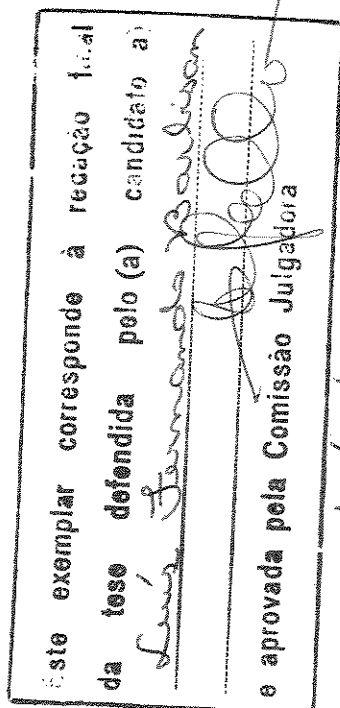


LUÍS FERNANDO BARBISAN



ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS CELULARES E NUCLEARES EM
CÉLULAS EPITELIAIS MAMÁRIAS HUMANAS TRANSFORMADAS POR
BENZO[A]PIRENO E TRANSFECTADAS COM O ONCOGENE c-Ha-ras:
ASPECTOS CITOQUÍMICOS E DE ANÁLISE DE IMAGEM



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

MARIA LUÍZA S. MELLO

Orientadora

CAMPINAS

1997

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T	Unicamp
B234a	
V	E
TEMPO EM	30888
PROC.	28/1/97
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/06/97
N.º CPD	

CM-00098391-6

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

Barbisan, Luís Fernando

B234a Alterações morfofisiológicas celulares e nucleares em células epiteliais mamárias humanas transformadas por benzo [a] pireno e transfectadas com o oncogene c-Ha-ras: aspectos citoquímicos e de análise de imagem/ Luís Fernando Barbisan. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
115f.: illus.

Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Citoquímica. 2. Biologia celular. ^x I. Mello, Maria Luiza Silveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Local e Data: Campinas, 10 de Março de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Maria Luíza S. Mello

Depto. de Biologia Celular-IB-UNICAMP



Assinatura

Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Depto. de Biologia Celular-IB-UNICAMP

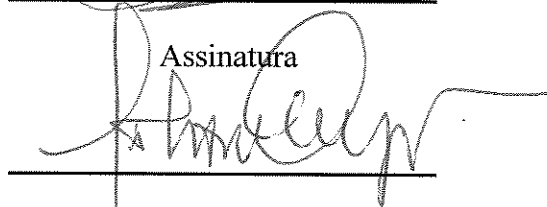


Assinatura

Prof. Dr. João Lauro V. de Camargo

Depto. de Patologia da Fac. de Medicina

UNESP-Campus de Botucatu



Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Christine Hackel

Depto. de Genética Médica

FCM/UNICAMP



Assinatura

“ Feliz o homem que convivendo em ambiente de relações humanas
tão difíceis, como é o universitário, consegue fazer alguns
verdadeiros amigos”.

A minha orientadora a **Profa. Dra. Maria Luíza S. Mello** pelo exemplo de dedicação à carreira científica, pela orientação segura e considerações críticas que possibilitaram a realização deste trabalho.

Minha eterna gratidão aos meus pais, **Antonio e Maria**, e aos meus irmãos,
Marcos e José Carlos, pelo carinho, apoio e por tudo que vocês
representam na minha vida.

A minha querida **Ana Lúcia** pelo apoio e carinho,
dedico esta simples homenagem:

" Me sinto feliz porque você faz parte da minha vida, dos meus
pensamentos e de minhas mais belas lembranças."

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, em especial, agradeço:

À **Deus Pai** por estar sempre ao meu lado, iluminando todos os passos da minha vida;

Ao **CNPq (Proc. N^o. 133384 / 95-0)** e a **FAPESP (Proc. N^o. 95/6629-8)** pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho

À **Pós-Graduação em Biologia Celular da UNICAMP**, pela oportunidade e formação;

Ao **Dr. Jose Russo** (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 1911, USA), pela gentileza em fornecer as linhagens celulares utilizadas neste estudo;

Ao **Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal**, **Prof. Dr. Joao Lauro V. de Camargo** e a **Profa. Dra. Christine Hackel**, pelas considerações feitas durante a Pré-Banca;

À **Profa. Dra. Nancy Lopes Garcia** e ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani**, pelo assessoramento na elaboração das análises estatísticas;

Ao **Depto. de Patologia da Fac. de Medicina de Botucatu**, pela utilização do sistema de análise de imagem **LUZEX-NIREKO-JAPAN**;

Aos colegas de turma **Márcio, Sérgio, Marcos, João Flávio, Marta, Luciano, Jáiro** e demais pós - graduandos do **Depto. de Biologia Celular** pela convivência e amizade;

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Celular, em especial a **Cidinha, Lilian e Sidiney** das secretarias do departamento e de pós-graduação e ao **Mário e Dona Maria e Dona Irma**, pelo apoio e amizade;

Aos professores **Benedicto de Campos Vidal, Maria Luíza S. Mello, Hernandes F. de Carvalho, Édson R. Pimentel, Shirlei M. Recco - Pimentel, Mary A. Heidi Dolder, Lúcia Wada, Ângelo L. Cortelazzo e Laurecir Gomes** do **Depto. de Biologia Celular** pelos ensinamentos e considerações dispensados.

ÍNDICE

I- <u>Introdução.</u>	01
I.1- Aspectos gerais do benzo[a]pireno: metabolismo, mutagênese e carcinogênese.	01
I. 2- Células em cultura e transformação neoplásica.	04
I.3- Células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, como modelo para estudo da progressão tumoral.	06
I.4- Alterações cromatínicas e nucleares nos processos de transformação celular e progressão tumoral em células epiteliais mamárias humanas “ in vitro” e “ in vivo”.	10
II- <u>Objetivos.</u>	13
III- <u>Materiais e Métodos.</u>	13
III.1- Linhagens celulares e condições de cultura.	14
III.2- Preparações celulares e colorações citoquímicas.	15
III.3- Cálculo de índice mitótico, bi- e multinucleação, micronúcleos e células gigantes e apoptóticas.	18
III.4- Morfometria nuclear e nucleolar	20
III.5- Documentação fotográfica.	20
III.6- Análise estatística.	20
IV- <u>Resultados.</u>	22
IV.1- Generalidades quanto a forma, tamanho e número de núcleos e nucléolos e textura cromatínica.	22
IV.2- Índice mitótico, bi- e multinucleação, micronúcleos e células gigantes e apoptóticas.	28

IV.3- A basofilia em núcleos interfásicos, em células mitóticas e em células apoptóticas.	29
IV.4- Resposta Ag-NOR ⁺ interfásica e mitótica.	34
IV.5- Morfometria nuclear e nucleolar determinada por análise de imagem.	39
V- <u>Discussão.</u>	69
V.1- Resposta de relocação de RNA durante a mitose de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.	69
V.2- Proliferação celular e apoptose em células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.	73
V.3- Alterações nucleares, nucleolares e cromatínicas em células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.	82
VI- <u>Considerações finais.</u>	92
VII- <u>Abstract.</u>	95
VIII- <u>Resumo.</u>	97
IX- <u>Referências bibliográficas.</u>	99

I- Introdução.

