.

SMETS, L. A. and VAN BEEK, W. P. (1984). Carbohydrates of the tumor cell surface. *Biochim. et Biophys. Acta.*, **738**, 237-249.

SRIDHAR, K. S., OHUMA, T., NIEBURGS, H. E., DUNCAN, R. C. and HOLLAND, J. F., (1989). Relationship between the "in vitro" colony growth of human tumors and cytologic diagnosis. *Cancer*, **64**, 2275-8.

VAHERI, A. and MOSHER, D. F. (1978). High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 516, 1- 25.

VASILIEV, J. M. (1985). Spreading of non-transformed and transformed cells. *Biochim. et Biophys. Acta.*, 780, 21-65.

VIDAL, B. C. (1970). Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Ann. Histochem.*, 15, 289-96.

WADA, M. L. F. (1987). In: *Cultura Celular*; VIDAL, B. C. and MELLO, M. L. S. *Biologia Celular*. Livraria Atheneu, São Paulo, p. 35-39.

WILLIAMS, G. T. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65, 1097-98.

YAMADA, K. M., and OLDEN, K. (1978). Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275, 179-84

YAMASAKI, H. (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, n0. 7, 1051-8.

ZINGALES, B. (1984). Analysis of protein by sodium dodecyl sulfate polyacrilamine gel electrophoresis. In: Morel, C. M. (ed) *Genes and Antigens of Parasites*. UNDP World

Bank/WHO/ Fio Cruz, 357-363, Rio de Janeiro.

ZURA, K. D. and GRANT, W. F. (1981). The role of hydronium ion in the induction of chromosomal aberrations by weak acid solutions. Mutation Res., 84, 349-64.