

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Grazieli Nogueira Farias Barbieri

AÇÃO CITOTÓXICA E TRANSFORMANTE DO ANTINEOPLÁSICO

TAMOXIFENO SOBRE CÉLULAS DA LINHAGEM VERO

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Candelária Genari

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

B234a

Barbieri, Grazieli Nogueira Farias

Ação citotóxica e transformante do antineoplásico tamoxifeno sobre células da linhagem vero / Barbieri, Grazieli Nogueira Farias. –

Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Selma Candelária Genari

Tese (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Células. 2. Apoptose. 3. Fibronectinas. 4. Carcinogenese quimica. I. Genari, Selma Candelária. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 11 de maio de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Selma Candelária Genari (Orientadora)

(Assinatura)

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

(Assinatura)

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

(Assinatura)

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

(Assinatura)

♡ *Aos meus amados pais,
Oswaldo e Catarina*

♡ *Ao meu esposo Paulo e
nossa pequena Heloísa*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Senhor, Jesus Cristo, fortaleza em todos os momentos de minha vida, minha alegria na esperança.

Agradeço a minha querida orientadora, Selma Genari, pela dedicação, carinho e paciência ao longo desses anos de convívio e pelo valioso e fundamental auxílio para a execução desse trabalho.

Agradeço ao meu amado Paulo e minha querida Heloísa por dividirem comigo as alegrias e as lutas e pelo amor dedicado a mim.

Agradeço aos meus pais, minha maninha e à minha sogrinha pelo apoio (inclusive o financeiro!) com amor e ânimo durante essa jornada.

Agradeço às queridas Estela e Naila, que me agüentaram tantas vezes choramingando e que tantas outras vezes me ajudaram no laboratório!

Agradeço à Patrícia e ao Arnaldo que me auxiliaram nos primeiros passos em um laboratório de cultura de células.

Agradeço a todos os meus colegas pós-graduandos do Departamento de BC, pois todos de alguma forma contribuíram para que esse período se tornasse mais feliz, seja pelos bate-papos na escada, pelo cafezinho na cozinha ou pela ajuda no trabalho.

Agradeço a todos os professores, e funcionários desse Departamento.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O tamoxifeno é um agente anti-estrógeno não esteróide utilizado como adjuvante no tratamento do câncer de mama e atualmente também no tratamento preventivo de mulheres com elevado risco potencial para o desenvolvimento dessa doença. Tal medicamento, a despeito da comprovada ação antineoplásica no tecido mamário, está associado ao aumento da incidência de câncer endometrial nas pacientes tratadas, dentre outros efeitos colaterais. Portanto, existe a necessidade que as ações do tamoxifeno nas propriedades dos diferentes tipos celulares sejam amplamente investigadas para a melhor compreensão das mesmas. Células da linhagem Vero, consideradas não tumorais, foram utilizadas devido as suas características de crescimento e comportamento, sendo recomendadas para estudos de citotoxicidade e transformação celular. Portanto, este trabalho teve como objetivo analisar as ações do tamoxifeno *in vitro*, em cultura de células Vero, com maior enfoque na transformação celular. As células Vero foram expostas a diversas concentrações de tamoxifeno e este exerceu ações citotóxica e transformante, de forma dose dependente. Em resposta imediata ao tratamento com 5 μ M de TAM por 24 horas as células Vero apresentaram um aumento da proliferação celular enquanto um efeito citotóxico foi evidenciado em concentrações mais elevadas. O tratamento com 30 μ M / 24 horas demonstrou ser a menor dose transformante e a linhagem celular originada por esse tratamento, denominada Vero T30, foi estabelecida para os estudos subseqüentes. Essa concentração de tamoxifeno pode causar morte em células Vero por apoptose, sendo que células remanescentes apresentaram, diferentemente do controle, crescimento em múltiplas camadas, comportamento esse relacionado à transformação celular *in vitro*. O padrão de distribuição de fibronectina das células normais e transformadas é aparentemente semelhante, porém as diferenças nas taxas de apoptose, aliadas à perda de inibição de crescimento por contato podem indicar que realmente trata-se de duas populações celulares distintas. Portanto, o tamoxifeno por um processo relacionado à sua toxicidade pode causar transformação morfológica em células Vero *in vitro*, fenômeno este que pode estar relacionado ao desenvolvimento neoplásico *in vivo*.

ABSTRACT

Tamoxifen is a non-steroidal antiestrogen agent used as an adjuvant in the treatment of breast cancer and also in the preventive treatment of women with high potential risk to develop this disease. This medicament, despite its proved breast antineoplastic action, is associated to the increase of endometrial cancer, among others side effects. Therefore, there is the need of a wide investigation on the actions of the tamoxifen in the properties of different cellular types for a better comprehension of those actions. Vero cells line, which is non-tumoral, was used due to their growth and behavior pattern, being recommended for studies of cytotoxicity and cellular transformation. Hence, this work aimed to analyze the *in vitro* actions of the tamoxifen on Vero cells in culture, focusing cellular transformation. Vero cells were exposed at several tamoxifen concentrations, which has had cytotoxic and transformer actions, in a dose dependent manner. In immediate response to the treatment with 5 μ M tamoxifen / 24 hours Vero cells presented an increase in cellular proliferation whereas was observed a cytotoxic effect in more elevated concentrations. Treatment with 30 μ M tamoxifen/ 24 hours demonstrated to be the lower transformer dose and the cell line originated through this treatment, named Vero T30, was established for subsequent studies. This latter tamoxifen concentration can cause death by apoptosis in Vero cells but the remaining cells presented, differently from control, multi-layered growth; which is a behavior related to *in vitro* cellular transformation. The pattern of fibronectin distribution on normal and transformed cells was similar but the differences in the apoptosis rates, associated to the lost of contact inhibition can really indicate that there are two different cellular populations. Therefore, tamoxifen can cause *in vitro* morphological transformation, a phenomenon that can be related to *in vivo* neoplastic development by a process related to its toxicity.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1. Introdução	2
2. Objetivos	19
3. Organização da Dissertação	20
Capítulo 2	21
Título: <i>Aspectos morfológicos (microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura) de células Vero expostas ao antineoplásico Tamoxifeno</i>	22
Resumo	22
Introdução	23
Materiais e Métodos	24
Resultados	26
Discussão	28
Referências	32
Legendas e Figuras	39
Capítulo 3	49
Título: <i>Perfil de células Vero após tratamento com o antineoplásico Tamoxifeno: citotoxicidade e transformação</i>	50
Resumo	50
Introdução	51
Materiais e Métodos	52
Resultados	55
Discussão	56
Referências	59
Legendas e Figuras	65

Capítulo 4	73
Conclusões Gerais	74
Capítulo 5	76
Referências Bibliográficas	77

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinogênese química e transformação celular

1.1.1. Histórico

As primeiras observações associando produtos químicos com câncer foram feitas por John Hill, em 1761, quando notou a ocorrência de câncer nasal em pessoas que aspiravam “rapé” (tabaco em pó) excessivamente. Em 1775, o médico inglês Percival Pott reconheceu que a alta incidência de câncer escrotal em limpadores de chaminés correlacionava-se com a exposição contínua desses trabalhadores à fuligem e alcatrão. Posteriormente, na Alemanha, o médico Rehn reportou em 1895 o desenvolvimento de câncer da bexiga urinária em trabalhadores da indústria de corantes, os quais eram freqüentemente expostos a aminas aromáticas e azo-compostos. As evidências de que substâncias químicas poderiam causar câncer em humanos direcionaram pesquisas inicialmente feitas em animais. No início do século XX, pesquisadores conseguiram induzir carcinoma de pele nas orelhas de coelhos pela repetida aplicação de alcatrão de hulha (RUDDON, 1987). Atualmente, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como o benzo(a)pireno e o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno, foram isolados desses produtos de combustão e identificados como agentes carcinogênicos (KIM et al., 1998; VON TUNGELN et al., 1999). Nas décadas de 60 e 70, J.A. Miller e E.C. Miller descobriram que carcinógenos químicos estáveis sofriam um processo de ativação metabólica por enzimas normalmente envolvidas na detoxificação de compostos xenobióticos, originando espécies químicas altamente reativas (eletrófilos) (BERTRAM, 2001).

Desde esses primeiros estudos, outros diversos componentes químicos vêm sendo identificados como carcinogênicos, os quais têm sido classificados como tumorigênicos através de diferentes linhas de investigação, como estudos epidemiológicos, ou pela investigação na etiologia de outras doenças humanas ou ainda, a partir de bioensaios rotineiros. Tais linhas de investigação evidenciaram que alguns tipos comuns de câncer são provavelmente causados por uma grande variedade de agentes químicos produzidos ou

naturalmente presentes na nossa alimentação e amplamente distribuídos no meio ambiente (HEIDELBERGER et al., 1983).

Os primeiros relatos sobre a ação de carcinógenos químicos em células em cultura datam o início da década de 1940. Earle e seus colegas observaram que fibroblastos obtidos de camundongos da linhagem C3H após serem expostos ao carcinógeno químico 20-metilclorantreno apresentavam alterações citológicas semelhantes àquelas vistas em células cancerosas. Esses fibroblastos quando reinjetados nos camundongos C3H produziam sarcomas, que eventualmente matavam os animais (RUDDON, 1987). As pesquisas nessa área tomaram impulso somente 20 anos depois, quando Berwald e Sachs demonstraram que células embrionárias de hamster podiam ser transformadas por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e que tal sistema poderia ser quantificado (HEIDELBERGER et al., 1983).

Tal modelo de investigação estimulou um campo de estudo extraordinário, onde os carcinógenos químicos associados à cultura celular representam uma ferramenta valiosa, pois permitem o estudo dos mecanismos envolvidos no processo carcinogênico, assim como da sua quantificação e comparação. Este campo de estudo refere-se à transformação celular, muitas vezes também chamada por alguns autores de carcinogênese ou oncogênese em cultura celular. Assim, uma grande variedade de sistemas reproduzíveis, e que possibilitam ensaios quantitativos para se referir ao potencial carcinogênico de determinados agentes químicos, vêm sendo continuamente desenvolvidos e implementados com o objetivo de se conhecer o processo carcinogênico e identificar os agentes indutores, assim como agentes quimioterápicos (HEIDELBERGER et al., 1983).

1.1.2. Transformação Celular

A transformação traz a vantagem de ser um sistema onde a seqüência biológica dos eventos possui semelhança àquela que ocorre na carcinogênese. O tratamento de células em cultura com agentes oncogênicos tornou-se o meio mais fácil, objetivo e controlado de estudar-se alterações celulares que conduzem à transformação maligna. Em contraste, na transformação maligna *in vivo* existe a dificuldade em determinar qual a participação dos inúmeros fatores, tais como o estado nutricional do animal, níveis de hormônios, infecções

com microorganismos ou parasitas, nos eventos carcinogênicos (SIVAK & TU, 1984; RUDDON, 1987).

A transformação celular envolve mudanças num grande conjunto de propriedades, podendo causar alterações nas interações célula-célula (LOEWENSTEIN, 1979; KLAUNIG & RUCH, 1990; REN et al., 1990; YAMASAKI, 1990), célula-substrato (MURRAY et al., 1980; KESKI-OJA et al., 1985; NERMUT, 1991) e célula-meio (HOLZER et al., 1986; CROSS & DEXTER, 1991), induzindo mudanças no comportamento e padrão de crescimento em cultura. Como a transformação celular apresenta relações com o processo de carcinogênese e pode ser induzida por diferentes agentes (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985), ela tem sido grandemente estudada como análogo ao desenvolvimento neoplásico.

Existem muitas mudanças que podem ser induzidas em cultura celular por carcinógenos, e para as quais existem evidências de associação com o fenótipo celular neoplásico. A transformação celular *in vitro* pode muitas vezes estar acompanhada de modificações nas características de crescimento como: aquisição de independência de ancoragem, perda da inibição por contato, diminuição da necessidade nutricional, estando estas características geralmente, mas não obrigatoriamente, correlacionadas com a tumorigênese (SMETS, 1980; WIGLEY, 1990; BISHOP, 1991; GENARI et al., 1998).

A eficiência com a qual certos carcinógenos químicos transformam as células em cultura, levando-as à independência de ancoragem, vem sendo utilizada como teste de escrutínio rápido para avaliar compostos químicos que possam ter potencial carcinogênico (WIGLEY, 1990).

Entre as alterações comportamentais mais freqüentemente observadas depois da transformação está o crescimento celular em múltiplas camadas, indicando a perda de inibição por contato (ABERCROMBIE, 1979; GENARI et al., 1996; 1998; GENARI & WADA, 2000). A transformação celular geralmente está associada a alterações no complemento cromossômico, podendo apresentar mudanças no grau de ploidia celular ou aberrações cromossômicas individuais (BIANCHI & AYRES, 1971; BIEDLER, 1976;

GILVARRY, et al., 1990; MATSUOKA, et al., 1998; GENARI & WADA, 1995; 2000; 2003).

Algumas modificações nas propriedades celulares decorrentes da transformação envolvem alterações dos componentes e/ou funções da superfície celular. Nas células transformadas várias proteínas e glicoproteínas de superfície estão presentes em concentrações reduzidas ou mesmo ausentes (HYNES, 1990). Entre essas proteínas encontra-se a fibronectina, uma proteína da matriz extracelular que desempenha várias funções, como na migração, adesão ao substrato e no espalhamento celular, e freqüentemente está presente em quantidades reduzidas após a transformação induzida por diferentes agentes (HAYMAN et al., 1981; ALITALO et al., 1982; NERMUT et al., 1991) e em culturas celulares provenientes de certos tipos tumorais (MURRAY, 1980; HYNES, 1990). Alguns estudos indicam ainda que o decréscimo dessa proteína pode ser consequência da diminuição de sua síntese ou à inabilidade desta célula transformada em reter a fibronectina na sua superfície (CHEN et al., 1984; 1987; HYNES, 1990). Essas modificações acabam interferindo no processo de adesão, levando alguns tipos celulares transformados a crescer em suspensão (sem se fixar a um substrato) ou apresentando menores índices de adesão (HAYMAN et al., 1981; COOK & CHEN, 1988; GENARI et al., 1998).

As alterações morfológicas e de adesão em função da transformação celular podem estar relacionadas ainda, ao citoesqueleto, uma vez que este se encontra associado à manutenção da forma celular assim como aos elementos de matriz extracelular (CASELITZ et al., 1981; BEN-ZE'EV, 1985; 1987; BUTTON et al., 1995; HANSEN et al., 2000).

Assim, o objetivo da transformação é entender a tumorigênese em organismos vivos, assim como os eventos moleculares envolvidos nesse processo (SMETS, 1980; BISHOP, 1991).

1.1.3. Mecanismos de transformação

A carcinogênese pode ser considerada como a aquisição de um diferente estado de constância celular em relação à normalidade, no qual as células não respondem de forma convencional aos mecanismos homeostáticos. Perturbações do DNA celular são essenciais para a carcinogênese, entretanto somente tais perturbações por si mesmas não são suficientes para causar transformação neoplástica em todos os casos. Portanto, as células emergentes do clone neoplástico acumulam uma série de mudanças genéticas ou epigenéticas que direcionam modificações na atividade gênica e conduzem a um fenótipo alterado sujeito a seleção (BERTRAM, 2001; PONDER, 2001).

De maneira geral, o desenvolvimento neoplásico é definido como uma seqüência de eventos, distribuídos em *iniciação*, *promoção* e *progressão*. A fase de *iniciação* consiste em uma alteração irreversível em uma célula normal caracterizada pela capacidade intrínseca de crescimento autônomo. Isso implica modificação do DNA celular em um ou mais sítios genômicos que culminará em um evento mutacional e hereditário. A fase de *promoção* é caracterizada pelo desenvolvimento clonal das células iniciadas e, portanto pela fixação do genoma mutado em células tumorais. A variabilidade genética adquirida dentro do clone original de células tumorais, favorecendo a seleção seqüencial de sublinhagens celulares mais agressivas (invasivas, metastáticas, resistentes a drogas) e conseqüentemente com vantagens de crescimento em relação a células normais resultaria na fase de *progressão* (HASCHEK & ROSSEAUX, 1998; WILLIANS, 2001).

A iniciação por carcinógenos químicos pode gerar eventos mutacionais. Tais substâncias podem ligar-se covalentemente a sítios de DNA formando aductos. Alguns desses carcinógenos químicos como os “agentes alquilantes” podem reagir diretamente com DNA, enquanto a outros, para tal, é necessária a ativação metabólica por enzimas, como por exemplo, do sistema citocromo P450 de monooxigenases. A princípio, esse conjunto enzimático teria a função de detoxificação por tornar seus substratos mais polares, contudo esse processo pode implicar também na produção de espécies eletrofilicamente reativas. Por exemplo, agentes como a metilnitrosuréia e etilnitrosouréia podem formar

aductos de DNA diretamente (JANSEN et al., 1994; RAJEWSKY et al., 2000), ao passo que N-nitrosodietilamina (AIUB et al., 2003) e dibenzo[α]pireno (DIAMOND et al., 1980; BUTERS et al., 2002) necessitam ser metabolicamente ativados. Em ambos os casos, a forma reativa do carcinógeno (eletrófilo) é deficiente em elétrons e pode interagir não-enzimaticamente com sítios ricos em elétrons (nucleófilos) que não se limitam exclusivamente ao DNA, mas também RNA e proteínas. As células em geral, possuem eficientes sistemas enzimáticos de reparo ao DNA danificado (RAJEWSKY et al., 2000), além de proteínas de regulação do ciclo celular, como a p53, que impedem a replicação até que o reparo tenha se completado ou ainda, se o dano for de grande extensão, induzem a célula à morte celular programada (apoptose) (BERTRAM, 2001). Porém, se não devidamente reparados, os aductos provocam distorções configuracionais ou conformacionais no DNA que podem levar a uma infidelidade em sua replicação, gerando mutações.

Carcinógenos químicos podem também estar atuando através da produção de aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais. Alterações na ploidia e amplificação gênica podem resultar em superexpressão ou expressão inapropriada de um gene específico; quebra cromossômica e recombinações levam a perda de gene ou sua fusão com outro gene resultando em uma proteína quimérica com função alterada (ALADJEM & LAVI, 1992; SARGENT et al., 1996; SASAKI et al., 1998; PIHAN & DOXSEY, 1999; CASTELLONE et al., 2003). Esses desequilíbrios são freqüentes em populações celulares neoplásicas.

Eventos epigenéticos ou que não causam alterações genômicas estruturais também podem atuar de forma a resultar em neoplasia ou podem contribuir com os mecanismos genéticos para que isso ocorra. Carcinógenos epigenéticos ou não genotóxicos podem interferir em processos regulatórios intracelulares de controle da proliferação, morte e diferenciação. Dentre os mecanismos propostos para a ação dessas substâncias estão o bloqueio da diferenciação celular (ISFORT, 2000), bloqueio da comunicação intercelular (YAMASAKI, 1990; 1996), mudanças irreversíveis na transcrição do DNA, metilação alterada (PONDER, 2001; SHIRAISHI & SEKIYA, 2002), toxicidade crônica com

contínuo aumento da proliferação celular (MIYAGAWA et al., 1998) e efeitos hormonais (IMAGAWA et al., 2002).

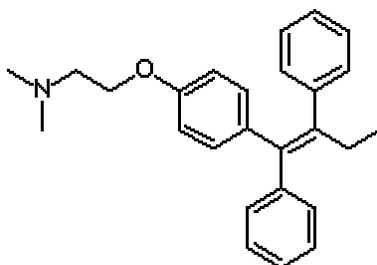
Carcinógenos químicos podem atuar igualmente através da ativação de viroses oncogênicas latentes. O Epstein-Barr vírus, associado com carcinoma nasofaríngeo, expressa a proteína-1 latente de membrana (LPM1); ratos transgênicos que expressam essa proteína em sua epiderme, quando tratados com carcinógenos químicos, desenvolvem papilomas (lesões benignas) (CURRAN et al., 2001). Fibroblastos NIH 3T3 em cultura infectados com vírus HPV 6 (encontrado em lesões genitais benignas), e expostos a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina formam tumores em camundongos imunodeficientes (MITRANI-ROSENBAUN & TSVIELI, 1992).

Alterações celulares que comumente culminam em transformação neoplástica freqüentemente estão vinculadas à expressão inapropriada de genes ou ainda à inativação do gene ou seu produto protéico. Genes (*protooncogenes*) que normalmente estão envolvidos em caminhos de sinalização que estimulam a proliferação celular quando mutados podem causar transformação e são denominados *oncogenes*. Os oncogenes causam alterações celulares ou por serem expressos excessivamente ou por expressarem produtos hiperativos (SANTOS JR & WADA, 2001). Já os genes “*supressores de tumor*”, os quais codificam para proteínas que normalmente atuam nos “*checkpoints*” do ciclo celular ou na morte celular, podem estar inativados em populações celulares neoplásticas (BISHOP, 1991). Evidências apontam que mutações no oncogene *ras*, presente em tumores mamários de ratos, poderiam ser causadas pelo carcinógeno metilnitrosuréia e que, possivelmente, estaria associado à ativação de outros oncogenes de maneira tecido-alvo específica (SUKUMAR & BARBACID, 1990). Por outro lado, mutações no gene supressor de tumor p53 são freqüentes em tumores pulmonares de fumantes e existem indícios de que essas mutações sejam causadas por um dano direto ao DNA pelos carcinógenos do cigarro (HAINAUT & PFEIFER, 2001). Mutações em gene p53 ocorrem em 30 a 60% dos cânceres de bexiga humanos; o espectro mutacional de p53 nesses cânceres possui elevada correlação com a localização de aductos de DNA induzidos pelo 4-

aminobifenil (um importante agente etiológico do câncer de bexiga) em p53 (FENG et al., 2002).