I.1) Aspectos gerais do benzo[a]pireno: metabolismo, mutagênese e carcinogênese.

O câncer de mama é a neoplasia mais comum e uma das principais causas de morte relacionada ao câncer entre mulheres no mundo (BORING et al., 1992). Apesar dos avanços nas áreas da terapia e da detecção precoce do câncer de mama, as taxas de mortalidade por este tipo de neoplasia vêm se mantendo relativamente altas e constantes nas últimas décadas; cerca de 27 em 100000 mulheres nos USA e no mundo morrem desta doença (HARRIS et al., 1992; MARSHALL, 1993). Este fato se deve, provavelmente, a falta de programas de prevenção adequados pelo próprio desconhecimento da etiologia dos cânceres de mama (LI et al., 1996).

Vários fatores de risco parecem estar associados a etiologia do câncer de mama. Entre os principais citam-se: a história reprodutiva, a história familiar de câncer de mama, terapia e “status” hormonal, consumo de álcool, cigarro, gordura e calorias e a exposição à radiação e a carcinógenos químicos do meio ambiente (KELSEY & BERKOWITZ, 1988; ADAMI et al., 1990; METTLIN, 1992; HARRIS et al., 1992; MARSHALL, 1993; LI et al., 1996). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estão entre as substâncias químicas suspeitas de terem um papel importante na etiologia do câncer de mama (EL-BAYOUMY, 1992; WARSHAWSKY, 1992; LI et al., 1996).

O benzo[a]pireno é um hidrocarboneto policíclico aromático, subproduto da combustão de material orgânico e, portanto, um componente comum da fumaça do cigarro. Sua importância biológica reside no fato do ser humano estar exposto a ele não somente como componente da fumaça do cigarro, mas também como parte de inúmeras outras fontes ambientais como a ingestão de alimentos,

principalmente os defumados, e a inalação de resíduos da queima de combustíveis fósseis, principalmente da exaustão de veículos automotivos e de carvão vegetal, este último a nível de exposição ocupacional ou doméstico (cozimento de alimentos). (IARC, 1983).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em geral, incluindo o benzo[a]pireno, necessitam ser metabolizados a espécies intermediárias reativas, para que exerçam sua atividade mutagênica e, conseqüentemente, iniciadora da carcinogênese (MILLER & MILLER, 1981; CONNEY, 1982; PHILLIPS, 1983; PHILLIPS & GROVER, 1984; WARSHAWSKS, 1992). O benzo[a]pireno é convertido a metabólitos reativos pelo sistema microsomal das oxidasas de função mista dependente do citocromo P 450 (PHILLIPS, 1983; COOPER et al., 1983; PHILLIPS & GROVER, 1984; McMANUS et al., 1990.). A ligação covalente de metabólitos reativos específicos do benzo[a]pireno ao DNA de células- alvo leva à formação de aductos no DNA; estes, por sua vez, exercem seus efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos em tecidos - alvo (GELBOIN, 1980; MILLER & MILLER, 1981; PHILLIPS & GROVER, 1984; WARSHAWSKS, 1992) . O metabólito mais importante e predominante na formação de aductos de DNA é o (+/-)-anti-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido-benzo[a]pireno ((+/-)-anti-BPDE) (Fig. 1), identificado tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo* (BODELL et al., 1989; WOLTERBEEK et al., 1993).

O (+)-anti-BPDE e seu enantiômero, o (-)-anti-BPDE reagem, preferencialmente, com a desoxiguanosina dos ácidos nucleicos de células susceptíveis, formando aductos de B[a]P-N2-gua (Fig. 1); entretanto, estas espécies eletrofílicas podem também reagir com a desoxiadenina, formando aductos de B[a]P-N6-adenina (GELBOIN, 1980; PHILLIPS, 1983; COOPER et al., 1983; PHILLIPS & GROVER, 1987). O (+/-)-anti-BPDE é formado também em células

epiteliais de mama humana em cultura, expostas ao benzo[a]pireno (PRUESS-SCHWARTZ, et al.,1986).