Portanto, carcinógenos químicos podem atuar em todas possíveis múltiplas etapas da carcinogênese, como iniciação, promoção e progressão, contribuindo para o desenvolvimento ou para a indução do fenótipo transformado.

1.2. ((Z)-1-{4-[2-(dimetilamino)etoxi]fenil}-1,2-difenil-1-buteno): tamoxifeno (TAM)



Tamoxifeno

Desde 1896, quando George Beatson demonstrou que a ovariectomia induzia a regressão de tumores mamários em mulheres, o objetivo da terapia endócrina para o câncer de mama tem sido privar o corpo humano de estrogênio. Até meados da década de 70 métodos cirúrgicos como a própria ovariectomia, a hipofisectomia ou a adrenalectomia eram os recursos utilizados para obter diminuição da secreção de estrogênio e, por conseguinte a regressão do câncer de mama estrogênio-dependente. A necessidade desses procedimentos foi reduzida com a introdução da droga tamoxifeno (TAM), cuja eficácia foi primeiramente descrita em 1971 em um estudo clínico realizado por Cole e colaboradores (CLARKE et al., 2001). Em 1977 foi aprovado pela Food and Drug Administration como droga de escolha para o tratamento de mulheres com câncer de mama avançado e alguns anos mais tarde como tratamento adjuvante do câncer de mama primário (OSBORNE, 1998).

Devido à sua atividade antiestrogênica no tecido mamário, o TAM vem sendo utilizado no tratamento endócrino de tumores mamários receptor de estrogênio (ER) positivos e ER indefinidos, causando uma redução de até 47% na incidência de tumores contralaterais (EBCTCG, 1998) em pacientes previamente diagnosticadas para essa

neoplasia sendo que naquelas que possuem mutação no gene BCRA1 ou no BCRA2, essa redução pode chegar a 75% (NAROD et al., 2000). Essa droga também vem sendo estudada em testes clínicos para tratamento preventivo de mulheres saudáveis que apresentam risco potencial elevado para o desenvolvimento do câncer de mama (KING, 1995). Considerando-se os estudos isoladamente, os resultados são ainda contraditórios quanto à redução da incidência da malignidade através da profilaxia pelo TAM, mostrando benefícios nos Estados Unidos (FISHER et al., 1998), mas não no Reino Unido (POWLES et al 1998) e na Itália (VERONESI et al, 1998). Porém Cuzick et al. (2003), em uma revisão analítica dos mais recentes e maiores testes clínicos que incluem resultados sobre a ação preventiva do TAM, concluíram que a droga reduziu em 38% a incidência de câncer de mama.

O TAM é um trifeniletileno não esteróide que possui propriedades anti-estrogênicas e estrogênicas e devido a essas atividades antagonistas e agonistas ao estrogênio essa droga é classificada como um SERM (modulador seletivo de receptor de estrogênio) (PHILLIPS, 2001). Além do efeito antiestrogênico na glândula mamária, sua atividade estrogênica resulta em aumento da densidade óssea em mulheres pós-menopausa e reduz as concentrações séricas de colesterol total e LDL (*low density lipoprotein*) (OSBORNE, 1998). As propriedades farmacológicas benéficas relacionadas ao caráter estrogênico do TAM têm promovido o desenvolvimento de novos SERMs, como o toremifeno e o raloxifeno, drogas que poderiam prevenir a osteoporose e o câncer de mama (PHILLIPS, 2001) e que possuíssem menos efeitos colaterais.

Todavia, trabalhos recentes mostram que o TAM pode causar câncer endometrial dentre outros sérios efeitos colaterais nos pacientes tratados. O tratamento por cinco anos melhora substancialmente a prognose para pacientes de câncer de mama, porém, o tratamento por tempo maior não demonstra melhora significativa e essencialmente aumenta o risco para câncer endometrial (BERNSTEIN et al., 1999; BERGMAN et al., 2000). Vários dos efeitos indesejáveis do tamoxifeno têm estimulado a pesquisa e o uso de outros antineoplásicos para o tratamento endócrino do câncer de mama, como os inibidores de aromatase Anastrozole e Letrozole. Essas drogas, aparentemente, são mais eficientes na

regressão do câncer, na diminuição da ocorrência de câncer contralateral, além de estarem relacionadas a uma menor incidência de câncer endometrial (NABHOLTZ et al., 2000; BAUN, et al., 2003; ELLIS, et al., 2003) e outros efeitos colaterais quando comparadas ao TAM.

O TAM é potente hepatocarcinógeno em ratos, tanto nos machos quanto nas fêmeas (GREAVES et al., 1993; HARD et al., 1993; WILLIAMS et al., 1993), como também é indutor de adenocarcinoma uterino em camundongos e ratos neonatos tratados (NEWBOLD et al., 1997; CARTHEW et al., 2000). Ensaios com antineoplásicos como o TAM e outros compostos análogos estruturais demonstraram que essas drogas induzem aneuploidias e alterações cromossômicas estruturais em fígado de rato (SARGENT et al., 1996; STYLES et al., 1997) e em células embrionárias de hamster sírio em cultura (células SHE) (TSUTSUI et al., 1997). O TAM também forma aductos em DNA de hepatócitos de rato (HAN & LIEHR, 1992; GAMBOA DA COSTA et al., 2001) sendo seus metabólitos mutagênicos em células da linhagem V79 manipuladas para expressar *rHSTa*, uma enzima que pode converter esses metabólitos a potentes compostos genotóxicos (RAJAH & PENTO, 1995; GLATT et al 1998; YADOLLAHI-FARSANI et al., 2002). A transformação celular também é evidente em células SHE (METZLER & SCHIFFMANN, 1991; TSUTSUI et al., 1997) e fibroblastos 3Y1 que superexpressam o gene *c-Src* (ZHONG et al., 2001). TAM induz a formação de aductos em DNA por seus metabólitos em vários tecidos de macacos da espécie cinomolgo, incluindo útero, sugerindo um possível mecanismo genotóxico relacionado à indução do câncer endometrial em humanos (SHIBUTANI et al., 2003; SCHILD et al., 2003).

Entretanto, existem estudos conflitantes que indicam que o TAM possui a propriedade de atuar como supressor da promoção tumoral, tanto em pacientes com câncer de mama, como em células em cultura, por diminuir a formação de peróxidos, como o H_2O_2 , que causam a oxidação de macromoléculas biológicas incluindo o DNA, o RNA, proteínas e lipídeos (LIM et al., 1992; THANGARAJU et al., 1992; WEI & FRENKEL, 1992; BHIMANI et al., 1993; WEI et al., 1998; DAOSUKHO et al., 2002). Portanto, existe a necessidade de que o potencial carcinogênico e/ou citotóxico do TAM seja amplamente

investigado em diferentes modelos de estudo, para melhor entendimento de seus efeitos nas propriedades de diferentes tipos celulares.

1.2.3. O TAM e seus mecanismos de ação: da apoptose à transformação

O TAM possui efeitos diferenciados nos vários tecidos, podendo ser responsável pela regressão tumoral bem como pela indução de um câncer. Os mecanismos dessas ações podem estar relacionados à interação ligante-receptor e/ou também à expressão diferencial dos receptores de estrogênio alfa e beta (ER- α e ER- β) (KATZENELLENBOGEN & KATZENELLENBOGEN, 2000) ou mesmo a caminhos independentes de ER.

O TAM é um antagonista do estrogênio em ER- β e pode apresentar atividade agonista ou antagonista em ER- α , dependendo do tecido alvo ou da espécie animal a que é administrado. ER- α é um fator de transcrição envolvido na regulação de genes promotores do crescimento como o TGF- α (*transforming growth factor- α*) (KATZENELLENBOGEN & KATZENELLENBOGEN, 2000). A ação antiestrogênica do TAM no ER- α do tecido tumoral mamário humano desencadeia mecanismos que levam as células-alvo à citostase (parada da proliferação celular) ou ao efeito citotóxico (morte celular) (KEEN et al., 1997; CAMERON et al., 2000). Estes efeitos têm sido observados, sendo que em cultura de células concentrações de nanomolares de TAM possuem ação antiproliferativa que pode ser revertida, enquanto concentrações de micromolares induzem morte celular por apoptose (MANDLEKAR & KONG, 2001). Trabalhos recentes mostram que o TAM também induz apoptose em células tumorais e não tumorais que não possuem ER (JAN et al., 2000), sugerindo-se para isso que essa droga desencadeie vários dos caminhos de sinalização de apoptose.

1.2.3.1. Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada que pode ser iniciada por estímulos químicos (drogas, produtos químicos, etc.), físicos (radiação) e biológicos (citocinas, vírus, etc.) e por diversas formas de indução de injúria celular ou estímulos fisiológicos, que podem direcionar vários caminhos de sinalização convergindo a um ponto

apoptótico comum, a ativação de cisteína-proteases chamadas caspases. As caspases são responsáveis em parte, pelas mudanças celulares que ocorrem durante a fase de execução da apoptose como a fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. As caspases podem ser ativadas (pois se encontram na forma de pró-enzimas) diretamente através da ligação de uma caspase iniciadora, por exemplo, caspase-8, a um complexo ligante-receptor de morte (por exemplo, fator de necrose tumoral – TNF-ligado ao receptor para TNF, que é um receptor de morte). Outros estímulos apoptóticos podem provocar alterações mitocondriais culminando na liberação do citocromo *c* e, por conseguinte, sua associação a Apaf-1 e procaspase-9. Este complexo protéico chamado apoptossomo, após ativação por dATP, pode então acionar a caspase iniciadora caspase-9 que cliva e ativa outras caspases ditas efetoras, como a caspase-3. As caspases efetoras clivam proteínas (após um resíduo de aspartato em um tetrapeptídeo específico) cuja ativação/desativação resultará na execução da apoptose (JÄÄTELA, 1999; LOWE & LIN, 2000).

O TAM parece atuar em diversos caminhos na sinalização apoptótica, o que inclui a modulação de PKC (proteína quinase C), calmodulina, desregulação da concentração de cálcio, *c-Myc* e MAP-quinases dentre outros (MANDLEKAR & KONG, 2001).

Vários trabalhos demonstram que TAM induz a atividade de caspases em células ER- α positivas e negativas, como células de linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA MB 231 e BT-20, células HeLa e linhagens de epitélio mamário normal (MANDLEKAR et al., 2000; DIETZE et al., 2001; SALAMI & KARAMI-TEHRANI, 2003) e portanto, que TAM desencadeie morte celular programada por apoptose.

PKC possui um papel controverso na apoptose induzida por TAM, pois existem pelo menos 11 isoformas de PKC que exercem efeitos ou pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos (MANDLEKAR & KONG, 2001). Cheng et al. (1998) não apresentam um consenso se TAM ativa ou inibe PKC, afirmando que TAM inibe a translocação citoplasma-membrana de PKC, mas na mesma concentração não afeta a atividade da enzima. Gundimeda e colegas relatam uma ativação inicial da proteína antes de sua

irreversível inativação. Um mecanismo proposto para a essa regulação bidirecional de PKC envolve a produção de estresse oxidativo por TAM, visto que essa ativação/inativação de PKC e inibição do crescimento celular podem ser bloqueadas por antioxidantes (GUNDIMEDA et al., 1996) Contudo, TAM também pode desencadear apoptose por caminhos independentes de PKC (SIMARD et al., 2002).

A proteína ligada a cálcio calmodulina tem mostrado ser uma mediadora de apoptose em vários tipos celulares e tem sido associada à regulação da sinalização de apoptose relacionada à proteína DAP quinase-2 (COHEN et al., 1997; KAWAI et al. 1999). O TAM pode ligar-se à AMP-cíclico fosfodiesterase dependente de calmodulina, inibindo-a (GULINO et al., 1986; O'BRIAN et al., 1990) e subsequentemente inibindo os sinais por ela gerados.

Um outro possível mecanismo é o aumento do influxo de cálcio extracelular/liberação do cálcio intracelular provocado pelo TAM. Isso foi observado em células tumorais e não tumorais utilizando-se concentrações de micromolares de TAM. Sugere-se que esses eventos possam ser iniciados com a introdução do TAM (por ser altamente lipofílico) na bicamada lipídica da membrana celular (JAIN & TRUMP, 1997; JAN et al., 2000; ZHANG et al., 2000). Aumentos prolongados da concentração de cálcio podem ativar diretamente endonucleases que clivam o DNA ou mesmo outras proteases, fosfatases e fosfolipases dependentes de cálcio, levando à perda da integridade estrutural da cromatina (CLAPHAM, 1995; SMAILI et al., 2003).

Segundo Kang et al. (1996), o TAM causaria um aumento da expressão de *c-Myc*, o qual foi observado em células ER- α negativas. O TAM a 1 micromolar por 72 horas aumentou o nível de *c-Myc* a expressão de seu RNAm e a adição de uma sequência antisense de *c-Myc* inibiu a apoptose induzida por TAM. *c-Myc* parece necessário para uma resposta eficaz a diversos estímulos apoptóticos, como citocinas inflamatórias, dano de DNA e agentes quimioterápicos (DONG et al., 1997; XU et al., 1997).

Os dois membros da família das MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase*) e p38 estão associados à indução da transcrição de genes

relacionados a apoptose ou mesmo à ativação das caspases. O envolvimento dessas proteínas na apoptose é estímulo e tipo celular dependente e também seu papel pode ser complementar ou essencial nesse evento. Células MCF-7 ER- α positivas e células MDA MB231 ER- α negativas quando tratadas com TAM exibiam aumento de atividade de JNK1. Porém quando eram tratadas com vitamina E (um antioxidante) a ação de JNK1 era abolida (MANDLEKAR et al., 2000) bem como a apoptose. O metabólito do TAM, 4-hidroxitamoxifeno, ativa p38 em células ER- α positivas e o tratamento com o inibidor seletivo de p38, SB203580, diminui a morte dessas células por apoptose. Essas informações podem indicar que o TAM ative JNK e p38 através da indução de stress oxidativo ou eventos iniciados na membrana (ZHANG & SHAPIRO, 2000).

Por outro lado existem estudos que mostram que o TAM e o hidroxitamoxifeno podem induzir morte celular de forma caspase-independente, sugerindo a ação de outras proteases efetoras, como a calpaína, para a apoptose ou mesmo outro tipo de morte celular programada, semelhante à necrose (SALAMI & KARAMI-TEHRANI, 2003; OBRERO et al., 2002). Bursch et al. (1996; 2000) relatam morte celular programada autofágica induzida por TAM em células MCF-7, caracterizada pela degradação autofágica do aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e polirribossomos precedendo destruição do núcleo e presença do citoesqueleto de actina e citoqueratina; na apoptose há ausência de vacúolos autofágicos e ocorre desintegração do citoesqueleto. Portanto, é interessante a avaliação de como são conduzidos efeitos citotóxicos do TAM nos diferentes tipos celulares.

1.2.3.2. Transformação neoplásica

No fígado, o TAM é metabolizado por enzimas do citocromo P450, formando vários produtos de detoxificação como o N-desmetiltamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, α -hidroxitamoxifeno, dentre outros (WHITE, 1999; PHILLIPS, 2001). Considerando-se experimentos *in vivo*, o TAM e seus metabólitos parecem formar aductos em DNA de hepatócitos de ratos (DAVIS et al., 1998; GAMBOA DA COSTA et al., 2001) e essa genotoxicidade estaria fortemente relacionada a seu potencial hepatocarcinogênico nesses animais (GREAVES et al., 1993; HARD et al. 1993; WILLIAMS et al., 1993). Porém, em

camundongos, o TAM forma aductos em menor quantidade que em ratos, sendo que em hepatócitos de camundongos em cultura essa quantidade chega a ser seis vezes menor que a detectada em hepatócitos de rato *in vitro* (PHILLIPS et al., 1996). Estes dados podem corroborar com o fato de que o fígado não é órgão-alvo da carcinogenicidade do TAM em camundongos (PHILLIPS, 2001). Em humanos, o TAM não está associado ao aumento na incidência de câncer hepático (RUTQVIST et al., 1995) e nem à formação de aductos em DNA em hepatócitos em cultura; contudo nessas condições *in vitro*, α -hidroxitamoxifeno forma aductos, mas em proporção 100 vezes menor que em hepatócitos de rato (PHILLIPS et al., 1996).

Aparentemente, em ratos o TAM não apresenta genotoxicidade em tecidos extra-hepáticos (CARTHEW et al., 2000; GAMBOA DA COSTA et al., 2001), porém o TAM mostra-se tumorigênico em endométrio de ratos e camundongos neonatos (NEWBOLD et al., 1997; CARTHEW et al., 2000). Em mulheres, alguns trabalhos apontam a formação de aductos de DNA pelo TAM no endométrio (SHIBUTANI et al., 1999; 2000) e em leucócitos (HEMMINKI, et al., 1997), porém há contradições (CARMICHAEL et al., 1996; BARTSH et al., 2000; PHILLIPS, 2001).

Mecanismos não-genotóxicos mediados pela afinidade do TAM ao ER podem estar envolvidos em um potencial carcinogênico dessa droga. Existem substanciais evidências que hormônios desempenham um importante papel na etiologia de diversos cânceres humanos (EMONS et al., 2000; HENDERSON et al., 2000; IMAGAWA et al., 2002; RUSSO et al., 2003). Por exemplo, a terapia de reposição hormonal aumenta o risco para desenvolvimento de câncer endometrial associado ao estrógeno; isso se deve provavelmente à atividade mitogênica do estrógeno e seus análogos. O aumento da atividade mitótica aumenta a probabilidade de mutações aleatórias que confirmam uma seleção de células com vantagem de crescimento autônomo, resultando em um fenótipo malignamente transformado (EMONS et al., 2000; HENDERSON et al., 2000). O caráter estrogênico ou antiestrogênico do TAM sobre o endométrio ainda não está bem definido. O TAM parece ter uma ação proliferativa no endométrio, o que evidencia uma atividade agonista ao estrogênio, mas pode estar relacionado à atrofia endometrial em outros casos,

que aparenta uma atividade antagonista. Portanto, os efeitos do TAM sobre o endométrio humano parecem refletir um mecanismo dependente de ER (BERGMAN et al., 2000).

A ação tumorigênica do TAM em endométrio de ratos e camundongos tratados após o nascimento, segundo Carthew e Newbold, pode ocorrer devido a uma perturbação hormonal no desenvolvimento do tecido (NEWBOLD et al., 1997; CARTHEW et al., 2000).

A carcinogênese freqüentemente envolve falhas seletivas no processo de apoptose que prolongam a sobrevivência de células mutadas e, portanto, um dos mecanismos pelos quais oncogenes promovem carcinogênese é a inibição da apoptose (LOWE & LIN, 2000; JOHNSTONE et al., 2002). Segundo pesquisas *in vitro*, o TAM pode modular mecanismos de regulação celular, e devido a esse fato, induzir resistência a apoptose pelo TAM em células cancerosas e mesmo, selecionar células com propriedades de crescimento mais agressivas. Em uma linhagem de células cancerosas endometriais humanas o TAM e o hidroxitamoxifeno exibem ação agonista por estimular atividade transcricional mediada por ER (BARSALOU et al., 1998), proliferação celular e ativação da expressão do gene para transcriptase reversa de telomerase humana (*hTERT*) (WANG et al., 2002). Ações agonistas também foram observadas em cultura primária de células endometriais normais (STACKIEVICZ et al., 2001). Mesmo em células de câncer de mama ER-positivas, onde sua atividade antiestrogênica é bastante pronunciada, o hidroxitamoxifeno pode induzir a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular (HODGES et al., 2003) e na sobrevivência (LEVENSON et al., 2002). Células ER-negativas, como de melanoma humano, também desenvolvem resistência à atividade apoptótica do TAM e sofrem alterações no perfil de expressão gênica de proteínas do controle do ciclo celular e apoptose (McCLAY & JONES, 1999).

Ações relacionadas à promoção tumoral também são atribuídas ao TAM. Em camundongos tratados com N-etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, um agente alquilante, o TAM induziu hiperplasia do endométrio, porém nenhum adenocarcinoma, ou seja, o TAM promoveu uma lesão pré-neoplásica que não progrediu para um fenótipo maligno

(TAKAHASHI et al., 2002). Em uma linhagem de fibroblastos de rato, ER-negativa, que superexpressa o gene *c-Src* (presente em muitos cânceres humanos), o tratamento com TAM proporcionou a habilidade dessas células apresentarem crescimento independente de ancoragem, comportamento esse relacionado à transformação fenotípica (ZHONG et al., 2001).

Citotoxicidade e aneuploidia estão relacionadas a transformação celular pelo TAM em células embrionárias de hamster sírio (SHE), que também não expressam ER (METZLER & SCHIFFMANN, 1991; TSUTSUI et al., 1997).

Portanto, algumas evidências apontam o TAM como uma droga que induz carcinogênese por mecanismos genotóxicos e também, possivelmente, por mecanismos não-genotóxicos, dependendo da espécie animal, do tecido alvo e do contexto celular (PHILLIPS, 2001).

1.3. Células Vero como modelo de Estudo

A carcinogênese é processo com múltiplas etapas, envolvendo alterações genéticas sequenciais nas células alvo, levando a alterações no controle de crescimento e conseqüentemente à formação de tumores malignos. O estudo do processo de carcinogênese foi grandemente facilitado pela descoberta da transformação morfológica *in vitro*, utilizando-se cultura de células de mamíferos (COMBES et al., 1999).

As células Vero são de uma linhagem obtida a partir de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essas células vêm sendo utilizadas para estudos da transformação celular, induzida por diferentes tratamentos no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Biologia Celular da Universidade Estadual de Campinas (CARVALHO et al., 1999; GENARI & WADA 1995; GENARI et al., 1996; 1998) sendo recomendadas para estudos envolvendo citotoxicidade (ISO 10993-5, 1992). Constituem um ótimo modelo de estudo para a carcinogênese experimental, devido às suas propriedades de crescimento e comportamento em cultura (BEHRENS et al., 1989; BIRCHMEIER et al., 1993). Como as células Vero apresentam características de

crescimento em cultura bastante definidas, pequenas alterações em função de tratamentos por carcinógenos químicos poderão ser facilmente observadas através de modificações nas suas propriedades de crescimento e características morfológicas.

2. OBJETIVOS

Inicialmente, as células Vero foram expostas a diversas concentrações de tamoxifeno. De acordo com os resultados obtidos foi estabelecida uma única concentração para o direcionamento dos estudos morfológicos. O critério para a escolha foi a utilização da menor concentração capaz de causar não somente alterações celulares iniciais como também alterações manifestas mais tardiamente e que estão relacionadas ao processo de transformação fenotípica.

2.1. Objetivo Geral

Tendo em vista os fatos acima descritos, o objetivo geral deste trabalho é investigar o potencial carcinogênico e/ou citotóxico do tamoxifeno em cultura de células Vero, utilizando células não tratadas como controle. Para tal avaliação são investigadas diferentes propriedades celulares morfológicas, comportamentais e estruturais.

2.2. Objetivos Específicos

- 1 . Observar as alterações morfológicas produzidas pelo tamoxifeno sobre as células Vero, ao nível de microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura.
- 2 . Investigar a viabilidade celular em função do tratamento com tamoxifeno através de testes de citotoxicidade.
- 3 . Efetuar a análise citoquímica das células tratadas e controle não-tratadas a partir de colorações com Azul de Toluidina, para observação de espécies aniônicas tais como grupos PO_4^- , SO_3^- e COO^- , e Xylidine Ponceau, para grupos NH_3^+ .
- 4 . Verificar através da imunocitoquímica a distribuição da fibronectina nas células controle e nas células fenotipicamente transformadas pela ação do tamoxifeno.

5 . Através de teste imunocitoquímico observar a taxa de apoptose nas células Vero logo após a exposição ao tamoxifeno e a taxa de apoptose espontânea nas populações controle e fenotipicamente transformada.

3. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado está estruturada em 5 capítulos, incluindo este.

Os Capítulos 2 e 3 apresentam os resultados dos estudos sob a forma de artigos a serem submetidos em periódicos internacionais. O Capítulo 2 corresponde ao artigo intitulado “Aspectos morfológicos (microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura) de células Vero expostas ao antineoplásico Tamoxifeno” e apresenta características comportamentais e morfológicas de células Vero expostas ao TAM e transformadas por ele através de microscopia de contraste de fase, citoquímica e microscopia eletrônica de varredura; será submetido à revista Tissue & Cell. O Capítulo 3 refere-se ao artigo intitulado “Perfil de células Vero após tratamento com o antineoplásico Tamoxifeno: citotoxicidade e transformação” que apresenta os dados relacionados à ação do TAM em células Vero normais e relacionados às células transformadas por esse tratamento; inclui citotoxicidade, curva de crescimento, morfologia, deposição de fibronectina e apoptose; será submetido à revista Cell Biology International. O Capítulo 4 apresenta as conclusões gerais do trabalho e o Capítulo 5, as referências bibliográficas referentes ao Capítulo 1 – Introdução.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS MORFOLÓGICOS (MICROSCOPIA DE LUZ E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA) DE CÉLULAS VERO EXPOSTAS AO ANTINEOPLÁSICO TAMOXIFENO

Grazieli N.F. Barbieri e Selma C. Genari *

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, Campinas, SP, Brasil, CEP 13.084-971.

Palavras-chave: Transformação morfológica; Células Vero; Tamoxifeno; Características comportamentais; Microscopia de contraste de fase; Microscopia eletrônica de varredura.

Correspondências endereçadas a: Selma C. Genari. Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, Campinas, SP, Brasil, CEP 13.084-971. Tel.: ++55-19-3788-6108; fax: ++55-19-3788-6111. E-mail: sgenari@nutricell.com.br

Resumo

A transformação celular *in vitro* consiste em uma valiosa ferramenta no estudo comparativo ao processo neoplásico *in vivo*. O antineoplásico tamoxifeno (TAM), amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama, têm sido estudado em vários modelos experimentais devido a um possível efeito carcinogênico sobre o endométrio de mulheres tratadas. No presente estudo, células da linhagem Vero são inicialmente submetidas a várias concentrações de TAM (10, 20 e 30 μ M por 24 horas e 20 μ M por 48 e 72 horas) e após análise morfológica e de crescimento em subcultivos sucessivos, observou-se que o TAM causa citotoxicidade e transformação fenotípica (crescimento celular em múltiplas camadas por perda de inibição por contato) de forma concentração-dependente. A concentração de escolha para os estudos subseqüentes (citoquímico e por microscopia eletrônica de varredura) foi 30 μ M por 24 horas (concentração a partir da qual observou-se efeito transformante). Assim, utilizou-se células Vero normais tratadas pelo TAM 30 μ M por 24 horas e a linhagem T30, originada pelo mesmo tratamento e que

manteve características de transformação após repiques sucessivos. Os estudos morfológicos revelaram diminuição do número e do volume e alterações na forma celular que podem indicar morte celular por apoptose após a exposição ao TAM 30 μ M por 24 horas. A linhagem Vero T30 não diferiu das células controle em 48 horas de cultura, mas aos 14 e 17 dias de cultura observou-se a formação de grumos celulares, recobertos por muitos microvilos. São discutidos alguns possíveis mecanismos de transformação das células Vero pelo TAM.

1. Introdução

A carcinogênese é um processo com múltiplas etapas, envolvendo alterações genéticas seqüenciais nas células alvo, levando a alterações no controle de crescimento e podendo induzir a formação de tumores malignos. O estudo do processo de carcinogênese foi grandemente facilitado pela descoberta da transformação morfológica *in vitro*, utilizando-se cultura de células de mamíferos (COMBES et al., 1999).

A transformação celular *in vitro* envolve alterações em um grande conjunto de propriedades, como interações célula-célula (LOEWENSTEIN, 1979; KLAUNIG & RUCH, 1990; REN et al., 1990; YAMASAKI, 1990), célula-substrato (MURRAY et al., 1980; KESKI-OJA et al., 1985; NERMUT, 1991) e célula-meio (HOLZER et al., 1986; CROSS & DEXTER, 1991). Essas características tornam a transformação celular *in vitro* uma valiosa ferramenta no estudo comparativo ao processo neoplásico *in vivo* (IARC/NCI/EPA Working group, 1985).

O anti-estrógeno não esteroideal tamoxifeno (TAM) vem sendo utilizado desde a década de 70 como droga de escolha no tratamento do câncer de mama, reduzindo em até 47% a incidência de tumores contra-laterais (EBCTCG, 1998). Atualmente, também se tem feito o uso profilático dessa droga em mulheres que apresentam alto risco para o desenvolvimento dessa neoplasia, porém os resultados são conflitantes quanto aos benefícios (FISHER et al., 1998; POWLES et al 1998; VERONESI et al, 1998). Todavia, algumas pesquisas apontam o TAM como causador de câncer endometrial (POWLES et al 1998; BERSNSTEIN et al., 1999; BERGMAN et al, 2000)

O TAM também apresenta potente atividade hepatocarcinógena em ratos, porém sua ação em fígado de camundongos é bem mais discreta, sendo nessa espécie os testículos e ovários os órgãos-alvo (GREAVES et al., 1993; HARD et al., 1993; WILLIAMS et al., 1993; PHILLIPS, 2001). Observou-se também transformação em células de roedores em cultura (TSUTSUI et al., 1997; ZHONG et al., 2001) após tratamento com o TAM. Assim sendo, é necessário que essa droga seja amplamente investigada em diferentes modelos de estudo para melhor compreensão de seus efeitos nas propriedades de diferentes tipos celulares.

As células Vero, uma linhagem obtida a partir de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), tem sido utilizada em experimentos de transformação celular por diferentes agentes (CARVALHO et al., 1999; GENARI & WADA, 1995; 2000; GENARI et al., 1996; 1998) sendo recomendadas para estudos envolvendo citotoxicidade (ISO 10993-5, 1992). Suas características comportamentais e de crescimento em cultura a constituem num ótimo modelo para a carcinogênese *in vitro*, pois modificações nestes padrões poderão ser facilmente detectadas.

As células Vero foram submetidas a diversas concentrações de TAM, observando-se diferentes respostas comportamentais e morfológicas, que vão da citotoxicidade à transformação fenotípica, como será exposto adiante.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura Celular e Reagentes

As células Vero foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Em condições controle foram mantidas em meio Ham F10 suplementado com 5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas-SP), a 37°C, em sistema fechado de cultura. O tamoxifeno (TAM) (Sigma) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a 100µM (solução estoque), sendo as soluções diluídas em meio de cultura completo até as concentrações desejadas. Controles utilizando somente o diluente DMSO foram realizados. Uma linhagem transformada, aqui denominada Vero T30, foi obtida pela exposição de células Vero

normais a 30 μ M de TAM por 24 horas; após, essas células eram mantidas em condições normais de cultura por 10 passagens sucessivas.

2.2. Características Morfológicas e de Crescimento

As células plaqueadas em frascos de 25-cm² (Corning) à concentração inicial de 1,5 x 10⁵ células/frasco eram mantidas em condições normais de cultura por 24 horas e então, tratadas com TAM em concentrações de 10 μ M; 20 μ M e 30 μ M pelo período de 24 horas. Para maiores períodos de exposição ao TAM (48 e 72 horas) foi selecionada a concentração de 20 μ M (nesses períodos o meio com a droga era renovado a cada 24 horas). Após a exposição à droga retornou-se às condições normais de cultura. As características morfológicas e de crescimento das células controle e tratadas foram observadas diariamente ao microscópio invertido, por contraste de fase, ao longo de 10 subcultivos sucessivos. A partir da análise dos resultados de crescimento e comportamento em cultura, estabeleceu-se 30 μ M por 24 horas como a menor concentração de TAM e o menor período de exposição no qual observou-se alterações relacionadas a transformação. Assim, para os estudos subsequentes utilizou-se células Vero normais recém tratadas pelo TAM 30 μ M por 24 horas e a linhagem T30 originada pelo mesmo tratamento e que manteve características de transformação após repiques sucessivos.

2.3. Citoquímica

Placas de 6 poços (Corning) com lamínulas foram semeadas a 2 x 10⁵ células/poço com células Vero controle, com Vero T30 e com células Vero que foram submetidas a tratamento com TAM a 30 μ M por 24 horas antes do processamento. Ao fim de 48 horas de cultura as amostras apresentavam-se semiconfluentes. Foram então fixadas em metanol/ácido acético (3:1 v/v) por 1 minuto, lavadas em metanol e coradas com azul de toluidina 0,025% pH 4.

2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

As células Vero T30, Vero controle e células controle tratadas com TAM a 30 μ M 24 horas antes da fixação foram homogeneizadas e semeadas a uma densidade de 2,4 x 10⁵

células/poço sobre lamínulas em placas de 35mm (Corning). O processamento para a análise das amostras tratadas foi feito após 2, 14 e 17 dias de cultura. As amostras foram fixadas em formaldeído 2,5% / glutaraldeído 5% / ácido pícrico 0,03% em tampão cacodilato 100mM e tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em séries crescentes de etanol, secas ao ponto crítico e recobertas com ouro para análise no microscópio eletrônico de varredura.

3. Resultados

3.1. Características Morfológicas e de Crescimento

As células Vero não tratadas com TAM (grupo controle) apresentaram citoplasma finamente granuloso e forma celular predominantemente alongada, semelhante a fibroblastos (figura 1). Nas células tratadas com TAM foi evidenciada injúria celular no período seguido ao tratamento, em todas as concentrações aplicadas e em grau proporcional a essas concentrações. Pode-se observar a formação de vacúolos, vesículas e granulações citoplasmáticas grosseiras nas células Vero tratadas (figuras 2 a 6) e uma morfologia mais arredondada (figuras 4 a 6), bem como o destacamento de muitas células da superfície do frasco de cultura. Constatou-se visualmente redução do número de células viáveis e estagnação da proliferação celular nos períodos imediatos aos tratamentos, proporcionalmente à concentração utilizada do TAM. Todas as alterações celulares morfológicas e comportamentais desapareceram ao longo dos subcultivos para as células tratadas com 10 μ M /24 horas e 20 μ M /24 horas (dados não mostrados), não havendo mais diferenças em relação aos controles. Contudo, as células remanescentes dos tratamentos com 20 μ M /72horas (que corresponderia a uma exposição cumulativa a 60 μ M de TAM) (figura 7) e 30 μ M /24horas (figuras 8 e 9) que gradualmente também adquiriram uma morfologia aparentemente normal, ao atingirem confluência demonstraram os primeiros indícios de transformação fenotípica: crescimento celular em múltiplas camadas por perda de inibição por contato. Os controles continuavam a crescer em monocamadas. Essas características mantiveram-se ao longo dos sucessivos repiques. As células transformadas pelo tratamento com 30 μ M de TAM foram escolhidas para os estudos citoquímicos e

morfológicos de luz em microscopia eletrônica de varredura, pois esta foi a menor concentração transformante para células Vero.

3.2. Citoquímica

O estudo citoquímico com azul de toluidina revelou células Vero com uma morfologia variável, núcleo grande, com nucléolos evidentes e em número variável, citoplasma finamente granular. Em estado de semi-confluência as células T30 (figura 13) morfologicamente não se mostraram diferentes do controle (figura 10), porém o tratamento com TAM a 30 μ M /24 horas antes do processamento causou vacuolização citoplasmática, núcleo mais fortemente corado e morfologia mais arredondada (figura 11), sendo possível observar células liberando grandes vesículas repletas de material intracelular (figura 12), indicando provavelmente apoptose. O azul de toluidina é um corante básico que cora ânions PO_4^- , SO_3^- COO^- . Em pH 4 os grupos PO_4^- são encontrados somente em DNA ou RNA e SO_3^- e/ou COO^- em glicosaminoglicanas.

3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após 2 dias de cultura as células Vero controle (figura 14) e Vero T30 (figuras 17 e 18), aparentemente, não apresentam diferenças morfológicas; as células são bastante achatadas devido ao espalhamento, com microvilosidades sobre sua superfície e crescem em monocamada. Porém, as células que receberam 30 μ M de TAM 24 horas antes da fixação para a varredura apareciam em menor número, com forma estrelada ou arredondada e freqüentemente com aspecto apoptótico (figuras 15 e 16). Essas células mostravam muitos microvilos e eram fixas ao substrato por poucos pontos de adesão. Em 14 (figuras 20 a 23) e 17 dias de cultura (figuras 25 e 26) observa-se que as células VeroT30 cresceram em múltiplas camadas após atingirem confluência, iniciando com a sobreposição de células e subsequente formação de grumos. Neste estágio de confluência, as células menos espalhadas devido ao menor espaço entre elas também mostram uma morfologia semelhante a fibroblastos. As células superficiais dos grumos possuem grande quantidade de microvilosidades (figuras 22, 23, 25 e 26). Observam-se também células possivelmente

em apoptose (figuras 22 e 23). As Vero controle após os mesmos períodos permaneceram em monocamada (figuras 19 e 24).

4. Discussão

A avaliação de características morfológicas e comportamentais das células Vero controles e tratadas com TAM, em várias concentrações, ao longo de dez subcultivos mostrou que as células tratadas com as concentrações mais elevadas de TAM (20 μ M /72horas e 30 μ M /24horas) exibiram, após o tapete celular atingir confluência, crescimento em múltiplas camadas. Os controles permaneceram em monocamadas nas mesmas condições. Esse crescimento em múltiplas camadas indica perda de inibição por contato (ABERCROMBIE, 1979; GENARI & WADA, 1995; GENARI et al., 1996; 1998) e relaciona-se ao processo de transformação celular *in vitro*. Para as concentrações de 10 μ M por 24 horas e 20 μ M por 24 horas, observou-se a citotoxicidade do TAM, porém ao longo dos subcultivos as alterações morfológicas desapareciam e a população celular remanescente, semelhantemente ao controle, crescia em monocamada.

O azul de toluidina possui afinidade por ânions PO_4^- , SO_3^- e COO^- . Em pH 4 os grupos PO_4^- são encontrados somente em DNA ou RNA e SO_3^- e/ou COO^- em glicosaminoglicanas (SANTOS JR & WADA, 1999). Neste estudo citoquímico as células recém-tratadas com TAM 30 μ M apresentaram volume reduzido e citoplasma extremamente vacuolizado. Também observou-se células com morfologia arredondada, liberando vesículas contendo material intracelular, o que pode indicar apoptose (MAJUMDAR et al., 2001). Não foram observadas diferenças entre Vero controle e Vero T30 em condição de semiconfluência. As células Vero controle e Vero T30 após 48 horas de cultura formaram um tapete semiconfluyente, de morfologia variada, citoplasma finamente granular, com alguns vacúolos e nucléolo evidente sob coloração com azul de toluidina. A quantidade de matriz e conseqüentemente, de glicosaminoglicanas produzida durante as 48 horas de cultura pode não ter sido suficiente para o nível de sensibilidade desse método.

A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura confirmou as observações da microscopia por contraste de fase e citoquímica, como a redução o número e volume celulares, além das severas alterações morfológicas nas células Vero após tratamento com 30 μ M de TAM por 24 horas em relação ao controle não tratado. Células arredondadas, liberando vesículas, semelhantes a uma forma apoptótica, eram freqüentes. Em semi-confluência, células Vero controle e T30, após 48 horas (2 dias) de cultura não apresentaram diferenças marcantes; células com forma irregular, núcleo e nucléolo evidentes e microvilos sobre a superfície. Aos 14 e 17 dias de cultura, tanto controle como T30 apresentam tapete celular confluyente com células alongadas e com muitos microvilos, porém em T30 observa-se locais com início de sobreposição celular e grumos celulares, o que não é visto no controle. Com 17 dias os grumos em T30 são maiores e mais definidos. Nos grumos as células são mais ricas em microvilos e vesículas que no tapete celular, o que pode estar associado a um aumento na produção de proteínas ou mesmo a um aumento na liberação desse material (GENARI et al., 1996). Células possivelmente mortas (arredondadas e de superfície lisa ou recobertas por bolhas) também são encontradas sobre os grumos, o que pode estar relacionado ao elevado índice apoptótico de células T30 (BARBIERI & GENARI, submetido para publicação).

As pesquisas atuais sugerem fortemente que o TAM pode atuar como carcinógeno através de mecanismos genotóxicos e não genotóxicos, dependendo da espécie a que é administrado (GAMBOA DA COSTA et al., 2001; PHILLIPS, 2001). Sua ação genotóxica direta está vinculada à ativação metabólica do TAM em espécies eletrofilicamente reativas, o que é feito através de sistemas enzimáticos de detoxificação, como o citocromo P450 (PHILLIPS, 2001). Os aductos formados pelos metabólitos do TAM são possivelmente os maiores indutores de mutagenicidade e hepatocarcinogenicidade em ratos, porém em humanos a ativação metabólica do TAM é menos eficiente e a formação de aductos de DNA é controversa (SHIBUTANI et al., 2000a; PHILLIPS, 2001). Aliada a um sistema de reparo de DNA eficiente (SHIBUTANI et al., 2000b), sugere-se que a possível indução de câncer endometrial em humanos pelo TAM ocorra através de promoção tumoral, via receptor de estrogênio (GAMBOA DA COSTA et al., 2001; PHILLIPS, 2001). O TAM em

células em cultura parece não formar aductos em DNA, somente sendo relatado aductos e mutações relacionadas ao seu metabólito α -hidroxiTAM em células V79 geneticamente manipuladas para expressar uma sulfotransferase de rato (YADOLLAHI-FARSANI et al., 2002; GLATT et al., 1998). Isso pode dever-se ao fato de que linhagens celulares são freqüentemente deficientes em enzimas do citocromo P450 (HEIDELBERGER et al., 1983; JOSEPH & JAIWAL, 1994), o que reduziria a ativação do TAM a metabólitos DNA-reativos.