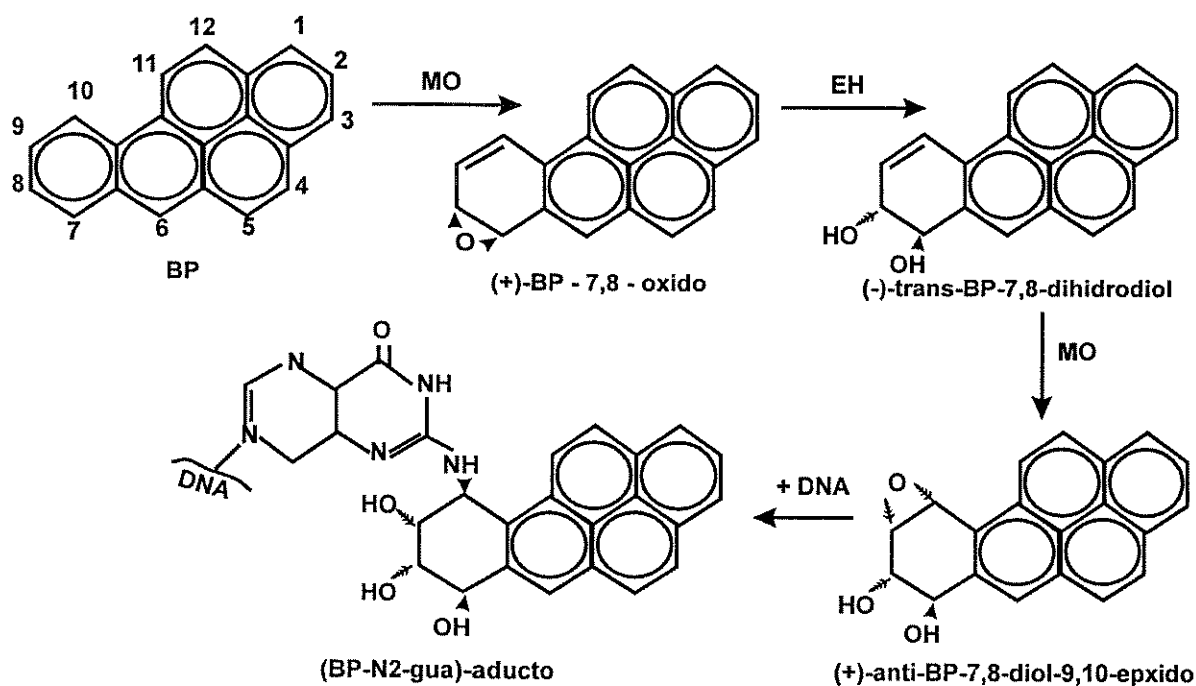


Figura 1-Via metabólica principal da ativação do benzo[a]pireno (BP)(PHILLIPS, 1983; PHILLIPS & COVER, 1984). A estrutura do principal aducto BP-guanina no DNA também é mostrada. MO = monooxigenase; EH= epóxido hidrolase.

O benzo[a]pireno foi identificado como sendo mutagênico no teste de Ames (KIER et al., 1986) e, ao ser adicionado à cultura de linfócitos periféricos humanos, mostrou aumentar a incidência de micronúcleos e de trocas entre cromátides irmãs (THOMPSON et al., 1989; WENCKE et al., 1990;

WARSHAWSKY et al., 1995) e parece que estas alterações genéticas estão diretamente relacionadas ao metabolismo deste agente químico e, conseqüentemente, à formação de aductos no DNA destas células. Além disso, é um potente carcinógeno local e sistêmico em diferentes vias de administração em roedores. Especificamente, o câncer de mama em ratas é induzido quando o benzo[a]pireno é administrado intravenosamente (IARC, 1983). As evidências epidemiológicas mostram que o benzo[a]pireno é um carcinógeno potencial para o homem (IARC, 1983).

1.2) Células em cultura e transformação neoplásica

O uso de cultura de células humanas parece ser um meio promissor para se obter informações à cerca da etiologia, da biologia e das múltiplas etapas do desenvolvimento do câncer no ser humano (SMETS, 1980; HARRIS, 1987; KUROKI et al., 1989), visto que os estudos *in vivo* com seres humanos, exceto os clínicos e epidemiológicos, são logística e eticamente impossíveis de serem realizados (KUROKI et al., 1989). O estabelecimento de métodos para transformação de células epiteliais *in vitro*, estas responsáveis por 80% dos cânceres humanos no adulto, poderia facilitar o entendimento dos agentes causais de neoplasia humana e os mecanismos intrínsecos à progressão tumoral (STAMPFER & BARTLY, 1985). Entretanto, poucos pesquisadores têm estudado a transformação de células epiteliais humanas *in vitro*, provavelmente pelas dificuldades de transformação e cultivo destes tipos celulares (CHANG, 1986; HARRIS, 1987).

A imortalização e a transformação de células em cultura pode ser realizada, entre outras maneiras, através da exposição das culturas a agentes físicos (luz ultravioleta, raios X e γ) (BOREK, 1980; MILO et al., 1981a,b), ou substâncias

químicas (STAMPFER & BARTLY, 1985; McCORMICK & MAHER, 1988; CALAF & RUSSO, 1993), ou ainda, através da transferência de DNA (SUGDEN, 1989; BAND et al., 1990), oncogenes (YOAKUM et al., 1985; HURLIN et al., 1989; BASOLO et al., 1991) ou oncoproteínas virais (MANSIN & ANDROPHY, 1993; MÜNGER & PHELPS, 1993), ao DNA genômico de células em cultura. A imortalização celular parece, no entanto, ser um evento chave na transformação neoplásica induzida em células em cultura (SMETS, 1980; SHAY et al., 1991; NEWBOLD et al., 1993; RUSSO et al., 1993; BARNABAS et al., 1995).

A transformação neoplásica deve ser entendida como um processo que leva a alterações progressivas e acumulativas no perfil morfológico e bioquímico da célula, sustentadas por modificações na expressão de oncogenes e genes supressores tumorais que atuam em diferentes sítios controlando os processos de proliferação e de diferenciação celulares e a apoptose (PIENTA et al., 1989; BOS & KREIJL, 1992; KERR et al., 1994). Este processo parece, no entanto, ser um evento de múltiplas etapas, observado tanto em alguns tipos de tumores humanos (VOGELSTEIN et al., 1988; FEARON & VOGELSTEIN, 1990; PINKERTON & DUBÉ, 1991; FEARON & JONES, 1992), quanto em tipos de células humanas em cultura (SMETS, 1980; RHIM et al., 1990).

As células tumorais expressam uma variedade de alterações fenotípicas em relação as normais, incluindo a perda de inibição de contato, alterações de adesão celular, perda de junções comunicantes (gap), perdas de características de diferenciação, proteólise diminuída, atividade proliferativa e invasividade aumentada, angiogênese, metástase, restabelecimento da atividade telomerásica, apoptose e sensibilidade a drogas diminuídas (HARTWELL et al., 1994). Em vista do grande número de alterações observadas nas células tumorais, acredita-se que o acúmulo de mutações, devido à instabilidade genética nestas

células, seja um passo decisivo no processo de progressão tumoral (VOGELSTEIN et al., 1988; FEARON & VOGELSTEIN, 1990).

Desta forma, a instabilidade genética, gerada pela perda dos efetores positivos e negativos que controlam a maquinaria de reparo do DNA e a progressão do ciclo celular, parece ser a base de sustentação da progressão tumoral rumo à malignidade (HARTWELL et al., 1994; TLSTY et al., 1995).

I.3) Células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, como modelo para o estudo da progressão tumoral.

Um grupo de pesquisadores americanos, sob o comando do Dr. Jose Russo (Fox Chase Cancer Center- Philadelphia, USA), vêm utilizando uma linhagem de células epiteliais mamárias humanas (MCF-10), imortalizada espontâneamente, para estudar as modificações e os mecanismos moleculares intrínsecos na expressão de fenótipos alterados, associados à transformação celular induzida quimicamente (RUSSO et al., 1993; CALAF & RUSSO, 1993; BARNABAS et al., 1995; ZHANG et al., 1995).