Visto este quadro é possível que o TAM tenha induzido transformação morfológica em células Vero por dano ao seu DNA não por genotoxicidade direta, mas pela ação de espécies oxigênio-reativas (*ROS*) ou mesmo pela seleção (em função de sua citotoxicidade) de uma população celular predisposta a um comportamento e crescimento desregulados.

Vários trabalhos têm apontado o TAM como um gerador de *ROS* em vários tipos celulares, sugerindo-se a participação desses elementos na apoptose (FERLINI et al., 1999; GUNDIMEDA et al., 1996; LEE et al., 2000; MANDLEKAR et al., 2000) e possivelmente na transformação celular (PAGANO et al., 2001) desencadeada pelo TAM. Embora o solvente utilizado, DMSO, seja um antioxidante (VLAHOPOULOS et al., 1999; LIU et al., 2001), a concentração do mesmo pode não ter detido a formação de *ROS* pelo TAM. Na transformação celular as *ROS* podem atuar como agentes genotóxicos ou pela promoção tumoral; além disso, as células possuem enzimas responsáveis pela inativação desses agentes, como a catalase, a glutathione peroxidase e superóxido dismutase. A saturação desses sistemas enzimáticos pode permitir que *ROS* oxidem bases ou nucleotídeos ou mesmo causarem quebra de simples ou dupla fitas de DNA. Se essas reações não são devidamente reparadas podem conduzir a mutações e, portanto, podem ser relacionadas a carcinogenicidade (WILLIANS & JEFFREY, 2000). A relação oxidação de DNA e *ROS* é observada em células e animais expostos a carcinógenos químicos, radiações e substâncias inorgânicas (WILLIANS & JEFFREY, 2000). É possível que o TAM tenha causado dano “indireto” ao DNA de células Vero presentes na população celular, proporcionalmente à concentração utilizada. Assim sendo, para os tratamentos de 10 μ M por 24 horas e 20 μ M 24 horas o mecanismo celular de proteção a agentes oxidantes tenha sido eficiente, impedindo

a oxidação de DNA que pudesse levar a mutações subsequentes e a indução da exibição de um fenótipo transformado (ARCHER, 1992). Porém, concentrações maiores de TAM (20 μ M /72horas e 30 μ M /24horas) poderiam ter causado elevada formação de ROS, saturando tanto os sistemas enzimáticos responsáveis pela inativação dessas espécies como também os mecanismos de reparo do DNA (WHITE, 1999; EPE, 2002), desencadeando mutações e, por conseguinte, transformação celular.

Por outro lado, o TAM pode induzir resistência a apoptose em células tumorais por modular mecanismos de regulação gênica. Falhas no processo de apoptose, que prolongam a sobrevivência de células mutadas, frequentemente estão associadas não só à resistência a drogas como também à carcinogênese (LOWE & LIN, 2000; JOHNSTONE et al., 2002). Mesmo em células de câncer de mama ER-positivas, onde sua atividade antiestrogênica é bastante pronunciada, um análogo do TAM, hidroxiTAM, pode induzir a transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo celular (HODGES et al., 2003) e na sobrevivência da célula (LEVENSON et al., 2002). Células ER-negativas, como as de melanoma humano em cultura, também desenvolvem resistência à atividade apoptótica do TAM e sofrem alterações no perfil de expressão de proteínas do controle do ciclo celular e da apoptose (MC'CLAY & JONES, 1999). Em células Vero, o TAM a 30 μ M causou excessiva morte celular possivelmente por apoptose (BARBIERI & GENARI, a ser submetido para publicação) e as células resistentes deram origem à população transformada (Vero T30). A resistência ao TAM foi observada antes da expansão clonal das células, sugerindo-se neste caso, que seletivamente, as células adquirem resistência ao estímulo para morte celular antes da seleção de mutações críticas nos genes de proteínas regulatórias do crescimento (KLÖHN et al., 2003) para a manifestação de um fenótipo transformado.

O TAM pode causar alterações, em células Vero, associadas à transformação celular *in vitro*, fenômeno este que pode estar relacionado ao processo neoplásico *in vivo*. Portanto, esse sistema de estudo poderia fornecer informações sobre o processo de carcinogenicidade que poderiam contribuir para uma análise de risco-benefício do uso do TAM, assim como de compostos correlatos.

Agradecimentos: Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da CAPES.

5. Referências

- Abercrombie, M., 1979. Contact inhibition and malignancy. *Nature* 281, 259-262.
- Archer, M., 1992. Chemical carcinogenesis. In: Tannock, I.F., Hill, R.P. (Eds.), *The Basic Science of Oncology*, 2nd ed. McGraw-Hill Inc. pp 102-118.
- Combes, R., Ball, M., Curren, R., Fusenig, M.F., Kirkland, D., Lasne, C., Landolph, J., Marquardt, H., McCormick, J., Muller, L., Sabbioni, E.R., Tanaka, N., Vasseur, P., Ya, H., 1999. Cell transformation assays as predictor of human carcinogenicity. *Altern. Lab. Anim.* 27, 745-767.
- Barbieri, G.N.F., Genari, S.C. Perfil de células Vero após tratamento com o antineoplásico Tamoxifeno: citotoxicidade e transformação. *Cell Biol. Int.* (a ser submetido para publicação).
- Bergman, L., Beelen, M.L.R., Gallee, M.P.W., Hollema, H., Benraadt, J., van Leeuwen, F.E., 2000. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *Lancet*, 356: 881-887.
- Bernstein, L., Deapen, D., Cerhan, J.R, Schwartz, S.M., Liff, J., McGann-Maloney, E., Perlman, J.A., Ford, L., 1999. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1654-1662.
- Carvalho, C.E., Santos Jr., A.R., Wada, M.L.F., 1999. Dexamethasone-induced chromosome number alterations in cell culture. *Med. Sci. Res.* 27, 219-221.
- Cross, M., Dexter, T.M., 1991. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64, 271-280.
- EBCTCG, 1998. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 351, 1451-1467.

- Epe, B., 2002. Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol. Chem.* 383, 467-475.
- Ferlini, C., Scambia, G., Marone, M., Distefano, M., Gaggini, C., Ferrandina, G., Fattorossi, A., Isola, G., Benedetti-Panici, P., Mancuso, S., 1999. Tamoxifen induces oxidative stress and apoptosis in oestrogen receptor-negative human cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 79, 257-263.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Redmond, C.K., Kavanah, M., Cronin, W.M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., Wolmark, N., 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90,1371-1388.
- Gamboa da Costa, G.G., McDaniel-Hamilton, L.P., Heflich, R.H., Marques, M.M., Beland, A.F., 2001. DNA adduct formation and mutant induction in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. *Carcinogenesis* 22, 1307-1315.
- Genari, S.C., Wada, M.L.F., 1995. Behavioural differences and cytogenetical analysis of a transformed cellular population derived from a Vero cell line. *Cytobios* 81, 17-25.
- Genari, S.C., Dolder, M.A.D., Wada, M.L.F., 1996. Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28, 565-572.
- Genari, S.C., Gomes, L., Wada, M.L.F., 1998. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell Biol. Int.* 22, 285-294.
- Glatt, H., Davis, W., Meinel, W., Hermersdörfer, H., Venitt, S., Phillips, D.H., 1998. Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis* 19, 1709-1713.

- Greaves, P., Goonetilleke, R., Nunn, G., Topham, J., Orton, T., 1993. Two-years carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res.* 53, 3919-3924.
- Gundimeda, U., Chen, Z., Gopalakrishna, R., 1996. Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 271, 13504-13514.
- Hard, G.C., Iatropoulos, M.J., Jordan, K., Radi, L., Kaltenberg, O.P., Imondi, A.R., Williams, G.M., 1993. Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD(BR) rats. *Cancer Res.* 53, 4534-4541.
- Heidelberger, C., Freeman, A., Pienta, R.J., Sivak, A., Bertram, J.S., Casto, B.C., Dunkell, V.C., Francis, M.W., Kakunaga, T., Little, J.B., Schechtman, L.M., 1983. Cell transformation by chemical agents – a review and analysis of the literature. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.* 114, 283-385.
- Holzer, C., Maier, P., Zbinden, G., 1986. Comparison of exogenous growth stimuli for chemically transformed cells: growth factors, serum and cocultures. *Exp. Cell Biol.* 54, 237-244.
- IARC/NCI/EPA Working group, 1985. Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Res.* 45, 2395-2399.
- ISO 10993-5, 1992. Biological evaluation of medical devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W., 2002. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.

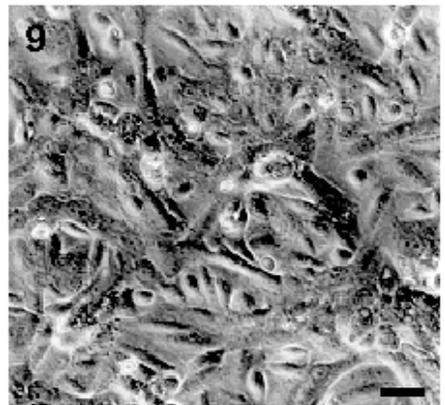
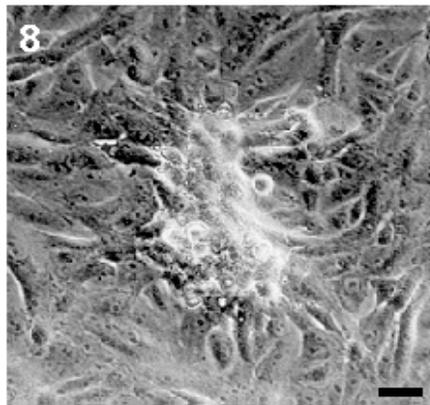
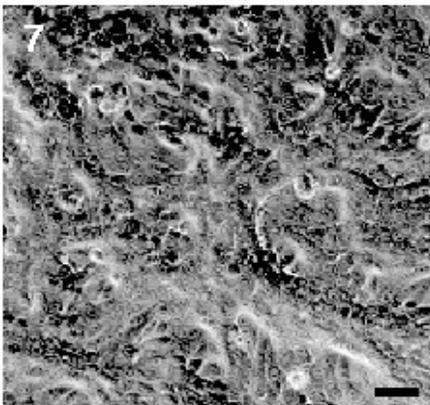
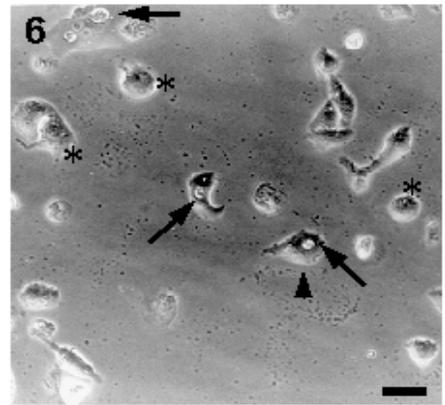
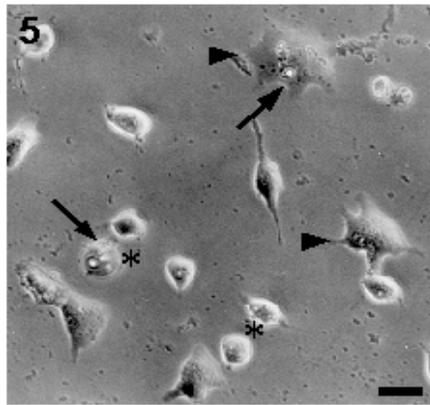
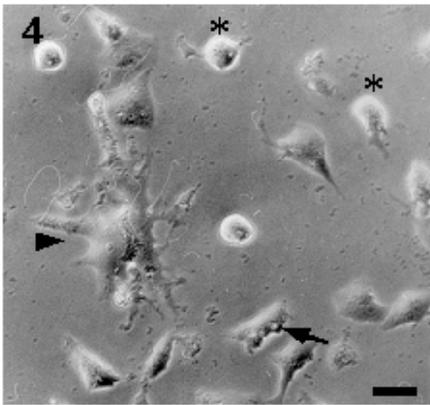
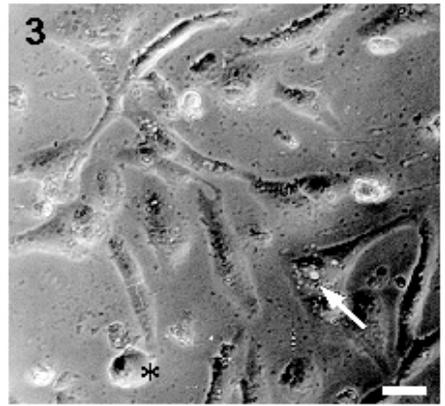
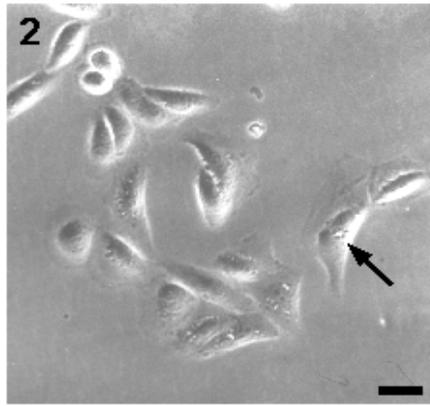
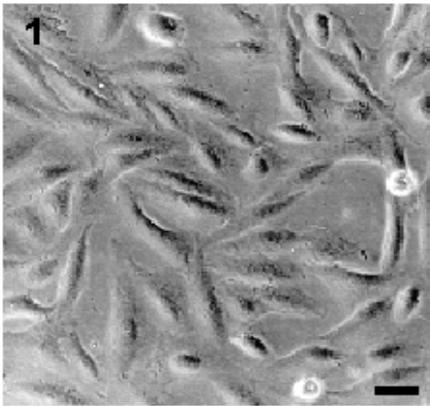
- Joseph, P., Jaiswal, A.K., 1994. NAD(P)H:quinone oxidoreductase₁ (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8413-8417.
- Keski-Oja, J., Alitalo, K., Barlati, S., Vaheri, A., 1985. Pericellular matrix changes in fibroblastic and epithelial cells induced by oncogenic transformation. In: Santi, L., Zardi, L. (Eds.), *Theories and models in cellular transformation*. Instituto Scientifico Tumori, Genoa, Italy – Academic Press. pp 55-70.
- Klaunig, J., Ruch, R.J., 1990. Biology of disease: role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab. Invest.* 62: 135-146.
- Klöhn, P-C., Soriano, M.E, Irwin, W., Penzo, D., Scorrano, L., Bitsch, A., Neumann, H-G., Bernardi, P., 2003. Early resistance to cell death and to onset of the mitochondrial permeability transition during hepatocarcinogenesis with 2-acetylaminofluorene *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10014-10019.
- Lee, Y.S., Kang, Y.S., Lee, S.H., Kim, J.A., 2000. Role of NAD(P)H oxidase in the tamoxifen-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cell Death Differ.* 7, 925-932.
- Levenson, A.S., Svoboda, K.M., Pease, K.M., Kaiser, S.A., Chen, B., Simons, L.A., Jovanovic, B.D., Dyck P.A. and Jordan, V.C., 2002. Gene expression profiles with activation of the estrogen receptor -selective estrogen receptor modulator complex in breast cancer cells expressing wild-type estrogen receptor. *Cancer Res.* 62, 4419-4426.
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C., Hei, T.K., 2001. Induction of oxyradicals by arsenic: Implication for mechanism of genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1643-1648.
- Lowe, S.W., Lin, A.W., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-495.

- Loewenstein, W.R., 1979). Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. Biophys. Acta* 560, 1-65.
- McClay, E.F., Jones, J.A., 1999. Characterization of a human melanoma cell line with non-oestrogen receptor dependent tamoxifen resistance. *Melanoma Res.* 9, 531-537.
- Majumdar, S.K., Valdellon, J.A., Brown, K.A., 2001. *In vitro* investigations on the toxicity and cell death induced by tamoxifen on two non-breast cancer cell types. *J. Biomed. Biotechnol.* 1, 99-107.
- Mandlekar, S., Yu, R., Tan, T.H, Kong, A.B.T., 2000. Activation of caspase-3 and c-Jun NH₂-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 60, 5995-6000.
- Murray, J.C., Liotta, L., Rennard, S.I., Martin, G.R. 1980. Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells . *Cancer Res.* 40, 347-351.
- Nermut, M.V., Eason, P., Hirst, E.M.A., Kellie, S., 1991. Cell/substratum adhesion in RSV-transformed rat fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 193, 382-397.
- Pagano, G., de Biase, A., Deeva, I.B., Degan, P., Doronini, Y.K., Iaccarino, M., Oral, R., Trieff, N.M., Warnau, M., Korkina, L.G., 2001. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci.* 68, 1735-1749.
- Phillips, D.H., 2001. Understanding the genotoxicity of tamoxifen? *Carcinogenesis* 22, 839-849.
- Powles, T., Eeles, R., Ashley, S., Easton, D., Chang, J., Dowsett, M., Tidy, A., Viggers, J., Davey, J., 1998. Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomised chemoprevention trial. *Lancet* 352, 98-101.
- Ren, J., Hamada, J., Takeichi, N., Fujikawa, S., Kobayashi, H., 1990. Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.* 50, 358-362.

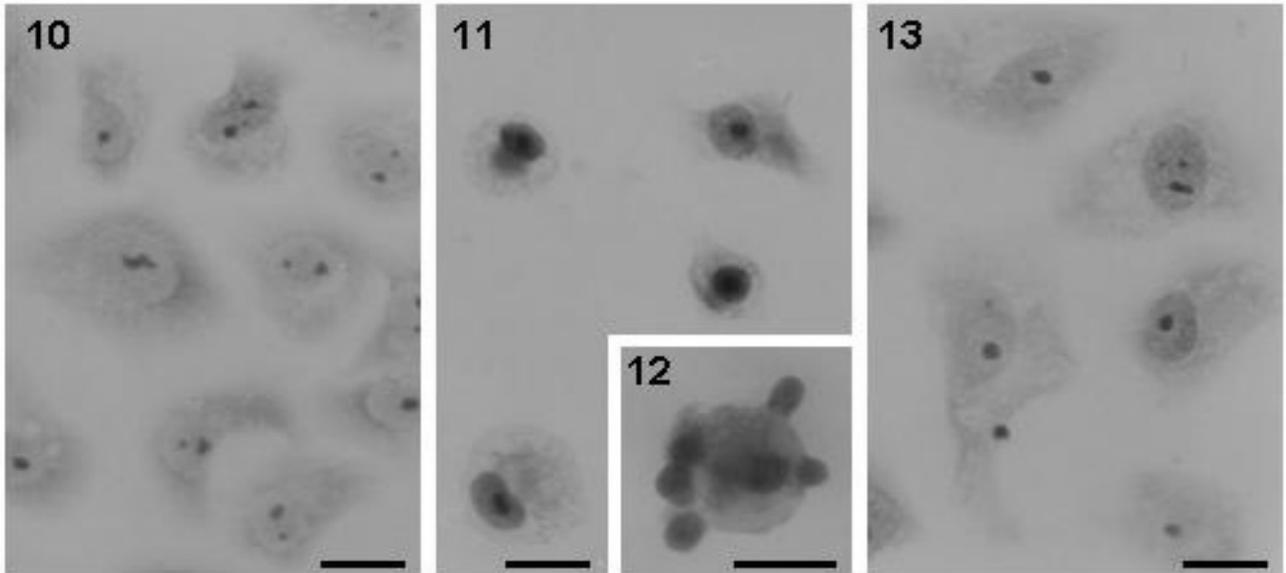
- Santos Jr., A.R., Wada, MLF. 1999. Foetal calf serum and dexamethasone effects on Vero cell growth and differentiation. *Cytobios* 99, 159-171.
- Shibutani, S., Ravindernath, A., Suzuki, N., Terashima, I., Sugarman, S.M., Grollman, A.P., Pearl, M.L., 2000a. Identification of tamoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with tamoxifen. *Carcinogenesis* 21, 1461-1467.
- Shibutani, S., Reardon, J.T. Suzuki, N., Sancar, A., 2000b. Excision of tamoxifen-DNA adducts by the human nucleotide excision repair system. *Cancer Res.* 60, 2607-2610.
- Tsutsui, T., Tagushi, S., Tanaka, Y., Barret, J.C., 1997. 17 beta-estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Can.* 70, 188-193.
- Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., Brasier, A.R., 1999. Nuclear factor-B-dependent induction of interleukin-8 gene expression by Tumor Necrosis Factor : evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94, 1878-1889.
- Veronesi, U., Maisonneuve, P., Costa, A., Sacchini, V., Maltoni, C., Robertson, C., Rotmensz, N., Boyle, P., 1998. Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomised women. *Lancet* 352, 93-97.
- White, I.N.H., 1999. The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis* 20, 1153-1160.
- Williams, G.M., Iatropoulos, M.J., Djordjevic, M.V., Kaltenberg, O.P., 1993. The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in the rat. *Carcinogenesis* 14, 315-317.
- Williams, G.M., Jeffrey, A., 2000. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Reg. Pharmacol. Toxicol.* 32, 283-292.

- Yadollahi-Farsani, M., Davies, D.S., Boobis, A.R., 2002. The mutational signature of α -hydroxitamoxifen at Hprt locus in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 23, 1947-1952.
- Yamasaki, H. 1990. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11, 1051-1058.
- Zhong, M., Lu, Z., Abbas, T., Hornia, A., Chatakondur, K., Barile, N., Kaplan, P., Foster, D.A., 2001 Novel tumor-promoting property of tamoxifen. *Cell Growth Differ.* 12, 187-192.

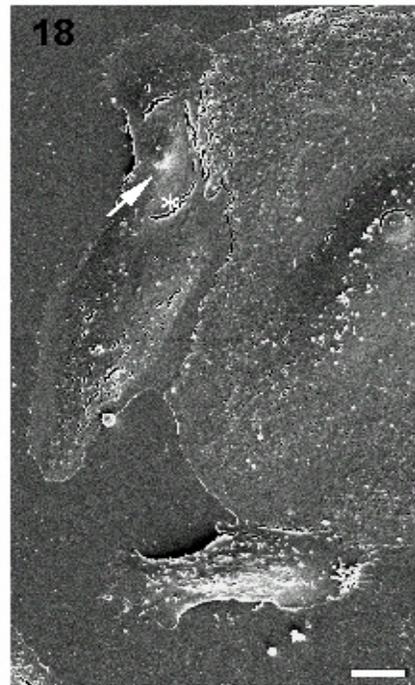
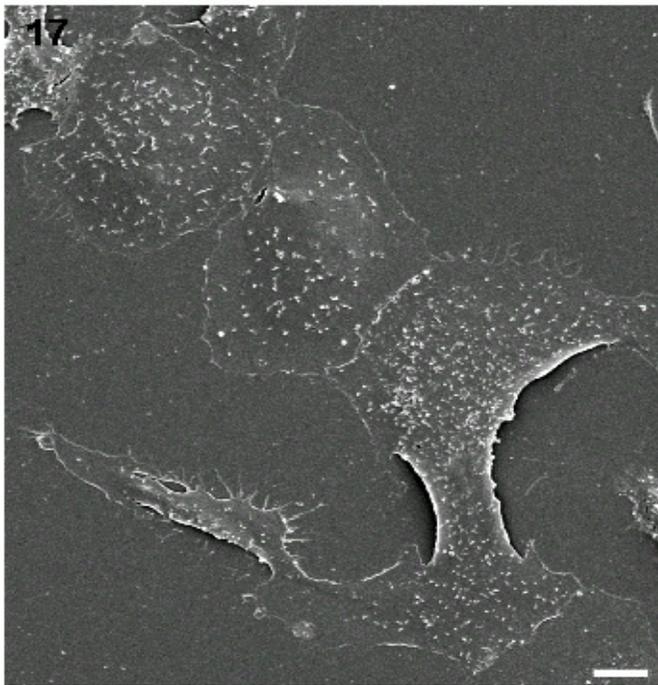
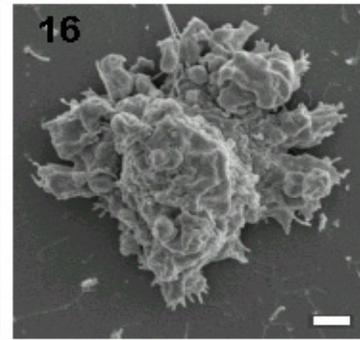
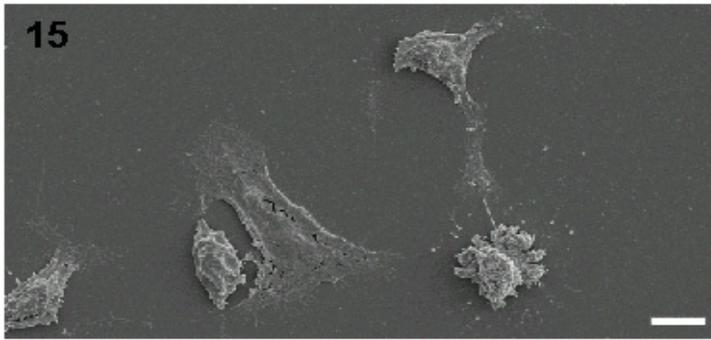
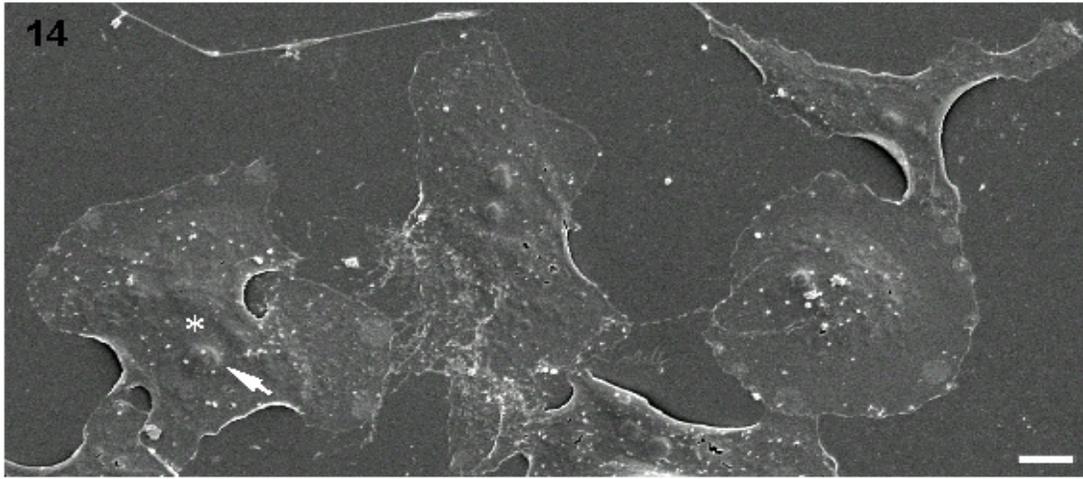
Figuras 1 a 9. Fotomicrografias de contraste de fase de células Vero não-tratadas (controle), de células após o tratamento com várias concentrações de TAM e células morfológicamente transformadas pelo TAM. As células tratadas com TAM, se comparadas ao controle, apresentaram redução no número e no tamanho, alterações morfológicas como arredondamento (*), forma estrelada (*cabeças de setas*) e vacúolos (*setas*). **Figura 1.** Células Vero controle em monocamada confluenta. **Figura 2.** Células tratadas com 10 μ M de TAM /24 horas. **Figura 3.** Células tratadas com 20 μ M de TAM /24 horas. **Figura 4.** Células tratadas com 20 μ M TAM /48 horas. **Figura 5.** Células tratadas com 20 μ M de TAM /72 horas. **Figura 6.** Células tratadas com 30 μ M de TAM /24 horas. **Figura 7.** Células transformadas pelo tratamento com 20 μ M de TAM /72 horas, após a confluência cresciam em múltiplas camadas. **Figuras 8, 9.** Células transformadas pelo tratamento com 30 μ M de TAM /24 horas, após a confluência cresciam em múltiplas camadas; estas células serão denominadas Vero T30. Barras de aumento: 10 μ m.



Figuras 10 a 13. Células Vero em monocamada não-confluyente, cultivadas por 48 horas e coradas com azul de toluidina a pH 4,0. **Figura 10.** Células Vero controle. **Figura 11.** Células Vero exposta ao TAM 30 μ M /24 horas mostraram diminuição de tamanho, citoplasma com vacúolos e núcleo fortemente corado. **Figura 12.** Detalhe de uma destas células, com vesículas na superfície que podem indicar apoptose. **Figura 13.** Células transformadas T30, que nessa circunstância não apresentaram diferenças das células controle. Nas figuras 10, 11 e 13 as barras de aumento representam 20 μ m e na figura 12, 10 μ m.

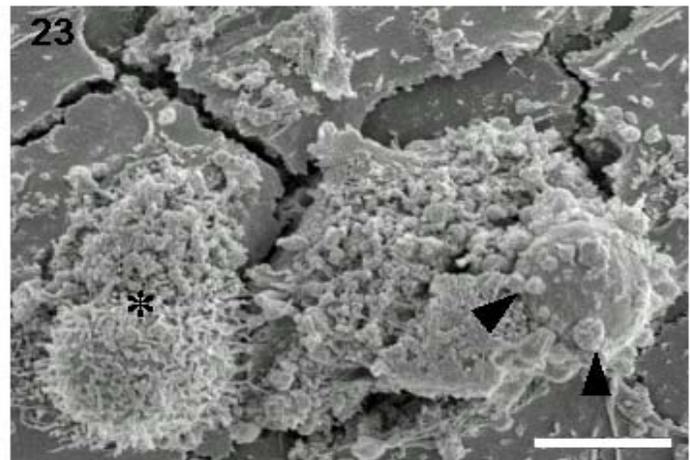
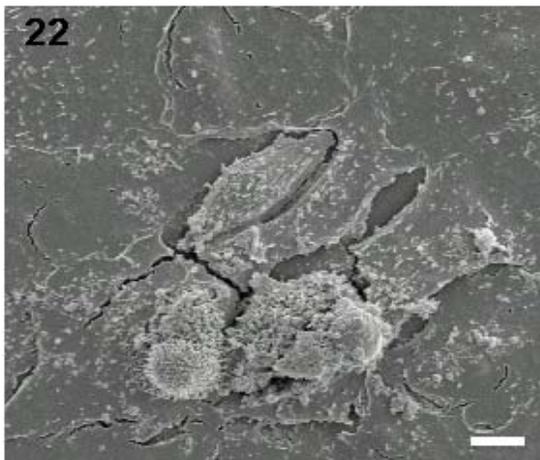
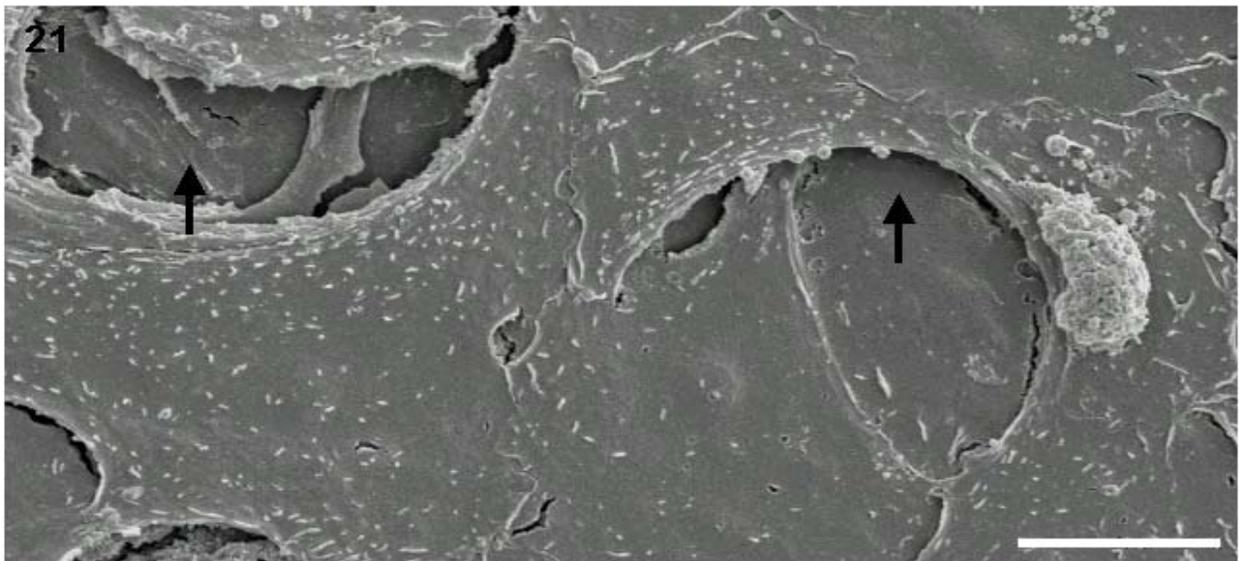
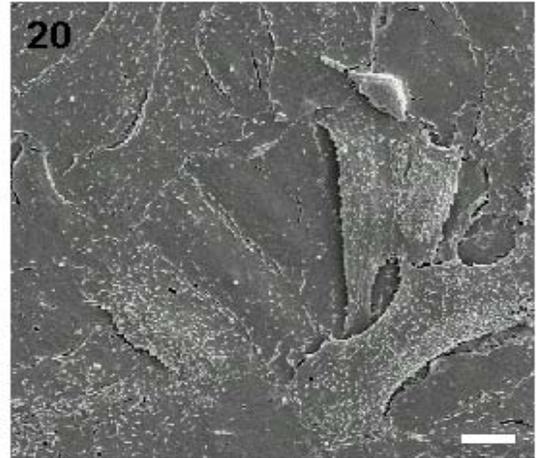
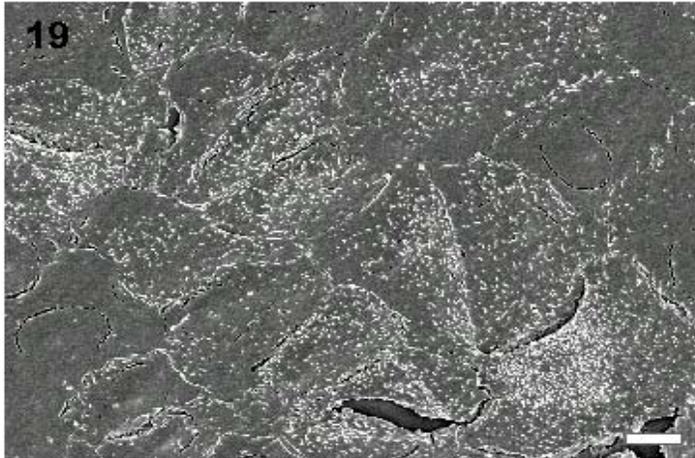


Figuras 14 a 18. Microscopia eletrônica de varredura de monocamadas não-confluentes de células Vero após 48 horas de cultura. **Figura 14.** Células Vero controle. **Figura 15.** Células Vero tratadas com TAM 30 μ M / 24 horas com volume diminuído. **Figura 16.** Detalhe da figura 15: bolhas na membrana podem indicar apoptose. **Figuras 17 e 18.** Células Vero T30. Células controle e T30 mostraram forma irregular, poucos microvilos sobre sua superfície, núcleo (*) e nucléolo evidente (*seta*) devido ao espalhamento. Nas figuras 14, 15, 17, 18, as barras de aumento: 10 μ m. Na figura 16, a barra denota 1 μ m.

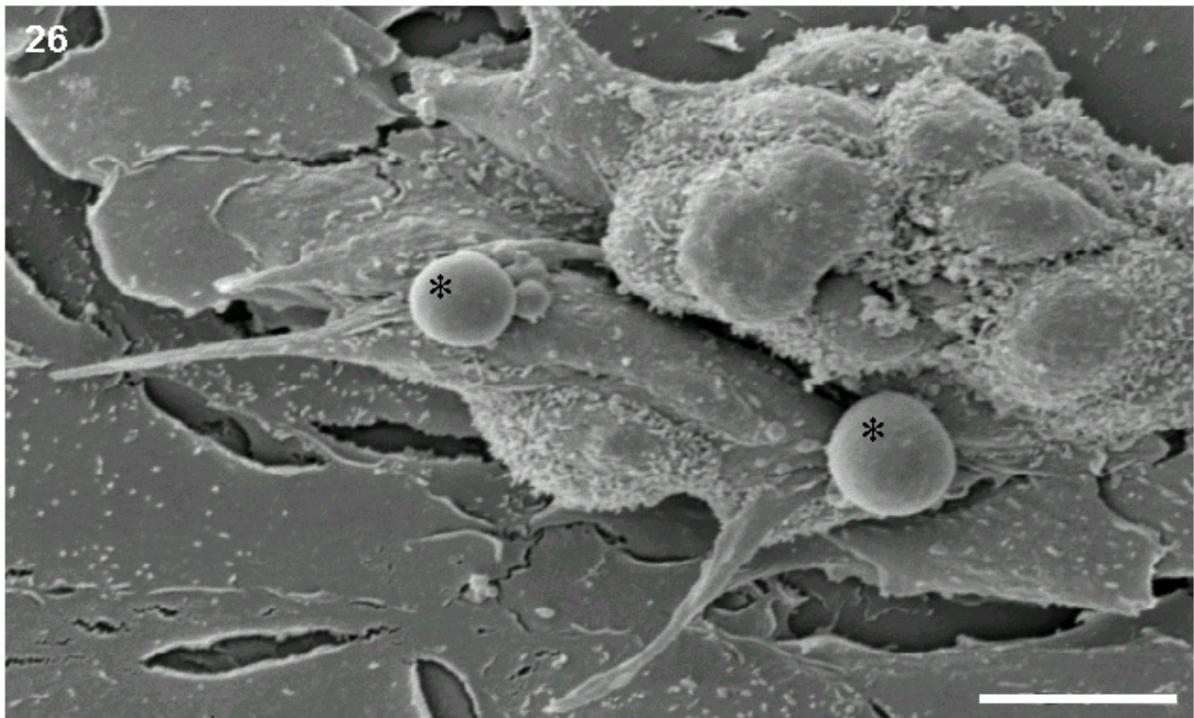
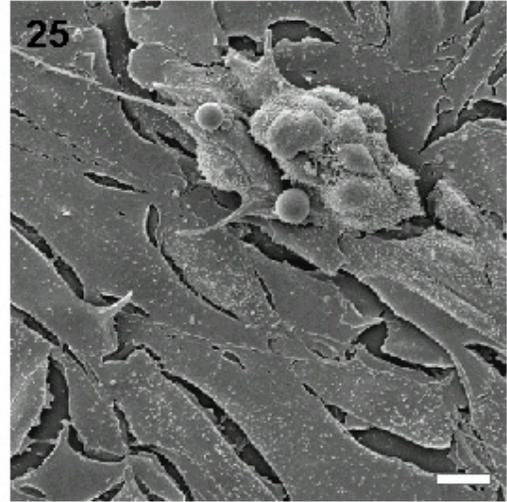
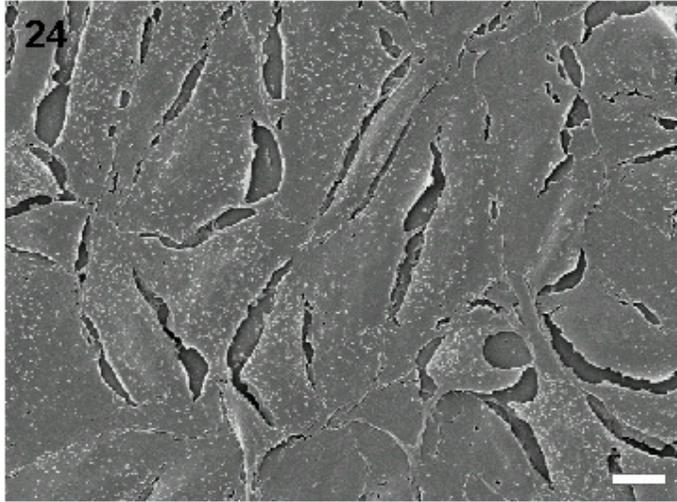


Figuras 19 a 23. Células Vero em confluência, após 14 dias de cultura.

Figura 19. As células Vero controle apresentaram muitos microvilos sobre sua superfície e cresciam em uma monocamada. **Figura 20.** Uma monocamada de células Vero T30 semelhante ao controle. **Figura 21.** No detalhe, células T30 sobrepõem-se (*seta*), iniciando múltiplas camadas celulares. **Figura 22.** Agregado celular em células T30. **Figura 23.** Detalhe da figura 22, mostrando células sobre o agregado com inúmeros microvilos (*); ao lado, células que podem estar em apoptose, com vesículas (*cabeças de setas*) sobre sua superfície. Barras de aumento: 10µm.



Figuras 24 a 26. Células Vero em camada confluyente, após 17 dias de cultura. **Figura 24.** Células Vero controle possuíam formato alongado, apresentavam microvilos em sua superfície e cresciam em monocamada. **Figura 25.** Em regiões de monocamada, células Vero T30 assemelhavam-se ao controle; neste estágio, o agregado é mais definido que em 14 dias. **Figura 26.** Detalhe da figura 25 que mostra células com muitos microvilos e células com superfície lisa (*)que podem estar mortas. Barras de aumento: 10 μ m.



CAPÍTULO 3

PERFIL DE CÉLULAS VERO APÓS TRATAMENTO COM O ANTINEOPLÁSICO TAMOXIFENO: CITOTOXICIDADE E TRANSFORMAÇÃO.

Grazieli N.F. Barbieri e Selma C. Genari *

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, Campinas, SP, Brasil. - CEP 13.084-971

***Correspondências endereçadas a:** Selma C. Genari. Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Caixa Postal 6109, Campinas, SP, Brasil, CEP 13.084-971. Tel.: ++55-19-3788-6108; fax: ++55-19-3788-6111. E-mail: sgenari@nutricell.com.br

Palavras-chave: Células Vero; Tamoxifeno; Citotoxicidade; Transformação celular; Fibronectina; Apoptose.

Resumo

O anti-estrógeno tamoxifeno (TAM) é amplamente utilizado para o tratamento do câncer de mama. Contudo, é possível que o TAM aumente o risco de câncer endometrial. Neste trabalho, a ação citotóxica do TAM e seu potencial de carcinogenicidade *in vitro* são investigados. O TAM foi citotóxico de uma forma concentração-dependente. Para os estudos subseqüentes, foram utilizadas células Vero tratadas com 30 μ M de TAM/24 horas e uma linhagem celular transformada que foi obtida através desse tratamento, denominada Vero T30. As células tratadas com 30 μ M de TAM/24 horas apresentaram morfologia apoptótica, confirmada pelo teste anexina-V. Células Vero T30 sub-confluentes não apresentaram diferenças morfológicas do controle; culturas confluentes do controle e de T30 mostraram semelhanças na deposição da fibronectina. Entretanto, a taxa apoptótica de Vero T30 era o dobro daquela do controle. Esse resultado associado com o crescimento em múltiplas camadas e à formação de agregados celulares de T30 podem indicar uma população celular distinta das células Vero normais (controle).