Culturas primárias de células epiteliais mamárias humanas denominadas de MCF-10M foram estabelecidas a partir de tecidos de mama advindos de uma mastectomia subcutânea realizada em uma mulher de 36 anos de idade, que não apresentava nenhuma história de câncer de mama familiar. A análise histopatológica destes tecidos de mama retirados cirurgicamente não identificou a presença de neoplasia, entretanto, apontou a existência de fibrose estromal, alterações císticas e hiperplasia ductal sem atipia celular (SOULE et al., 1990; TAIT et al., 1990).

As culturas de MCF-10M se mostraram finitas e senesciam entre 18 a 20 passagens em meio de cultura com concentrações habituais de Ca^{+2} (1,05 mM).

Contudo, a diminuição da concentração de Ca^{+2} (0,03 à 0,06 mM) no meio de cultura, além de ter aumentado a longevidade *in vitro* destas células epiteliais normais, ocasionou o aparecimento espontâneo de duas sublinhagens de células epiteliais imortais, sem intervenção viral ou química, designadas MCF-10A (células aderidas) e MCF-10F (células em suspensão) (SOULE et al.,1990; TAIT et al., 1990).

As culturas estabelecidas de MCF-10A e F, em meio de cultura com níveis de Ca^{+2} habituais (1,05 mM) ou mais baixos (0,03 à 0,06 mM), mantêm as mesmas características comportamentais *in vitro* de sua linhagem antecedente, a MCF-10M, ou seja, crescimento tridimensional em colágeno, crescimento dependente de fatores de crescimento e hormônios, ausência de crescimento independente de ancoragem, formação de domo em culturas confluentes e ausência de atividade tumorigênica em camundongos atímicos SCID (“severe combined immunodeficiency”), deficientes em células T e B (SOULE et al.,1990; TAIT et al., 1990).

A análise à nível de microscopia eletrônica destas duas sublinhagens celulares (MCF-10A e F) mostrou que ambas possuem características típicas de células epiteliais cúbicas de ductos intralobulares de glândulas mamárias, como o foi também demonstrado imunocitoquimicamente pela detecção de queratinas e de sialomucinas epiteliais (TAIT et al., 1990). O crescimento destas células em meio de cultura, com níveis de Ca^{+2} habituais (1,05 mM), resultou no desenvolvimento de células cubóides baixas com inúmeros desmossomos e microvilos curtos. Contudo, a diminuição da concentração de cálcio no meio de cultura (0,04mM) reduziu significativamente o número de desmossomos, as células se tornaram esféricas e as microvilosidades aumentaram em número e se tornaram mais alongadas do que aquelas em células crescidas em meio com concentrações de cálcio normalmente

estabelecidas em meio de cultura de tecidos (TAIT et al., 1990). Embora a concentração de cálcio no meio de cultura exerça uma influência poderosa sobre a morfologia das linhagens celulares MCF-10 A e F, estas não perderam suas características de células epiteliais (SOULE et al., 1990; TAIT et al., 1990)

Células epiteliais mamárias humanas em cultura são capazes de metabolizar benzo[a]pireno (STAMPFER et al., 1981; BARTLEY et al., 1982), e, portanto, se mostram susceptíveis a este pró-carcinógeno químico (STAMPFER & BARTTLY, 1985; CALAF & RUSSO, 1993). A exposição de tais células a este agente químico induziu o surgimento de clones imortalizados (STAMPFER & BARTTLY, 1985) e transformados, estes últimos representando diferentes estágios da iniciação e progressão tumoral, inclusive expressão de tumorigênese em camundongos atímicos (CALAF & RUSSO, 1993; RUSSO et al, 1993).

O tratamento de células MCF-10F com benzo[a]pireno deu origem a vários clones denominados de BP1, BP2, BP5, BP6, BP7 e BP10, sendo que dos clones BP1 e BP2 se originaram os subclones BP1-E e BP2-B, respectivamente (CALAF & RUSSO, 1993; RUSSO et al, 1993). Estes clones e subclones expressam de maneira progressiva todos os fenótipos indicativos de transformação neoplásica que incluem desde o aumento da sobrevivência em agar, formação de colônias em methoacel-agar, padrão de crescimento celular alterado em matriz de colágeno, crescimento independente de ancoragem, quimoinvasão e atividade tumorigênica em camundongos atímicos SCID, deficientes em células T e B (CALAF & RUSSO, 1993). Entre as linhagens celulares tratadas com benzo[a]pireno, somente as células BP1-E expressaram o fenótipo tumorigênico (CALAF & RUSSO, 1993). Além disso, os clones BP1 e BP1-E mostraram índices de quimoinvasão e quimotaxia maiores que os das células MCF-10F controles, sendo que os clones BP5, BP7 e BP10 manifestaram capacidades quimotrativas e invasivas intermediárias. Em meio

agar-metoacel todos os clones derivados do tratamento de células MCF-10F apresentaram número, tamanho e eficiência de formação de colônias maiores que as células MCF-10F controles, sendo que os clones BP1-E e BP2-B, por sua vez, mostraram índices maiores que as linhagens parentais BP1 e BP2, respectivamente (CALAF & RUSSO, 1993).

O advento da biologia molecular e da engenharia genética possibilitaram o desenvolvimento de métodos de remoção ou inserção de determinados genes na construção de novas linhagens celulares e de animais transgênicos. Estas ferramentas abriram um novo horizonte para se estudar a participação de determinados genes em diferentes processos biológicos, inclusive no desenvolvimento do câncer, tanto em sistemas *in vitro* quanto *in vivo*.

A mutação do proto-oncogene ras é frequentemente observada em diferentes tumores humanos, inclusive no câncer de mama (BOS,1989) e, em células epiteliais mamárias humanas em cultura após a exposição a diferentes carcinógenos químicos (ZHANG et al., 1994), levando à suposição de que este proto-oncogene possui algum papel no desenvolvimento tumorigênico de células epiteliais mamárias humanas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A transfecção do oncogene c-Ha-ras ao genoma de células epiteliais mamárias humanas MCF-10 A e F induziu um aumento da sobrevivência em agar, formação de colônias em methoacel-agar, padrão de crescimento celular alterado e morfologia tridimensional em matriz de colágeno, crescimento independente de ancoragem e perda dos requerimentos de hormônios e fator de crescimento epidermal (EGF), invasividade e atividade colagenolítica aumentada e atividade tumorigênica moderada em camundongos atímicos, ou seja, a inserção do oncogene c-Ha-ras ativado ao DNA de células MCF-10 A e F foi suficiente para induzir sua transformação maligna (BASOLO et al., 1991; CALAF et al., 1995).

A inserção do oncogene c-Ha-ras ao genoma de células MCF-10F transformadas com o benzo[a]pireno (clone BP1), gerando o clone BP1-Tras, aumentou as alterações neoplásicas iniciadas por este carcinógeno químico, inclusive levando à aquisição da propriedade de induzir tumores em camundongos atímicos (CALAF et al., 1995). Contudo, a incidência e latência na indução de tumores das células BP1-Tras em camundongos atímicos foram maior e menor respectivamente, quando comparadas com as das células MCF-10F-Tras, sugerindo que o oncogene c-Ha-ras possui um papel importante nos processos iniciais da tumorigênese, bem como, na progressão de células epiteliais mamárias humanas rumo à malignização (BASOLO et al., 1991; CALAF et al., 1995).

I.4) Alterações cromatínicas e nucleares nos processos de transformação celular e progressão tumoral em células epiteliais mamárias “in vitro” e “in vivo”.

A cromatina se mostra uma estrutura altamente organizada no núcleo de células eucarióticas. Alterações nesta organização em células em processo tumoral parecem estar relacionadas ao desenvolvimento do câncer (PIENTA et al., 1989). Alterações na supraorganização ou textura cromatínica, como avaliadas por análise de imagem, vêm fornecendo importantes informações prognósticas no câncer de mama (KOMITOWSKI & JANSON, 1990; AUBELE et al., 1995). Além dos estudos em tecidos de mama humana comprometidos com a progressão tumoral, alguns estudos de fenótipos nucleares vem sendo realizados por VIDAL & MELLO, para tipos celulares, inclusive com células epiteliais mamárias humanas transformadas *in vitro*, como se reporta abaixo.

Tem sido demonstrado que o DNA de células epiteliais mamárias humanas tratadas com óxido de 4-nitroquinolina (4-NQO), quando transfectado a células NIH 3T3, induz a sua transformação, com o aparecimento simultâneo de

algumas alterações de supraorganização cromatínica (MELLO et al., 1992). Células NIH 3T3 transformadas com o gene Ha-ras, também, mostraram alterações de supraorganização cromatínica (níveis aumentados de condensação de eucromatina (MELLO & RUSSO, 1990). No entanto, tais alterações não se relacionaram diretamente com os níveis de expressão da proteína p21 oncogênica ou de capacidade metastática destas células (MELLO & CHAMBERS, 1994), embora possam ser em parte afetadas por um gene de “recisão” de ras (Lox) (MELLO et al., 1995), o qual codifica uma lisiloxidase atuante na matriz extracelular (KENYON et al., 1991). Com relação ainda à transformação celular induzida pelo oncogene Ha-ras, os núcleos de células epiteliais mamárias humanas MCF-10A também exibem diferenças em supraorganização cromatínica após transformação por esse oncogene, quando comparados com núcleos de células transfectadas com o respectivo proto-oncogene e, mais drasticamente, quando comparados aos núcleos de células de carcinoma mamário humano (MCF-7), ou de células NIH/3T3 transformadas com o gene c-Ha-ras (MELLO et al., 1994).

Tem sido relatado também que o 4-NQO além de outros carcinógenos como o 7,12-dimetil-benz[a]antraceno (DMBA) e o N-nitroso-N-metiluréia (NMU) promovem alterações do fenótipo nuclear em células epiteliais de mama (culturas primárias) (VIDAL & RUSSO, 1987). Entretanto, não foram ainda avaliadas alterações nesse nível quando da exposição de células MCF-10F ao benzo[a]pireno.

Além da importância crescente das avaliações de textura cromatínica na caracterização de diferentes fenótipos nucleares associados ao desenvolvimento tumoral, outras avaliações morfométricas nucleares e nucleolares (BAAK et al., 1985; MARIUZZI et al., 1989; van DIEST et al., 1989; KIMITOWSKI et al., 1989, 1990) de proteínas AgNOR⁺ (GIRI et al., 1989; SIVRIDIS & SIMIS, 1990; ESKELINEN et al., 1991; RONCO et al., 1993) e de índice mitótico (van DIEST et

al., 1989; AALTOMAA et al., 1991; BIESTERFELD et al., 1995; JANNINK et al., 1995), vêm trazendo informações importantes sobre a biologia do câncer de mama . Dessa forma, a existência de clones de células MCF-10F transformadas pela exposição ao benzo[a]pireno, como já mencionado acima, é uma oportunidade excelente para se estudar alterações nucleares e de supraorganização cromatínica e nucleolares, que possam definir diferentes fenótipos nucleares. Tais alterações poderiam ser estudadas através de métodos citoquímicos e com o uso de metodologia de análise de imagem para preparados submetidos a testes citoquímicos específicos, tais como a reação de Feulgen, Ag-NOR, basofilia e outras, de modo semelhante ao já realizado para células de roedores e humanas transformadas por ação do oncogene Ha-ras (MELLO & RUSSO, 1990; MELLO et al., 1992, 1993, 1994, 1995; MELLO & CHAMBERS, 1994).

II- Objetivos.

Tendo-se em vista que a transformação celular é um evento de múltiplas etapas, a identificação de fenótipos nucleares alterados intermediários entre o fenótipo normal e o transformado durante a progressão neoplásica é um instrumento que pode no futuro se revestir de importância diagnóstica e prognóstica do câncer de mama. Este trabalho tem como objetivos avaliar algumas características morfológicas celulares, parâmetros de desenvolvimento celular e apoptose além de possíveis alterações de supraorganização cromatínica e nucleolares em diferentes clones e subclones de células MCF-10F tratadas com benzo[a] pireno , que expressam de maneira progressiva todos os fenótipos indicativos de transformação neoplásica (RUSSO et al., 1993; CALAF & RUSSO, 1993).

III- Materiais e Métodos.