1. Introdução

O antineoplásico tamoxifeno (TAM) é um antiestrogênio parcial amplamente utilizado no tratamento do câncer de mama estrógeno-responsivo, sendo responsável por até 47% da redução de tumores contralaterais em mulheres previamente diagnosticadas para essa neoplasia (EBCTCG, 1998). Em mulheres com câncer de mama e portadoras de mutação nos genes BRCA1 ou BRCA2 essa redução pode chegar a 75% (Narod et al., 2000). Vários testes clínicos têm sido realizados para avaliar a ação preventiva do TAM (Fisher et al., 1998; Powles et al 1998; Veronesi et al, 1998) e uma análise global destes testes feita por Cuzick et al. (2003) demonstrou que a incidência de câncer de mama em mulheres que apresentam elevado risco para desenvolvimento dessa doença pode diminuir em até 38%. Apesar dessas ações benéficas, o uso de TAM tem sido associado a um aumento na incidência de câncer endometrial (Bernstein et al., 1999; Bergman et al, 2000).

Os efeitos diferenciados que o TAM possui nos vários tecidos podem estar relacionados à sua interação ligante-receptor com o receptor de estrogênio (ER) e sua consequente expressão diferencial ou mesmo a caminhos independentes de ER.

A regressão tumoral induzida pelo TAM *in vivo* parece envolver tanto um efeito antiproliferativo como uma ação apoptótica (Keen et al., 1997; Cameron et al., 2000) que poderiam estar relacionados ao seu mecanismo antiestrogênico mediado pelo receptor de estrogênio α (ER- α). *In vitro*, o TAM é citotóxico em células tumorais e não tumorais (Tsutsui et al., 1997; Jan et al., 2000; Majumdar et al., 2001) desencadeando morte celular programada por apoptose em células ER- α positivas e negativas, como células de linhagens de câncer de mama MCF-7, MDA MB 231 e BT-20, células HeLa e linhagens de epitélio mamário normal (Mandlekar et al., 2000; Dietze et al., 2001; Salami & Karami-Tehrani, 2003). Portanto, o TAM pode induzir morte celular programada *in vitro* via ER ou independentemente do ER (Obrero et al., 2002; Salami & Karami-Tehrani, 2003).

Em cultura de células embrionárias de hamster sírio o TAM causa transformação fenotípica (Metzler & Schiffmann, 1991; Tsutsui et al., 1997) concentração-dependente que possivelmente está relacionada à indução de aneuploidias. Já em fibroblastos iniciados por

uma mutação no gene c-Src, o TAM parece atuar como promotor tumoral (Zhong et al., 2001). Em ratos adultos, o TAM causa câncer hepático (Greaves et al., 1993) através de mecanismo genotóxico, com a formação de aductos de DNA (Han & Liehr, 1992; Gamboa da Costa et al., 2001), porém esse mecanismo parece não ser o responsável pela indução de câncer uterino em ratos neonatos (Carthew et al., 2000).

Tendo em vista as várias ações do TAM faz-se necessária a sua investigação em diferentes sistemas biológicos. As células da linhagem Vero, originadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), possuem características morfológicas e de crescimento que a tornam apropriada para estudo de citotoxicidade e transformação morfológica (ISO 10993-5, 1992; Genari & Wada, 1995; Genari et al., 1996; 1998). No presente estudo são apresentados os efeitos do TAM sobre as células Vero, como sua toxicidade em células normais e a indução da formação de uma nova população celular com características comportamentais diferentes das células parentais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura Celular e Reagentes

As células Vero foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil. Meio de cultura e soro fetal bovino eram da Nutricell, Campinas, SP, Brasil. Reagentes e anticorpos foram adquiridos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; o kit para detecção de apoptose Annexin-V-biotin é da Calbiochem. Em condições de controle as células Vero eram mantidas em meio Ham F10 suplementado com 5% de soro fetal bovino, a 37°C, em sistema fechado de cultura. O TAM foi dissolvido em dimetilsulfóxido a 100µM (solução estoque). A solução era diluída em meio de cultura completo até as concentrações desejadas para os diversos testes. Foram feitos controles utilizando somente dimetilsulfóxido. Uma linhagem transformada, aqui denominada Vero T30, foi obtida após exposição de células Vero normais a 30µM de TAM por 24 horas; as células remanescentes desse procedimento foram mantidas em condições normais de cultura. Essa linhagem (T30) cresce formando múltiplas camadas ou grumos celulares, indicando perda de inibição do crescimento por contato.

2.2. Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do TAM foi efetuada através do teste de viabilidade celular pelo ensaio com cristal violeta (Murakami et al., 1998), um corante básico que se liga a DNA (Gillies et al., 1986). As células foram distribuídas em placas de 96 cavidades a $1,5 \times 10^4$ células/poço e incubadas por 24h para então a adição de TAM nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 μM . O controle consistiu em células não tratadas. O período de exposição à droga foi de 24 e 48 horas, sendo os meios trocados por meio com a droga a cada 24 horas. Após, as amostras foram fixadas em formol a 10%, lavadas em PBS para a adição de cristal violeta a 0,05% (em metanol a 20%). Decorridos 10 minutos, lavou-se o material com PBS e adicionou-se citrato de sódio 0,1M para a eluição do corante. A análise das amostras foi realizada por método espectrofotométrico, com leitura a 540nm para a obtenção das células viáveis presentes. As amostras foram feitas em 8 réplicas, em 3 experimentos independentes.

2.3. Microscopia de Luz

Em placas de 6 poços (Corning) foram cultivadas, à densidade inicial 2×10^5 células/poço, células Vero controle, células Vero T30 e células Vero que seriam submetidas a tratamento com TAM a $30\mu\text{M}$ por 24 horas antes do processamento. Ao fim de 48 horas de cultura, aos quais as amostras estavam semiconfluentes, foram fixadas em metanol/ácido acético (3:1 v/v), lavadas em metanol e coradas com cresil violeta 0,25% para observação de caracteres morfológicos. Para citoquímica, utilizou-se o corante xylydine ponceau a pH 2,5 para evidenciar proteínas. Neste pH as proteínas apresentam grupos NH_3^+ aos quais o corante se liga (Haas et al., 2001). As amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,4, lavadas e coradas com xylydine ponceau a pH 2,5. Foram realizados 2 experimentos separados, em triplicatas.

2.4. Detecção de apoptose

O kit Annexin V-biotin foi usado conforme recomendações do fabricante. Células Vero controle, Vero T30 e células que foram expostas a $30\mu\text{M}$ de TAM por 3 horas antes

do processamento foram inoculadas à densidade de $7,5 \times 10^5$ células em frascos de 25cm^2 e mantidas por 48 horas. As células foram tripsinizadas e seu número ajustado para 5×10^5 células em 0,5 mL ao qual adicionou-se “*media binding reagent*” e em seguida “*annexin V-biotin*”. Após incubação por 15 minutos, as amostras eram centrifugadas e o pellet ressuspensionado com “*binding buffer*”. Células em apoptose foram visualizadas pela incubação com anticorpo anti-biotina conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) e aquelas em necrose e apoptose tardia eram vistas pela incubação com iodeto de propídio. As contagens foram feitas em microscópio de fluorescência invertido Olympus IX50. Foram contadas 300 células; as amostras representam 3 contagens, sendo realizados 2 experimentos independentes.

2.5. Imunocitoquímica para fibronectina

A fibronectina, uma glicoproteína de superfície celular aparece frequentemente (mas não obrigatoriamente) alterada em células transformadas (Kahn & Shin, 1979). O padrão de deposição de fibronectina em células Vero controle e células transformadas Vero T30 foi investigado. As células, a uma densidade inicial de $1,6 \times 10^5$ células/mL, foram cultivadas por 3 dias sobre lamínulas e depois fixadas em glutaraldeído a 0.25% / formaldeído a 4% em tampão Pipes a 80mM – pH 6.8, com MgCl_2 a 1mM, EGTA a 5mM e Triton X-100 a 0,2%. Boroidreto de sódio a 100mM e albumina sérica bovina (BSA) a 3% foram usados para bloquear sítios inespecíficos. Após incubação por uma noite com anticorpo anti-fibronectina celular, a visualização foi feita usando IgG anti-mouse conjugada a FITC. Este teste foi reproduzido em um total de 3 vezes.

2.6. Análises Estatísticas

Todos os resultados numéricos foram expressos como a média \pm desvio padrão (ME \pm DP). As comparações entre todos os grupos foram realizadas através de uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para múltiplas comparações e para detectar diferenças entre as médias dos grupos individuais. O nível de significância foi estabelecido a $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Citotoxicidade

Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade para o TAM em células Vero estão apresentados na figura 1, onde observa-se que as concentrações foram gradualmente citotóxicas após 24 e 48 horas de tratamento, exceto a concentração de 5 μ M, que estimulou a proliferação celular em 24 horas e foi citotóxica em 48 horas. Observa-se também um efeito cumulativo do TAM, desde que após as primeiras 24 horas o meio com a droga era renovado.

3.2. Microscopia de Luz e Citoquímica

Sob coloração com cresil violeta pode-se observar que as células Vero controle possuem forma irregular, núcleo grande e fortemente corado, com nucléolos evidentes e em número variável e citoplasma finamente granular (figura 2A). As células T30 morfologicamente não se mostraram diferentes dos controles (figura 2D), porém as células processadas logo após o tratamento com TAM a 30 μ M apresentaram volume celular reduzido, morfologia mais arredondada (figura 2B e 2C) e vacuolização citoplasmática (dado não mostrado), o que foi observado também com xylidine ponceau. Células com morfologia indicativa de apoptose, liberando vesículas com material intracelular envolvidas pela membrana plasmática também eram freqüentes entre as amostras recém tratadas com TAM (figura 2C). Os dados obtidos com xylidine ponceau foram iguais aos obtidos com cresil violeta e por isso foram omitidos.

3.3. Detecção de apoptose

Utilizou-se o kit Annexin V-biotin para detectar presença ou ausência de apoptose em células Vero controle, células transformadas (T30) e em células após 3 horas de tratamento com TAM a 30 μ M. Após 2 dias de cultura as células tratadas por 3 horas com TAM evidenciaram elevada taxa de apoptose (em torno de 84%) assim como as células T30 (40%) em relação ao controle não tratado (aproximadamente 22%) (figura 3). Todas as células marcadas com iodeto de propídio também evidenciaram marcação com anexina-V,

o que indica apoptose tardia ou necrose. Não houve diferenças significativas entre número de células controle em necrose ou apoptose tardia em relação aos outros dois grupos.

3.4. Imunocitoquímica para fibronectina

O desenvolvimento da matriz de fibronectina mostrou-se proporcional à densidade celular tanto no controle (figura 4A) como em Vero T30 (figura 4B). Observam-se regiões de distribuição difusa da fibronectina e também uma vasta rede fibrilar intercelular. Aparentemente, não houve diferenças significativas na deposição de fibronectina entre controle e Vero T30.

4. Discussão

O antineoplásico TAM é uma droga de ações bastante variadas que vão desde o controle à regressão do câncer de mama e até possivelmente a indução câncer uterino. Estas ações estão sendo investigadas em vários modelos de estudo, *in vivo* e *in vitro*. Portanto, este trabalho visa analisar as ações do TAM sobre as células Vero.

O teste para a citotoxicidade do TAM mostrou que as células Vero são sensíveis a essa droga proporcionalmente à sua concentração. Porém, observando-se ainda os dados do gráfico 1 nota-se relevante proliferação celular na concentração de 5 μ M. De acordo com Zhong et al. (2001), aumento na síntese de DNA foi observado em fibroblastos de roedores, da linhagem 3Y1, que possuíam uma mutação, quando expostos a 5 μ M de TAM. Nessas condições específicas o autor sugeriu a atuação do TAM como promotor tumoral, estimulando a proliferação de células com algum distúrbio que as tornam predispostas a um comportamento semelhante ao de células neoplásicas.

Quando comparadas ao controle, severas alterações morfológicas também foram verificadas nas células Vero expostas a 30 μ M de TAM, como vacuolização citoplasmática, diminuição do volume celular e forma celular mais arredondada, além de células cuja morfologia com surgimento de grandes vesículas superficiais repletas de material celular podem representar corpos apoptóticos, reforçando a idéia de apoptose (Majumdar et al., 2001).

A apoptose é um processo morte celular programada que envolve a iniciação por um agente farmacológico ou danificador de DNA, ativação de enzimas proteolíticas e execução de alteração das características bioquímicas e morfológicas na célula (Dietze et al., 2001; Majumdar et al., 2001). Dependendo do fator desencadeante e do tipo celular, existem múltiplos caminhos de sinalização que levam à ativação da maquinaria apoptótica. Um evento considerado inicial na apoptose é a perda da assimetria dos fosfolipídeos da membrana plasmática levando à externalização da fosfatidilserina. O anticoagulante anexina V atua como anti-fosfolipase e liga-se preferencialmente à fosfatidilserina negativamente carregada (Salami & Karami-Tehrani, 2003). Para detecção do perfil apoptótico em células Vero controle, Vero T30 e recém-tratadas com TAM utilizou-se *annexin V-biotin* como método de estudo. Aliada à observação dos caracteres morfológicos em microscopia de luz e avaliação de citotoxicidade, pode-se constatar que o TAM a 30 μ M induz apoptose em células Vero. Sabe-se que a apoptose causada pelo TAM pode ser desencadeada por diversos mecanismos. Visto a concentração empregada ser elevada, postula-se que o TAM esteja causando apoptose por caminhos independentes de receptor de estrógeno. Existem trabalhos que relatam que nesta mesma concentração ou até inferiores, o TAM provoca aumento da concentração intracelular de íon cálcio em células tumorais e não tumorais e a citotoxicidade do TAM pode estar vinculada a esta ação (Kim et al., 1999; Jan et al., 2000; Zhang et al., 2000). Jan e colaboradores (2000) observaram que o TAM além de elevar o influxo de cálcio extracelular também provoca a liberação dos estoques intracelulares do íon em células renais MDCK (Madin Darby canine kidney). Elevações na concentração de cálcio citoplasmático por períodos prolongados podem causar apoptose (Clapham, 1995) pela ativação de várias enzimas envolvidas em tal processo como proteínas quinases e fosfatases, proteases neutras, transglutaminase dependentes de Ca^{2+} e endonuclease dependente de Ca^{2+}/Mg^{2+} (Kim et al., 1999). É possível que o TAM tenha induzido apoptose em células Vero via aumento do influxo de cálcio e, portanto, através do aumento da sinalização desencadeada por esse cátion.

As células Vero que resistiram ao tratamento com 30 μ M de TAM mantidas em condições normais de cultura proliferaram e após atingirem confluência começaram a

sobreporem-se, formando grumos celulares e esse comportamento manteve-se ao longo dos sucessivos repiques (Barbieri & Genari, a ser submetido para publicação). Esse crescimento em múltiplas camadas indica perda de inibição por contato (Abercrombie, 1979; Genari et al., 1995; Genari & Wada, 1996; 1998) e relaciona-se ao processo de transformação celular *in vitro*. Analisou-se essa população quanto à sua morfologia em situação de semi-confluência, também quanto ao seu perfil apoptótico e distribuição de fibronectina em relação às células Vero controle. Tanto células T30 como controle, quando coradas com cresil violeta ou xylidine ponceau, possuíam morfologia irregular, citoplasma finamente granular, núcleo grande e fortemente corado, com um ou mais nucléolos e coloração semelhantes. Contudo, linhagens celulares transformadas podem apresentar um comportamento semelhante ao tumoral (crescimento em múltiplas camadas) quando em alta densidade celular e nenhuma evidência de alterações fenotípicas visuais quando pouco confluentes (Naora et al., 1998), o que poderia indicar que modificações na morfologia celular poderiam estar sendo desencadeadas pelo contato célula-célula, ou seja, pela alta densidade celular em células pré-dispostas em razão de alguma alteração genética ou epigenética.

As fibronectinas são glicoproteínas presentes na matriz extracelular e no plasma sanguíneo cuja principal função é promover a adesão celular a materiais extracelulares ou a substrato sólido (Genari et al., 1998). Devido à sua função, essas proteínas têm sua distribuição freqüentemente alterada em populações celulares transformadas e células tumorais, sendo sua diminuição relacionada ao crescimento tumoral e metastático (Chen & Chen, 1987; Steele et al., 1988). Contudo, células epiteliais e fibroblastos transformados podem exibir expressão e secreção de fibronectina igual ou maior que as células parentais não-transformadas (Khan & Shin, 1979; Bannikov et al., 1982; Lyubimov, 1982). Células Vero controle e T30 em alta densidade celular aparentemente possuem o mesmo padrão de distribuição de fibronectina, o que possivelmente indica que essa proteína não apresenta uma relação direta com o comportamento alterado das células transformadas T30.

Ainda buscando caracterizar as populações celulares, observou-se que o perfil apoptótico de células controle e transformadas mostrou-se diferente, sendo a taxa de morte

em Vero T30 duas vezes maior que o controle. Hansson e colegas (2003), caracterizando cultura primária de queratinócitos bucais e queratinócitos bucais imortalizados relataram índice apoptótico como também taxa proliferativa das células imortalizadas até 4 vezes maior que da cultura primária, mesmo na presença de soro no meio de cultura. As alterações na taxa de apoptose em condições normais de cultura de células T30 em relação ao controle podem indicar que tratam-se, realmente, de duas populações celulares distintas.

Em conclusão, o TAM pode ter efeito citotóxico relacionado a apoptose e ação estimulante sobre proliferação de células Vero, de maneira concentração-dependente. Essa toxicidade pode estar vinculada a alteração comportamental das células, como o crescimento em múltiplas camadas e aumento da taxa de apoptose espontânea. A aparente ausência de alterações morfológicas em T30 quando o tapete celular é semi-confluyente ou a semelhança dos padrões de deposição de fibronectina podem ser um estímulo para futuras investigações, mais detalhadas e com técnicas de biologia molecular, dessa linhagem celular transformada pela ação do TAM.

Agradecimentos: Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da CAPES.

Referências

ABERCROMBIE M, 1979. Contact inhibition and malignancy. *Nature* **281**: 259-262.

BANNIKOV GA, GUELSTEIN VI, TINT IS, TOMATIS L, TROYANOSVSKY SM, VASILIEV JM, 1982. Cell shape and organization of cytoskeleton and surface fibronectin in non-tumorigenic rat liver cultures. *J Cell Sci* **54**: 47-67.

BARBIERI, GNF, GENARI, SC. Aspectos morfológicos (microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura) de células Vero expostas ao antineoplásico Tamoxifeno. *Tissue Cell*, a ser submetido para publicação.

- BERGMAN L, BEELEN MLR, GALLEE MPW, HOLLEMA H, BENRAADT J, VAN LEEUWEN FE, 2000. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *Lancet* **356**: 881-887.
- BERNSTEIN L, DEAPEN D, CERHAN JR, SCHWARTZ SM, LIFF J, MCGANN-MALONEY E, PERLMAN JA, FORD L, 1999. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst* **91**: 1654-1662.
- CAMERON DA, KEEN JC, DIXON JM, BELLAMY C, HANBY A, ANDERSON TJ, MILLER WR, 2000. Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and pro-apoptotic changes. *Eur J Cancer* **36**: 845-851.
- CARTHEW P, EDWARDS RE, NOLAN BM, MARTIN EA, HEYDON RT, WHITE INH, TUCKER MJ, 2000. Tamoxifen induces endometrial and vaginal cancer in rats in the absence of endometrial hyperplasia. *Carcinogenesis* **21**: 793-797.
- CHEN JM, CHEN WT, 1987. Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cells. *Cell* **48**: 193-203.
- CLAPHAM DE, 1995. Calcium signaling. *Cell* **80**:259-268.
- CUZICK J, POWLES T, VERONESI U, FORBES J, EDWARDS R, ASHLEY S, BOYLE P, 2003. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* **361**: 296-300.
- DIETZE EC, CALDWELL LE, GRUPIN SL, MANCINI M, SEEWALDT VL, 2001. Tamoxifen but not 4-hydroxytamoxifen initiates apoptosis in p-53(-) normal human mammary epithelial cells by inducing mitochondrial depolarization. *J Biol Chem* **276**: 5384-5394.
- EBCTCG, 1998. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* **351**: 1451-1467
- FISHER B, COSTANTINO JP, WICKERHAM DL, REDMOND CK, KAVANAH M, CRONIN WM, VOGEL V, ROBIDOUX A, DIMITROV N, ATKINS J, DALY M, WIEAND S, TAN-CHIU E,

- FORD L, WOLMARK N, 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* **90**: 1371-1388.
- GAMBOA DA COSTA G, MCDANIEL-HAMILTON LP, HEFLICH RH, MARQUES MM, BELAND FA, 2001. DNA adduct formation and mutant induction in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. *Carcinogenesis* **22**: 1307-1315.
- GENARI SC, WADA MLF, 1995. Behavioural differences and cytogenetical analysis of a transformed cellular population derived from a Vero cell line. *Cytobios* **81**: 17-25.
- GENARI SC, DOLDER MAD, WADA MLF, 1996. Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *J Submicrosc Cytol Pathol* **28**: 565-572.
- GENARI SC, GOMES L, WADA MLF, 1998. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell Biol Int* **22**: 285-294.
- GILLIES RJ, DIDIER N, DENTON M, 1986. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* **159**: 109-113.
- GREAVES P, GOONETILLEKE R, NUNN G, TOPHAM J, ORTON T, 1993. Two-years carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res* **53**: 3919-3924.
- HAAS VR, SANTOS AR JR, WADA ML, 2001. Behaviour of fibroblastic cells cultured in collagen I using the sandwich technique. *Cytobios* **106** Suppl 2:255-267.
- HAN X, LIEHR JG, 1992. Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res* **52**: 1360-1363.
- HANSSON A, BLOR BK, SARANG Z, HAIG Y, MORGAN PR, STARK HJ, FUSENIG NE, EKSTRAND J, GRAFSTROM RC, 2003. Analyses of proliferation, apoptosis and keratin

- expression in cultured normal and immortalized human buccal keratinocytes. *Eur J Oral Sci* **111**: 34-41.
- ISO 10993-5, 1992. Biological evaluation of medical devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods.
- JAN C-R, CHENG J-S, CHOU K-J, WANG S-P, LEE KC, TANG K-Y, TSENG L-L, CHIANG H-T, 2000. Dual effect of tamoxifen, an anti-breast-cancer drug, on intracellular Ca²⁺ and cytotoxicity in intact cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **168**: 58-63.
- KEEN JC, DIXON JM, MILLER EP, CAMERON DA, CHETTY U, HANBY A, BELLAMY C, MILLER WR, 1997. The expression of Ki-S1 an Bcl-2 and the response to primary tamoxifen therapy in elderly patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **44**: 123-133.
- KHAN P, SHIN S-I, 1979. Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of associations among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence and tumor-forming ability. *J Cell Biol* **82**: 1-16.
- KIM JA, KANG YS, JUNG MW, LEE SH, LEE YS, 1999. Involvement of Ca²⁺ influx in the mechanism of tamoxifen induced apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. *Cancer Lett* **147**: 115-123.
- LYUBIMOV AV, 1982. Surface markers of connective tissue cell transformation *in vitro*: fibronectin and pro-collagen. *Biol Cell* **45**: 148.
- MAJUMDAR SK, VALDELLON JA, BROWN KA, 2001. *In vitro* investigations on the toxicity and cell death induced by tamoxifen on two non-breast cancer cell types. *J Biomed Biotechnol* **1**: 99-107.
- MANDLEKAR S, YU R, TAN TH, KONG AN, 2000. Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase-1 signaling pathways in tamoxifen-induced apoptosis of human breast cancer cells. *Cancer Res* **72**: 12-19.

- METZLER M, SCHIFFMANN D, 1991. Structural requirements for the *in vitro* transformation of Syrian hamster embryo cells by stilbene estrogens and triphenylethylene-type antiestrogens. *Am J Clin Oncol* **14** (suppl 2): S30-5.
- MURAKAMI N, FUKUCHI S, TAKEUCHI K, HORI T, SHIBAMOTO S, ITO F, 1998. Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in human gastric carcinoma cells. *J Cell Physiol* **176**:127-137.
- NAORA H, TAKAI I, ADACHI M, NAORA H, 1998. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis. *J Cell Biol* **141**: 741-753.
- NAROD SA, BRUNET JS, GHADIRIAN P, ROBSON M, HEIMDAL K, NEUHAUSEN SL, STOPPA-LYONNET D, LERMAN C, PASINI B, DE LOS RIOS P, WEBER B, LYNCH H, 2000. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet* **356**: 1876-1881.
- POWLES T, EELES R, ASHLEY S, EASTON D, CHANG J, DOWSETT M, TIDY A, VIGGERS J, DAVEY J, 1998. Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomised chemoprevention trial. *Lancet* **352**: 98-101.
- SALAMI S, KARAMI-TEHRANI F, 2003. Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clin Biochem* **36**: 247-253.
- STEELE JG, SAVOLAINEN TA, SMITH GJ, 1988. Expression of fibronectin on clonally related transformed and control sublines from an epithelial cell strain and a tumor line of mouse alveolus. *Cancer Res* **48**: 4933-4940.
- TSUTSUI T, TAGUSHI S, TANAKA Y, BARRET JC, 1997. 17 beta-estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int J Cancer* **70**: 188-193.

- VERONESI U, MAISONNEUVE P, COSTA A, SACCHINI V, MALTONI C, ROBERTSON C, ROTMENSZ N, BOYLE P, 1998. Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomised women. *Lancet* **352**: 93-97.
- ZHANG W, COULDWELL WT, SONG H, TAKANO T, LIN JHC, NEDERGAARD M, 2000. Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **60**: 5395-5400.
- ZHONG M, LU Z, ABBAS T, HORNIA A, CHATAKONDU K, BARILE N, KAPLAN P, FOSTER DA, 2001. Novel tumor-promoting property of tamoxifen. *Cell Growth & Differ* **12**: 187-192.

Figura 1. Efeitos citotóxico e proliferativo do TAM sobre células da linhagem Vero. As células foram tratadas com TAM em concentrações crescentes e por períodos de 24 e 48 horas. Células controle correspondem a células não-tratadas nos mesmos períodos. Os dados mostrados ($ME \pm DP$; $n=8$) representam três experimentos independentes com resultados similares (* , significativamente diferente do valor controle, $P < 0,05$).

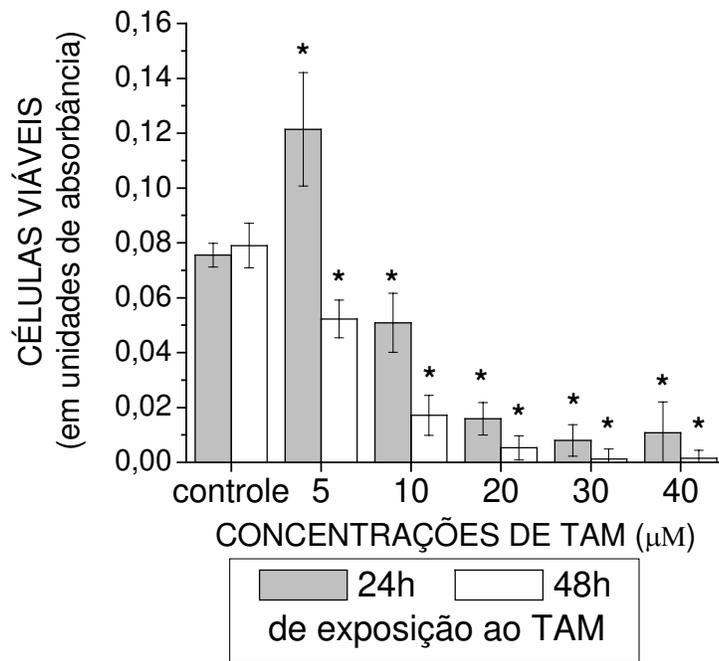


Figura 2. Microscopia de luz do controle (**A**), das células tratadas com 30 μ M TAM / 24h (**B** e **C** - detalhe) e células Vero T30 (**D**) coradas com cresil violeta a 0,25%. Após 48h de cultura e em estado de não confluência, as células tratadas com 30 μ M de TAM / 24h distinguem-se das células controle em número e morfologia. Células transformadas Vero T30 não apresentaram diferenças significativas das células Vero controle. Em **A**, **B** e **D** as barras representam 20 μ m. Em **C** a barra representa 10 μ m.

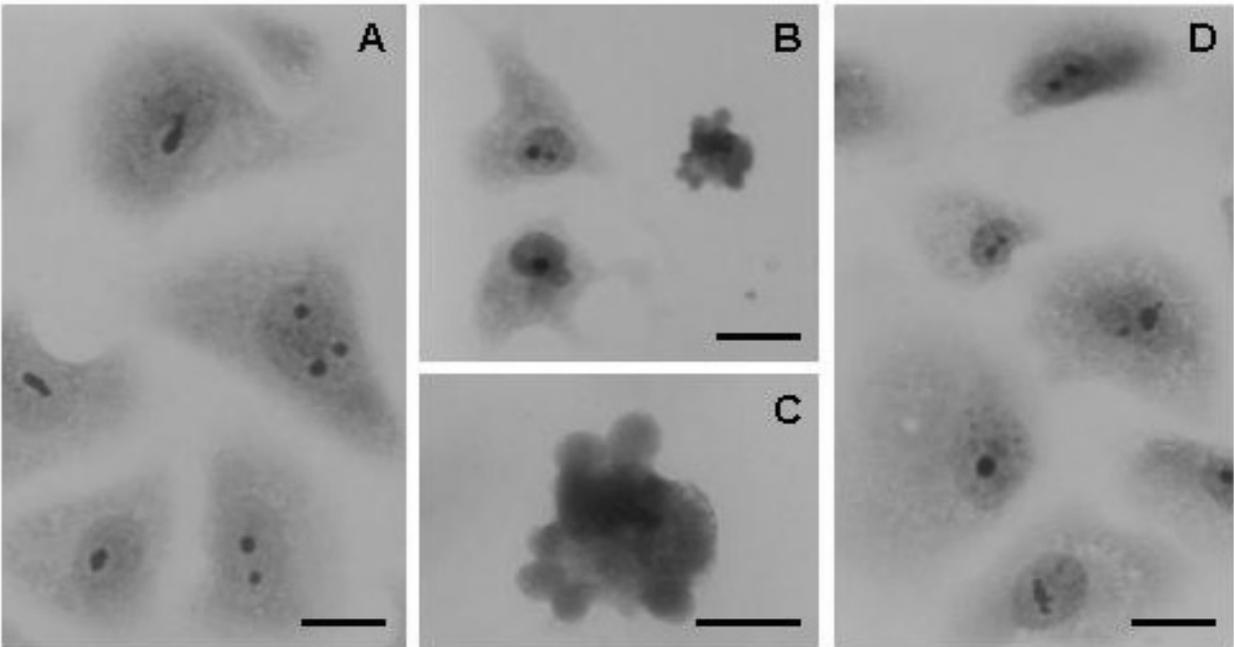


Figura 3. Níveis de apoptose e necrose/apoptose tardia (unidade: número de células) em: células controle, células Vero logo após tratamento com 30 μ M TAM e células T30. As taxas das células controle e células T30 correspondem a apoptose espontânea em cultura. As colunas são a ME \pm DP de $n = 3$ (*, significativamente diferente do valor controle, $P < 0,05$).

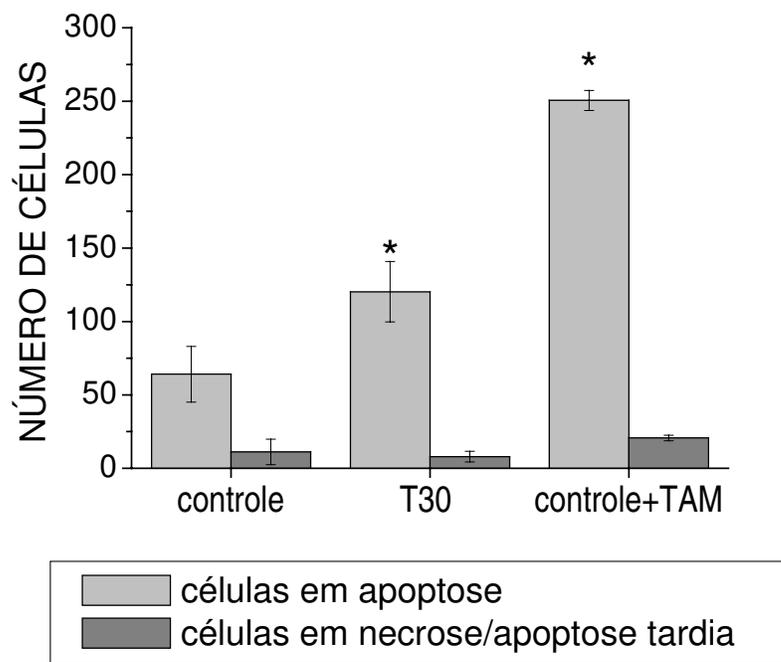
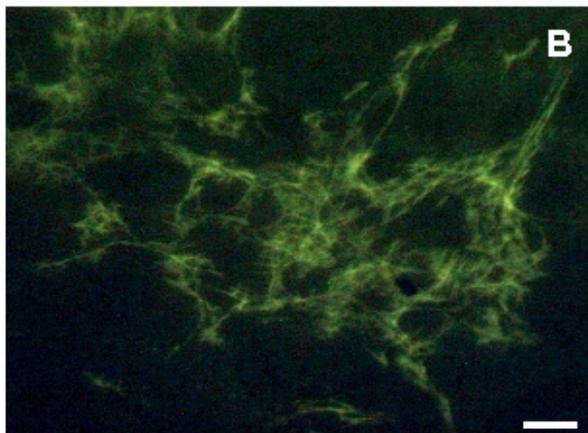
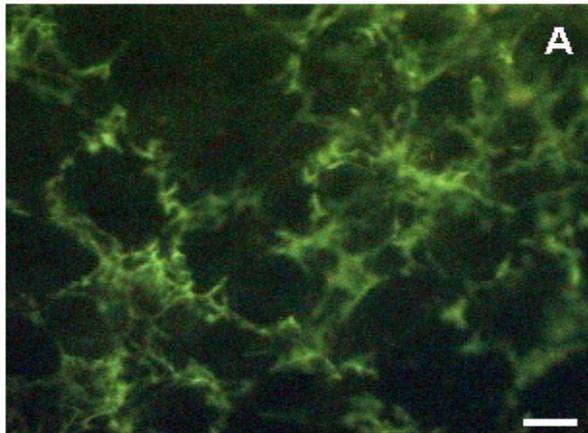


Figura 4. Distribuição da fibronectina após 3 dias de cultura, em monocamada confluyente de: **(A)** células Vero controle e **(B)** células Vero T30. As células mostraram regiões de distribuição difusa de fibronectina na superfície celular e uma rede fibrilar nos contatos entre células adjacentes. Aparentemente, o controle e T30 depositaram quantidades similares de fibronectina. Barra de aumento: 20 μ m.



CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS

Levando-se em conta os diversos efeitos do tamoxifeno sobre as células da linhagem Vero segundo as condições experimentais empregadas, pode-se concluir que:

- ✓ as células Vero, expostas a concentrações a partir de 30 μ M e às outras concentrações mais citotóxicas de tamoxifeno passaram a apresentar características fenotípicas e comportamentais semelhantes a células tumorais, com crescimento em múltiplas camadas e perda de inibição por contato. As células controle apresentam inibição do crescimento por contato, crescendo em monocamada;
- ✓ o tamoxifeno causou aumento da proliferação das células Vero como resposta imediata ao tratamento com 5 μ M de tamoxifeno por 24 horas, porém apresentou efeito citotóxico sobre as células Vero a partir da concentração de 10 μ M;
- ✓ através dos testes citoquímicos foi possível observar logo após o tratamento com o tamoxifeno a presença de células com alterações morfológicas como grandes vesículas citoplasmáticas, possivelmente associadas a apoptose; contudo, a população transformada Vero T30 não apresentou diferenças significativas em relação às células controle;
- ✓ o padrão de distribuição de fibronectina de células normais e transformadas é semelhante, o que pode indicar que essa proteína não está diretamente relacionada à alteração comportamental apresentada pelas células Vero T30;
- ✓ o tamoxifeno na concentração de 30 μ M induziu morte celular por apoptose nas células Vero;

- ✓ as diferenças entre as taxas de apoptose de células T30 e controle, em condições normais de cultura, podem ser mais um indicativo de distinção entre as duas populações celulares.

Assim, podemos concluir de forma geral que o tamoxifeno apresentou efeito citotóxico e indutor de apoptose nas células Vero, além de causar alterações morfológicas e comportamentais irreversíveis, caracterizando sua capacidade de promover transformação nestas células.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, M.** (1979) Contact inhibition and malignancy. *Nature*, **281**: 259-262.
- Aiub, C.A., Pinto, L.F. and Felzenszwalb, I.** (2003) N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol. Lett.*, **145**: 36-45.
- Aladjem, M.I. and Lavi, S.** (1992) The mechanism of carcinogen-induced DNA amplification: *in vivo* and *in vitro* studies. *Mutat Res.* **276**: 339-44.
- 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**: 347-357.
- Barsalou, A., Gao, W., Anghel, S.I., et al.** (1998) Estrogen response elements can mediate agonist activity of anti-estrogens in human endometrial Ishikawa cells. *J Biol Chem*, **273**: 17138-17146.
- Bartsch, H., Phillips, D.H., Nair, J., et al** (2000) Lack of evidence for tamoxifen- and toremifene-DNA adducts in lymphocytes of treated patients. *Carcinogenesis*, **21**: 845-847.
- Behrens, J., Mareel, M.M., Van Roy, F.M. and Birchmeier, W.** (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, **108**: 2435-2447.
- Ben-Ze'Ev, A.** (1985) The cytoskeleton in cancer cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **780**: 197-212.
- Ben-Ze'Ev, A.** (1987) The role of changes in cell shape and contacts in the regulation of cytoskeleton expression during differentiation. *J. Cell Sci. Suppl.*, **8**: 293-312
- Bergman, L., Beelen, M.L.R., Gallee, M.P.W., et al.** (2000). Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *Lancet*, **356**: 881-887.

- Bernstein, L., Deapen, D., Cerhan, J.R., et al.** (1999) Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **91**: 1654-1662.
- Bertram, J.S.** (2001) The molecular biology of cancer. *Mol. Asp. Med.*, **21**: 167-223.
- Bianchi, N.O. and Ayres, J.** (1971). Heterocromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Exp. Cell Res.*, **68**: 253-258.
- Biedler, J.L.** (1976) Chromosome abnormalities in human tumor cells in culture. *In*: Fogh, J. (ed.): "Human tumor cells *in vitro*". New York, Academic Press.
- Birchmeier, W., Weidner, K.M. and Behrens, J.** (1993) Molecular mechanisms leading to loss of differentiation and gain of invasiveness in epithelial cells. *J. Cell Sci. Suppl.*, **17**: 159-164.
- Bhimani, R., Troll, W., Grumberger, D. and Frenkel, K.** (1993) Inhibition of oxidative stress in HeLa cell by chemopreventive agents. *Cancer Res.*, **53**: 4528-4533.
- Bishop, J.M.** (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**: 235-248.
- Bursch, W., Ellinger, A., Kienzl, H., et al.** (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*, **17**:1595-607.
- Bursch, W., Hohegger, K., Torok, L., et al.** (2000) Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci.* **113**: 1189-1198.
- Buters, J.T., Mahadevan, B., Quintanilla-Martinez, L., et al.** (2002) Cytochrome P450 1B1 determines susceptibility to dibenzo[a,l]pyrene-induced tumor formation. *Chem. Res. Toxicol.*, **15**: 1127-35.
- Button, E., Shapland, C. and Lawson, D.** (1995) Actin, its associated proteins and metastasis. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **30**: 247-251.

- Cameron, D.A., Keen, J.C., Dixon, J.M., et al.** (2000) Effective tamoxifen therapy of breast cancer involves both antiproliferative and pro-apoptotic changes. *Eur. J Cancer* **36**: 845-851.
- Carmichael, P.L., Ugwumadu, A.H.N., Neven, P., et al.** (1996). Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium. *Cancer Res.*, **56**: 1475-1479.
- Carthew, P., Edwards, R.E., Nolan, B.M., et al.** (2000) Tamoxifen induces endometrial and vaginal cancer in rats in the absence of endometrial hyperplasia. *Carcinogenesis*, **21**: 793-797.
- Carvalho, C.E., Santos Jr, A.R. and Wada, M.L.F.** (1999) Dexamethasone-induced chromosome number alterations in cell culture. *Med. Sci. Res.*, **27**: 219-221.
- Caselitz, J., Osborn, M. and Weber, K.** (1981) Intermediate-sized filament protein (prekeratin, vimentin, desmin) in the normal parotid and parotid gland tumors. *Cancer*, **54**: 2959-2967.
- Castellone, M.D., Cirafici, A.M., De Vita, G., et al.** (2003) Ras-mediated apoptosis of PC CL 3 rat thyroid cells induced by RET/PTC oncogenes. *Oncogene*, **22**: 246-55.
- Chen, J-M, Olden, K., Berand, B.A. and Fong-Fong, C.** (1984) Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.*, **98**: 1546-1555.
- Chen, J-M and Chen, W-T** (1987) Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cells. *Cell*, **48**: 193-203.
- Cheng, A.L., Chuang, S.E., Fine, R.L., et al.** (1998). Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen. *Biochem. Pharmacology*, **55**: 523-531.
- Clapham, D.E.** (1995) Calcium signaling. *Cell*, **80**: 259-268.