III.1) *Linhagens celulares e condições de cultura*

A linhagem celular MCF-10F, originalmente estabelecida na Michigan Cancer Foundation (Detroit, USA) e seus clones celulares BP1, BP1-E, BP1-E-1, BP1-Tras desenvolvidos no Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, USA), foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jose Russo. As células cresceram em meio DMEM/F-12 (1:1) contendo 1,05 mM de Ca^{+2} e suplementado com 100 IU/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina e 2,5 g/ml de anfotericina B (Gibco, Long Island, NY), 0,5 g/ml de hidrocortisona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 0,1 g/ml de enterotoxina colérica, 10 g/ml de insulina, 5,0 % de soro equino (Gibco, Long Island, N.Y.) e 0,02 g/ml de fator de crescimento epidermal (Collaborative Research, Palo Alto, CA), como descrito anteriormente (SOULE et al., 1990; CALAF & RUSSO, 1993).

Os clones acima mencionados foram obtidos por procedimentos também descritos anteriormente (CALAF & RUSSO, 1993). Em resumo (Fig. 2), o clone BP1 foi obtido por tratamento das células MCF-10F durante 24h com solução de benzo[a]pireno (Aldrich Chemical Co. Inc., Leilwanhee, USA) em DMSO (0,2 g/ ml), de tal forma que a concentração do carcinógeno fosse ajustada a 1% no meio de cultura. As células BP1 (transformadas) deram origem ao clone BP1-E (tumorigênico) e deste último surgiu o clone BP1-E-1 (tumorigênico). O clone BP1-Tras (tumorigênico) foi obtido por transfecção do oncogene c-Ha-ras de células T24 ao genoma das células do clone BP1 (CALAF et al., 1995). As células dos clones MCF-10F, BP1, BP1-E, BP1-E-1, BP1-Tras, foram utilizadas nas passagens 140, 23, 42, 19 e 61, respectivamente.

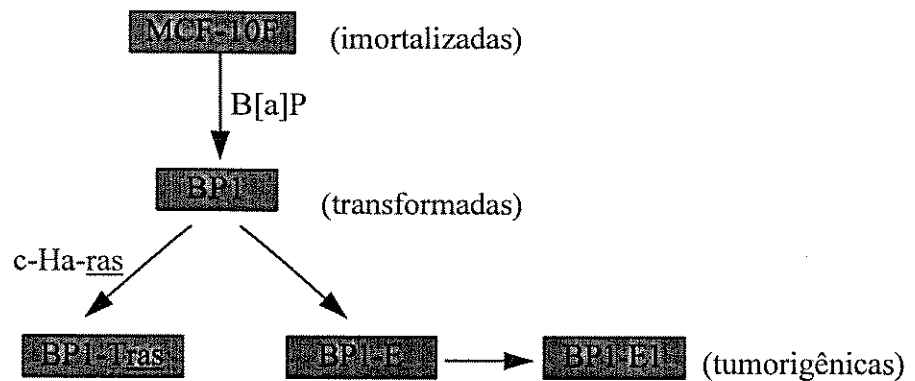


Figura 2- Evolução clonal de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas com o benzo[a]pireno e com a transfecção do oncogene mutado c-Ha-ras

III.2) *Preparações celulares e colorações citoquímicas.*

As células controle MCF-10F e as experimentais BP1, BP1-E, BP1-E1, BP1-Tras cresceram sobre lamínulas. Estas foram fixadas em uma mistura de etanol-ácido acético (EA) (3:1, v/v), durante 1 minuto, lavadas em seguida em etanol 70%, durante 5 minutos e, posteriormente, secadas ao ar, ou então, fixadas em formalina tamponada a 10%, durante 10 minutos, lavadas em seguida em água corrente “overnight” e, posteriormente, secadas ao ar.

III.2.1) *Reações citoquímicas em lamínulas fixadas em formalina tamponada;*

III.2.1.1) Colorações de Banda C (modificada de SUMNER, 1972) e Fast Green pH 2,7, para cálculo de Índice Mitótico (IM), bi - e multinucleação, e presença de gigantes e resposta de basofilia.

As lamínulas foram tratadas em HCl a 0,2 N, durante 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas em seguida em água deionizada e secadas ao ar. As mesmas foram então tratadas com uma solução aquosa de hidróxido de bário ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 5%, durante 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, lavadas em seguida em HCl a 0,2 N, tratadas com tampão citrato tri-sódico (2xSSC) pH 7,0, lavadas em água deionizada e a seguir coradas com uma solução de Giemsa Gurr em tampão Sorensen pH 6,8 a 8%, durante 30 minutos. A seguir, estas foram contra-coradas com uma solução de Fast Green pH 2,7 (DEITCH, 1966), durante 30 segundos. Após a coloração as lamínulas foram lavadas em água deionizada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol durante 15 minutos e montadas em bálsamo do Canadá (n_D : 1,54).

III.2.1.2) Coloração de azul de toluidina (AT) pH 4,0 para avaliação da resposta de basofilia nuclear.

As lamínulas foram coradas com uma solução de 0,025% de azul de toluidina (Merck) em tampão MacIlvaine a pH 4,0, durante 15 minutos , lavadas rapidamente em água destilada, secadas ao ar, diafanizadas em xilol durante 15 minutos e montadas em bálsamo do Canadá (n_D : 1,54) (VIDAL et al., 1973).

III.2.2) *Reações citoquímicas e de prata em lamínulas fixadas em EA;*

III.2.2.1) Método variante de concentração crítica de eletrólitos (CEC) para discriminação de nucléolos interfásicos, relocação de metacromasia de RNA durante a mitose, e núcleos apoptóticos.

As lamínulas foram coradas com uma solução de 0,025% de azul de toluidina (Merck) em tampão McIlvaine a pH 4,0, durante 15 minutos e, imediatamente após a coloração, estas foram tratadas com solução aquosa de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) a 0,05 M, durante 15 min, lavadas rapidamente em água destilada, diafanizadas em xilol durante 15 minutos e montadas em bálsamo do Canadá (n_D : 1,54) (MELLO, 1995). Duas lamínulas com células MCF-10F foram utilizadas como controles da reação acima. Uma das lamínulas foi submetida a um tratamento prévio com uma solução aquosa de RNase III a 0,1% (SIGMA), durante 1 hora à 37 °C antes da coloração e a outra submetida somente à coloração pelo AT, como descrito no item III.2.1.2.

III.2.6) Reação de prata para avaliar a resposta Ag-NOR⁺ interfásica e mitótica.