- Clarke, R., Leonessa, F., Welch, J.N. and Skaar, T.C.** (2001). Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, **53**: 25-72.
- Cohen, O., Feinstein, E. and Kimchi, A.** (1997) DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *J. EMBO*, **16**: 998-1008,
- Combes, R., Ball, M., Curren, R. et al.** (1999) Cell transformation assays as predictor of human carcinogenicity. *ATLA.*, **27**: 745-767.
- Cook, J.R. and Chen, J.** (1998) Enhancement of transformed cell growth in agar by serins proteases inhibitors. *J. Cell Physiol.*, **136**: 188-193.
- Cross, M. and Dexter, T.M.** (1991) Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, **64**: 271-280.
- Curran, J.A., Lavery, F.S., Campbell, D., et al.** (2001) Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein-1 induces epithelial cell proliferation and sensitizes transgenic mice to chemical carcinogenesis. *Cancer Res.*, **61**: 6730-6738
- Cuzick, J., Powles, T., Veronesi, U., et al.** (2003) Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet*, **361**: 296-300.
- Daosukho, C., Kinningham, K., Kasarskis, E.J., et al.** (2002) Tamoxifen enhancement of TNF-alpha induced MnSOD expression: modulation of NF-kappaB dimerization. *Oncogene*, **21**: 3603-10.
- Davis, W., Venitt, E. and Phillips, D.H.** (1998) The metabolic activation of tamoxifen and α -hydroxitamoxifen to DNA-binding species in rat hepatocytes proceeds via sulphation. *Carcinogenesis*, **19**: 861-866.
- Diamond, L., Kruszewski, F., Aden, D.P., et al.** (1980) Metabolic activation of benzo[a]pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis*, **1**: 871-875.

- Dietze, E.C., Caldwell, L.E., Grupin, S.L., et al.** (2001) Tamoxifen but not 4-hydroxtamoxifen initiates apoptosis in p-53(-) normal human mammary epithelial cells by inducing mitochondrial depolarization. *J. Biol. Chemistry*, **276**: 5384-5394.
- Dong, J., Naito, M. and Tsuruo, T.** (1997) c-Myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells. *Oncogene*, **15**: 639-647.
- EBCTCG** (1998) Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet*, **351**: 1451-1467
- Ellis, M.J., Coop, A., Singh, B., et al.** (2003) Letrozole inhibits tumor proliferation more effectively than tamoxifen independent of HER1/2 expression status. *Cancer Res.*, **63**: 6523-6531.
- Emons, G., Fleckenstein, G., Hinney, B., et al.** (2000) Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocrine-Rel. Cancer*, **7**: 227-242.
- Feng, Z., Hu, W., Rom, W.N., et al.** (2002) 4-aminobiphenyl is a major etiological agent of human bladder cancer: evidence from its DNA binding spectrum in human p53 gene. *Carcinogenesis*, **23**: 1721-1727.
- Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., et al.** (1998) Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst.*, **90**: 1371-1388.
- Gamboa da Costa, G., McDaniel-Hamilton, L.P., Heflich, R.H., et al.** (2001). DNA adduct formation and mutant induction in Sprague-Dawley rats treated with tamoxifen and its derivatives. *Carcinogenesis*. **22**(8): 1307-1315.
- Genari, S.C. and Wada, M.L.F.** (1995) Behavioural differences and cytogenetical analysis of a transformed cellular population derived from a Vero cell line. *Cytobios*, **81**: 17-25.

- Genari, S.C., Dolder, M.A.D. and Wada, M.L.F.** (1996) Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **28**(4):565-572.
- Genari, S.C., Gomes, L. and Wada, M.L.F.** (1998) Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell Biol. Int.*, **22**(4): 285-294.
- Genari, S.C. and Wada, M.L.F.** (2000) Effects of nutritional stress conditions on the ploidy and growth of human amniotic cells. *Cellular and Developmental Biology*, **36**: 147-150.
- Genari, S.C. and Wada, M.L.F.** (2003) Influence of the nutritional stress conditions on differentiation and tubulogenesis of epithelial cells. *Braz. J. Morph. Sci.*, **20**: 135-140.
- Glatt, H., Davis, W., Meinel, W., et al.** (1998) Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis*, **19**: 1709-1713.
- Greaves, P., Goonetilleke, R., Nunn, G., et al.** (1993) Two-years carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res.*, **53**:3919-3924.
- Gulino, A., Barrera, G., Vacca, A., et al.** (1986). Calmodulin antagonism and growth-inhibition activity of triphenylethylene antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.*, **46**: 6274-6278.
- Gundimeda, U., Chen, Z.H., and Gopalakrishna, R.** (1996) Tamoxifen modulates protein kinase C via oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **271**: 13504-13514.
- Gylvarry, U., Farrel, D., Lynch, V., et al.** (1990). Cytological differences between normal and malignant human cell populations in culture. *Cancer Res.*, **50**: 3390-3393.

- Hainaut, P. and Pfeifer, G.P.** (2001) Patterns of p53 G-T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke *Carcinogenesis*, **22**: 367-374.
- Han, X. and Liehr, J.G.** (1992). Induction of covalent DNA adducts in rodents by tamoxifen. *Cancer Res.*, **52**: 1360-1363.
- Hansen, S.H., Zegers, M.M.P., Woodrow, et al.** (2000) Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **20**: 9364-9375.
- Hard, G.C., Iatropoulos, M.J., Jordan, K., et al.** (1993) Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD(BR) rats. *Cancer Res.*, **53**: 4534-4541.
- Haschek, W.M. and Rosseaux, C.G. (editors)** (1998) Chemical carcinogenesis. *In: Fundamentals of toxicologic pathology*. Academic Press, San Diego , California, USA.
- 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**:352-357
- Heidelberger, C., Freeman, A., Pienta, R.J., et al.** (1983) Cell transformation by chemical agents – a review and analysis of the literature. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.*, **114**: 283-385.
- Hemminki, K., Rajaniemi, H., Koskinen, M. and Hansoon, J.** (1997). Tamoxifen induced DNA adducts in leucocytes of breast cancer patients. *Carcinogenesis*, **18**: 9-13.
- Henderson, B.E., Bernstein, L. and Ross, R. K.** (2000) Hormones and the Etiology of Cancer. *In: Bast, R.C.; Kufe, D.W.; Pollock, R.E.; Weichselbaum, R.R.; Holland, J.F.; Frei, E., editors: Cancer Medicine 5th ed.* [Internet]. Hamilton (Canada): BC Decker Inc; 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>.

- Hodges, L.C., Cook, J.D., Lobenhofer, E.K., et al.** (2003) Tamoxifen functions as a molecular agonist inducing cell cycle-associated genes in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, **1**: 300-311.
- 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**: 237-244.
- Hynes, R.O.** (1990) Oncogenic transformation. *In: Fibronectins.* (ed. Springer-Verlag), pp231-248. New York.
- IARC/NCI/EPA Working group** (1985) Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Res.*, **45**: 2395-2399.
- Imagawa, W., Pedchenko, V.K., Helber, J., and Zhang, H.** (2002) Hormone/growth factor interactions mediating epithelial/stromal communication in mammary gland development and carcinogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **80**: 213-230.
- Isfort, R.J.** (2000) Mechanisms of cell transformation in the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **919**: 86-96.
- ISO 10993-5** (1992) Biological evaluation of medical devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: methods.
- Jäätela, M.** (1999) Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.*, **248**: 30-43.
- Jain, P.T., and Trump, B.F.** (1997) Tamoxifen induces deregulation of [Ca²⁺] in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **17**: 1167-74
- Jan, C-R., Cheng, J-S., Chou, K-J., et al.** (2000) Dual effect of tamoxifen, an anti-breast-cancer drug, on intracellular Ca²⁺ and cytotoxicity in intact cells. *Toxic. Appl. Pharmac.* **168**: 58-63.

- Jansen, J.G., Mohn, G.R., Vrieling, H., et al.** (1994) Molecular analysis of *hprt* gene mutations in skin fibroblasts of rats exposed *in vivo* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, **54**: 2478-2485.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. and Lowe, S.W.** (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, **108**: 153-164.
- Kang, Y., Cortina R., and Perry, R.R.** (1996) Role of *c-myc* in tamoxifen-induced apoptosis estrogen-independent breast cancer cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**: 279-284.
- Katzenellenbogen, B.S and Katzenellenbogen, J.A** (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta - regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer *Breast Cancer Res.*, **2**: 335–344.
- Kawai, T., Nomura, F., Hoshino, K., et al.** (1999) Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulin-dependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. *Oncogene*, **18**:3471-3480.
- Keen, J.C., Dixon, J.M., Miller, E.P. et al.** (1997) The expression of Ki-S1 an Bcl-2 and the response to primary tamoxifen therapy in elderly patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, **44**: 123-133.
- 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.
- Kim, J.H., Stansbury, K.H., Walker, N.J., et al.** (1998) Metabolism of benzo[α]pyrene and benzo[α]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis*, **19**: 1847-1853.
- King, C.M.** (1995). Tamoxifen and the induction of cancer. *Carcinogenesis*, **16**: 1449-1454.

- Klaunig, J. and Ruch, R.J.** (1990) Biology of disease: role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab. Invest.*, **62**: 135-146.
- Levenson, A.S., Svoboda, K.M., Pease, K.M., et al.** (2002) Gene expression profiles with activation of the estrogen receptor -selective estrogen receptor modulator complex in breast cancer cells expressing wild-type estrogen receptor. *Cancer Res.*, **62**: 4419-4426.
- Lim, J.S., Frenkel, K. and Troll, W.** (1992) Tamoxifen suppresses tumor promotor-induced hydrogen peroxyde formation by human neutrophils. *Cancer Res.*, **52**: 4969-4972.
- Loewenstein, W.R.** (1979) Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. Biophys. Acta*, **560**: 1-65.
- Lowe, S.W. and Lin, A.W.** (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**:485-495.
- Mandlekar, S., Hebbar, V., Christov, K. and Tony Kong, A-N.** (2000) Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethyl metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, **60**: 6601-6606.
- Mandlekar, S. and Kong, A.N.** (2001). Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis*, **6**: 469-477.
- McClay, E.F. and Jones, J.A.** (1999) Characterization of a human melanoma cell line with non-oestrogen receptor dependent tamoxifen resistance. *Melanoma Res.*, **9**:531-537.
- Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., et al.** (1998) Spindle disturbances induced by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenzo(a)nthracene in a Chinese hamster cell line (V79-MZ) and the stability of the numerical chromosome aberrations that follow. *Mut. Res.*, **419**:1-12.

- Metzler, M. and Schiffmann, D.** (1991) Structural requirements for the *in vitro* transformation of Syrian hamster embryo cells by stilbene estrogens and triphenylethylene-type antiestrogens. *Am J Clin Oncol.*, **14** Suppl 2:S30-5
- Mitrani-Rosenbaum, S. and Tsvieli, R.** (1992) Differential cooperation of a carcinogen with human papillomavirus type 6 and 16 DNAs in *in vitro* oncogenic transformation. *Intervirology*, **33**: 76-85.
- Miyagawa, M., Katsuta, O., Chida, T., et al.** (1998) Occurrence of toxicity and cell proliferation after a single gavage administration of chloroform to male F344 rats. *J Toxicol Sci.*, **23**: 205-211.
- Murray, J.C., Liotta, L., Rennard, S.I. and Martin, G.R.** (1980) Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells . *Cancer Res.*, **40**: 347-351.
- Nabholtz, J.M., Buzdar, A., Pollak, M., et al.** (2000). Anastrozole is superior to tamoxifen as first-line therapy for advanced breast cancer in postmenopausal women: results of a North American Multicenter Randomized Trial. *J. Clin. Oncology*, **18**, 3758-3767.
- Narod SA, Brunet JS, Ghadirian P, et al.** (2000) Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet*, **356**: 1876-1881.
- Nermut, M.V., Eason, P., Hirst, E.M.A. and Kellie, S.** (1991) Cell/substratum adhesion in RSV-transformed rat fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **193**: 382-397.
- Newbold , R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Burgos, E. and Bullock, B.C.** (1997) Uterine carcinoma in mice treated neonatally with tamoxifen. *Carcinogenesis*, **18**: 2293-2298.
- Obrero, M., Yu, D.V. and Shapiro, D.J.** (2002) Estrogen receptor-dependent and estrogen receptor –independent pathways for tamoxifen and 4-hydroxitamoxifen-induced programmed cell death. *J. Biol. Chem.*, **47**: 45695-45703.

- O'Brian, C.A., Ioannides, C.G., Ward, N.E., and Liskamp, R.M.** (1990) Inhibition of protein kinase C and calmodulin by the geometric isomers cis- and trans-tamoxifen. *Biopolymers*, **29**: 97-104.
- Osborne, K.C.** (1998) Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *The New Engl. J. Medicine*, **339**(22): 1609-1619.
- Ponder, B.A.** (2001). Cancer genetics. *Nature*, 411: 336-341.
- Pihan, G.A. and Doxsey, S.J.** (1999) The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Cancer Biology*, **9**: 289-302.
- Phillips, D.H., Carmichael, P.L., Hewer, A., et al.** (1996) Activation of tamoxifen and its metabolite α -hydroxitamoxifen to DNA-binding products: comparisons between human, rat and mouse hepatocytes. *Carcinogenesis*, **17**: 88-94.
- Phillips, D.H.** (2001) Understanding the genotoxicity of tamoxifen? *Carcinogenesis*, **22**(6): 839-849.
- Powles, T., Eeles, R., Ashley, S., et al.** (1998). Interim analysis of the incidence of breast cancer in the Royal Marsden Hospital tamoxifen randomised chemoprevention trial. *Lancet*, **352**: 98-101.
- Rajah. T.T. and Pento, J.T.** (1995) The mutagenic potential of antiestrogens at the *hprt* locus in V79 cells. *Res. Comm. Path. Pharm.*, **89**:85-92.
- Rajewsky, M.F., Engelbergs, J., Thomale, J., Schweer, T.** (2000) DNA repair: counteragent in mutagenesis and carcinogenesis: accomplice in cancer therapy resistance. : *Mutat Res.*, **462**: 101-105.
- Ren, J., Hamada, J., Takeichi, N. et al.** (1990) Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.*, **50**: 358-362.

- Ruddon, R.W.** (1987) Phenotypic characteristics of transformed malignant cells. *In: Cancer biology*. 2nd ed. Oxford University Press. New York.
- Russo J, Hasan Lareef M, Balogh G, et al.** (2003) Estrogen and its metabolites are carcinogenic agents in human breast epithelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **87**: 1-25.
- Rutqvist, L.E., Johansson, H., Signomklao, T., et al.** (1995) Adjuvant tamoxifen therapy for early stage breast cancer and second primary malignancies. *J. Natl. Cancer Inst.*, **87**: 645-651.
- Salami, S. and Karami-Tehrani, F.** (2003) Biochemical studies of apoptosis induced by tamoxifen in estrogen receptor positive and negative breast cancer cell lines. *Clin. Biochemistry*, **36**: 247-253.
- Santos Jr., A.R. and Wada, M.L.F.** (2001) Diferenciação celular. *In: Carvalho, H.F. & Recco-Pimentel, S.M. A Célula 2001*. Editora Manole. pp 260-274.
- Sargent, L.M., Dragan, Y.P., Sattler, C., et al.** (1996) Induction of hepatic aneuploidy by tamoxifen, toremifene and idoxifene in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis*, **17**: 1051-1056.
- Sasaki, K., Mironov, N., Yilmaz, A., et al.** (1998) Malignant transformation of simian virus 40-immortalized human milk epithelial cells by chemical carcinogenesis accompanied by loss of heterozygosity on chromosome 1 but not microsatellite instability. *Mol Carcinog.*, **23**: 20-24.
- Schild LJ, Divi RL, Beland FA, et al.** (2003) Formation of tamoxifen-DNA adducts in multiple organs of adult female cynomolgus monkeys dosed with tamoxifen for 30 days. *Cancer Res.*, **63**: 5999-6003.
- Shibutani, S., Suzuki, N., Terashima, I., et al.** (2000). Tamoxifen-DNA adducts detected in the endometrium of women treated with tamoxifen. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**: 646-653.

- Shibutani S, Ravindernath, A., Suzuki N, et al.** (2000) Identification of tamoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with tamoxifen. *Carcinogenesis*, **21**: 1461-1467.
- Shibutani, S., Suzuki, N., Laxmi, Y.R., et al.** (2003) Identification of tamoxifen-DNA adducts in monkeys treated with tamoxifen. *Cancer Res.*, **63**: 4402-4406.
- Shiraishi, M., Oates, A.J. and Sekiya, T.** (2002) An overview of the analysis of DNA methylation in mammalian genomes. *Biol. Chem.*, **383**: 893-906.
- Simard, M., Zhang, W., Hinton, D.R., et al.** (2002) Tamoxifen-induced growth arrest and apoptosis in pituitary tumor cells *in vitro* via a protein kinase C-independent pathway. *Cancer Letters*, **185**: 131-138.
- Sivak, A. and Tu, A.S.** (1984) Neoplastic transformation systems – their use in studying carcinogenesis. *In*: Celis, J. and Graessmann, A. (editors): Cell transformation. NATO Advanced Science Institutes and Plenum Press, New York.
- Smaili, S.S., Hsu, Y.-T., Carvalho, A.C.P., et al.** (2003) Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36**: 183-190.
- Smets, L.A.** (1980) Cell transformation as a model for tumor induction and neoplastic growth. *Biochem. Bioph. Acta*, **605**: 93-111.
- Stackiewicz, R., Drucker, L., Radnay, J., et al.** (2001) Tamoxifen modulates apoptotic pathways in primary endometrial cell cultures. *Clin. Cancer Res.*, **7**: 415-420.
- Styles JA, Davies A, Davies R, et al.** (1997) Clastogenic and aneugenic effects of tamoxifen and some of its analogues in hepatocytes from dosed rats and in human lymphoblastoid cells transfected with human P450 cDNAs (MCL-5 cells). *Carcinogenesis*. **18**: 303-13.
- Sukumar, S. and Barbacid, M.** (1990) Specific patterns of oncogene activation in transplacentally induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 718-722.

- Thangaraju, M., Vijayalakshmi, T. and Sachdanandam, P.** (1992) Effect of tamoxifen on lipid peroxide and antioxidative enzyme in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer*, **74**: 4969-4972.
- Tsutsui, T., Tagushi, S., Tanaka, Y., and Barret, J.C.** (1997). 17 beta-estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Can.*, **70**: 188-193.
- Veronesi, U., Maisonneuve, P., Costa, A, et al.** (1998) Prevention of breast cancer with tamoxifen: preliminary findings from the Italian randomized trial among hysterectomised women. *Lancet* **352**: 93-97.
- Von Tungeln, L.S., Xia, Q., Heflich, R.H. and Fu, P.P.** (1999) Tumorigenicity and liver tumor ras-protoncogene mutation in CD-1 mice treated neonatally with 1-and 3-nitrobenzo(a)pyrene and their trans-7,8-dihidrodiol and aminobenzeno(a)pyrene metabolites. *Cancer Lett.*, **137**(2): 137-143.
- Wang Z, Kyo S, Maida Y, et al.** (2002) Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells. *Oncogene*, **21**: 3517-3524.
- Wei, H. and Frenkel, K.** (1993) Relationship of oxidative events and DNA oxidation in Sencar mice to promotion activity of phorbol esteryotipe tumor promoters. *Carcinogenesis*, **41**:1195-1201.
- Wei, H., Cai, Q., Tian, L. and Lebwohl, M.** (1998) Tamoxifen reduces endogenous and UV light-induced oxidative damage to DNA, lipid and protein. *Carcinogenesis*, **19**: 1013-1018.
- Wigley, C.** (1990) Carcinogênese Química e Lesões Pré-cancerosas. In: Franks, L.M. & Teich, N. *Introdução à Biologia Celular e Molecular do Câncer*. Editora Roca.

- Williams, G.M., Iatropoulos, M.J., Djordjevic, M.V., and Kaltenberg, O.P.** (1993) The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in the rat. *Carcinogenesis*, **14**: 315-317.
- Williams, G.M.** (2001) Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, **166**: 3-10.
- White, I.N.H** (1999) The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis*, **20**: 1153-1160.
- Yadollahi-Farsani, M., Davies, S.D. and Boobis, A.R.** (2002) The mutational signature of α -hydroxytamoxifen at *hrpt* locus in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis*, **23**: 1947-1952.
- Yamasaki, H.** (1990) Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**: 1051-1058.
- Yamasaki H.** (1996) Role of disrupted gap junctional intercellular communication in detection and characterization of carcinogens. *Mutat Res.*, **365**: 91-105.
- Xu, Y., Nguyen, Q., Lo, D.C. and Czaja, M.J.** (1997) c-Myc dependent hepatoma cell apoptosis results from oxidative stress and not a deficiency of growth factors. *J. Cell Physiol.*, **170**: 192-199.
- Zhang, C.C. and Shapiro, D.J.** (2000) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by estrogen or by 4-Hydroxytamoxifen is coupled to estrogen receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **275**: 479-486.
- Zhang, W., Couldwell, W.T., Song, H., et al.** (2000) Tamoxifen-induced enhancement of calcium signaling in glioma and MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, **60**: 5395-5400.
- Zhong, M., Lu, Z., Abbas, T., Hornia, A., Chatakondur, K., Barile, N., Kaplan, P. and Foster, D.A.** (2001) Novel tumor-promoting property of tamoxifen. *Cell Growth & Differ.*, **12**: 187-192.