As lamínulas foram previamente tratadas com uma solução de Triton X-100 em tampão fosfato, durante 15 minutos à temperatura ambiente, lavadas em seguida em água desionizada e tratadas com uma solução de prata. Esta consistiu de 2 partes de uma solução aquosa de prata (0,5 g/mg de $AgNO_3$ (Merck)) para 1 parte de uma solução aquosa de gelatina (1 g de gelatina) em 50 ml de água deionizada contendo ácido fórmico a 1%), durante 10 minutos à 56 °C (VIDAL et al., 1994; VIDAL & MELLO, 1995). Imediatamente após o tratamento com a solução de prata, as lamínulas foram lavadas em água deionizada, para minimizar a impregnação inespecífica pela prata, secadas ao ar, diafanizadas em xilol durante 15 minutos e montadas em bálsamo do Canadá (n_D : 1,54).

III.3) *Cálculo de índice mitótico, bi- e multinucleação, micronúcleos e células gigantes e apoptóticas.*

Para as avaliações de índice mitótico, bi- e multinucleação, micronúcleos e células gigantes (coradas conforme item III.2.1.1) e apoptóticas (coradas conforme item III.2.2.1) foram analisadas no mínimo 2500 células por clone celular. Cada uma destas avaliações foi feita da seguinte forma:

III.3.1) Índice mitótico (IM).

Na avaliação do IM, somente figuras de mitose características de cada uma das fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese) foram incluídas. Figuras de mitose duvidosas ou núcleos picnóticos, hipercromáticos ou deformados foram excluídos da avaliação do IM (BAAK, 1990). Foram contadas todas as figuras de mitose em campos microscópicos semisucessivos, com 0,25 mm² de área (grade de integração 100/25 da Zeiss) de maneira a percorrer toda a lamínula. As condições de análise foram: ocular CPL W 10x/18 e objetiva ZEISS 40/0,65. Campos microscópicos de intensa confluência de células, onde a individualização das mesmas era dificultada, foram descartados.

Para cada clone celular o IM foi expresso de duas formas: como a porcentagens totais de figuras de mitose (Tabela 1) e segundo sua distribuição em diferentes fases da mitose (Tabela 2).

III.3.2) Índice de células binucleadas, multinucleadas e gigantes.

Foram contadas todas as células bi- e multinucleadas e gigantes, em relação às mononucleares, em campos microscópicos semisucessivos, com 0,25 mm² de área (grade de integração 100/25 da Zeiss) de maneira a percorrer toda a lamínula. As condições de análise foram: ocular CPL W 10x/18 e objetiva ZEISS

40/0,65. Campos microscópicos de intensa confluência de células, onde a individualização das mesmas era dificultada, foram descartados.

III.3.3) Índice de micronucleação.

A identificação e a análise de células micronucleadas seguiram os seguintes critérios, como proposto por TOEBERT et al. (1992) e FENECH (1993). Os micronúcleos foram definidos como estruturas individualizadas, ou seja, não ligadas ao núcleo principal via ponte nucleocitoplasmática, idênticas ao núcleo principal com relação a intensidade de coloração, textura e plano focal, entretanto, menores e com um diâmetro de até 1/3 do núcleo principal. Células com núcleos em degeneração ou apoptóticos não foram incluídas na avaliação. As condições de análise foram: ocular WF 10x (OLIMPUS) e objetiva de imersão ZEISS 100/1,25.

III.3.4) Índice de células apoptóticas.

A identificação de células apoptóticas foi feita utilizando-se uma técnica variante de concentração crítica de eletrólitos (CEC), anteriormente proposta para distinguir RNA de DNA (MELLO et al., 1993). A cromatina de núcleos em apoptose, em diferentes estados de condensação e distribuição, foi observada corar-se em verde, da mesma forma que o DNA cromossômico de células MCF-10F em divisão, enquanto, a maior parte dos corpos apoptóticos coraram-se em violeta (VIDAL et al., 1996a), desta forma, facilitando a identificação do fenótipo apoptótico. Sua frequência e localização nos diferentes clones de células MCF-10F foi estabelecida contando-se todas as células em apoptose, em relação às células não apoptóticas, em campos microscópicos semisucessivos, com 0,25 mm² de área (grade de integração 100/25 da Zeiss) de maneira a percorrer toda a lamínula. As condições de análise foram: ocular CPL W 10x/18 e objetiva ZEISS 40/0,65.

Campos microscópicos de intensa confluência de células, onde a individualização das mesmas era dificultada, foram descartados.

III.4) *Morfometria nuclear e nucleolar.*

Parâmetros nucleares e nucleolares foram avaliados por análise de imagem. Medidas de área, perímetro e fator forma nuclear e nucleolares foram feitas a partir da captura de imagem de negativos, utilizando o conjunto de lentes CANON TV ZOOM LENS V6x16 (16-100mm) e CANON 58mm close-up LENS 240 do sistema MACRO STAND-LUZEX-F-NIREKO-JAPAN. A seguir, as imagens foram digitalizadas, processadas e analisadas no analisador de imagem LUZEX-F- NIREKO-JAPAN. Estes parâmetros foram avaliados em 100 núcleos por clone celular. O fator forma foi determinado da seguinte forma:

$$\text{Fator forma} = \frac{P^2}{4\pi \times A} \times 100, \text{ onde } P = \text{perímetro e } A = \text{área};$$

OBS: Quando os valores do fator forma se aproximam de 100, os núcleos e nucléolos tendem a assumir uma forma mais circular e quando os valores se afastam de 100, estes tendem a assumir formas mais irregulares.

O número de nucléolos/núcleo foi também determinado.

III.5) *Documentação fotográfica.*

Esta foi realizada em fotomicroscópio Zeiss.

III.6) *Análise estatística.*

Para a comparação dos parâmetros calculados pela porcentagem de sua ocorrência, entre os diferentes clones de células MCF-10F, transformados ou não, tais como o índice mitótico e de apoptose, porcentagem de células

micronucleadas, binucleadas, multinucleadas e gigantes foi utilizando o teste estatístico de Goodman para contrastes entre proporções binomiais (GOODMAN, 1964), adotando-se o valor de $p < 0,05$ como nível de significância. Para a comparação dos parâmetros morfométricos (área, perímetro e fator forma nucleares e nucleolares, além do número de nucléolos) entre os diferentes clones de células MCF-10F, transformados ou não, foi feita, primeiramente, uma análise exploratória dos dados de cada variável, através de histogramas de frequência e gráficos (box-plot), para se verificar o tipo de distribuição de dados, por exemplo: normalidade, homogeneidade, presença de dados aberrantes, etc. Posteriormente, foi realizado uma Análise de Variância para Experimentos Inteiramente Casualizados (ANOVA) para dados transformados e/ou aplicado o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando como nível de significância $p < 0,05$. Comparações múltiplas foram verificadas utilizando-se os critérios de LSD (Least Significant Difference) no caso da ANOVA e Bonferroni no caso do teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (ZAR, 1984).

IV- Resultados.

IV.1) *Generalidades quanto a forma, tamanho e número de núcleos e nucléolos e textura cromatínica.*

Em geral, tanto nas células controle como nos diversos clones celulares experimentais considerados nas preparações submetidas ao método de banda C de SUMNER (1972) foram encontrados núcleos de forma circular e elipsóide, predominando a última (Figs. 3-A, E-G, I; 4B, C; 5A, C, D, F; 6A, B, D-G; 7A, B, G). Núcleos apresentando forma irregular foram também observados em todas as preparações, inclusive de células MCF-10F controle (Figs 3B, H, I; 5D, G; 6C, H-J; 7D-G). Todavia, nas células dos clones transformados pela exposição ao benzo[a]pireno, e em especial em BP1-Tras se observa um pleomorfismo nuclear mais acentuado (Figs. 3G, I; 5D; 6C, H, I; 7F, G).

Os núcleos das células controle e experimentais mostraram, também, uma nítida variação de tamanhos (Figs. 3F, G; 4C; 5A, G; 6G, H, I; 7 F, G). Em todos os casos analisados, se observaram, predominantemente células mononucleadas, poucas células binucleadas (Figs. 7B, F) e raras células multinucleadas e gigantes (Figs. 5G; 6H, I; 7F, G).

Vários tipos de alterações que comprometem a integridade nuclear e, conseqüentemente, celular foram observados: cariólise (dissolução nuclear) (Fig. 6I), cariorrexis (desintegração nuclear) (Figs. 6H, J), e picnose (Fig. 7F) e, com aparente predominância no clone BP1-Tras.

Micronúcleos foram observados em todos os preparados (Figs. 3B, C; 5B, D; 6 H, J; 7D, E). Anomalias mitóticas das mais variadas formas (Figs. 3D; 4D; 5E; 7C) foram observadas nas células controle e nos seus clones transformados.

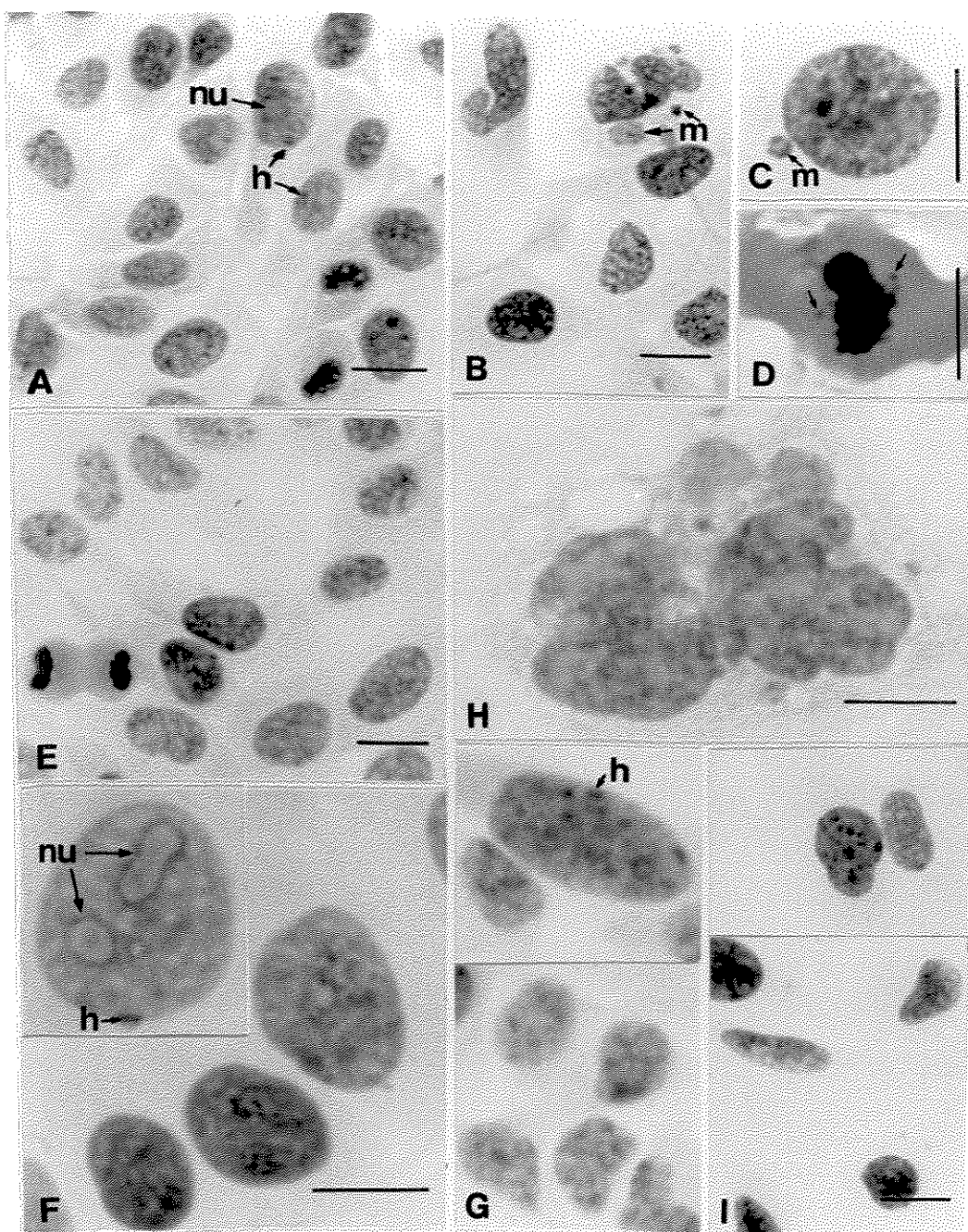


FIG.3- Forma e textura de núcleos interfásicos e observação de mitoses de células MCF-10F (A-D e H, controle; E-G e I, clone BP1) submetidas ao método de banda C de Sumner (modificado). Contracoloração com fast green a pH 2,7. **h**, corpos heterocromáticos; **m**, micronúcleos; **nu**, nucléolos; **seta**, cromossomos fora da placa equatorial. Barra menor = 10µm e barra maior = 20µm.

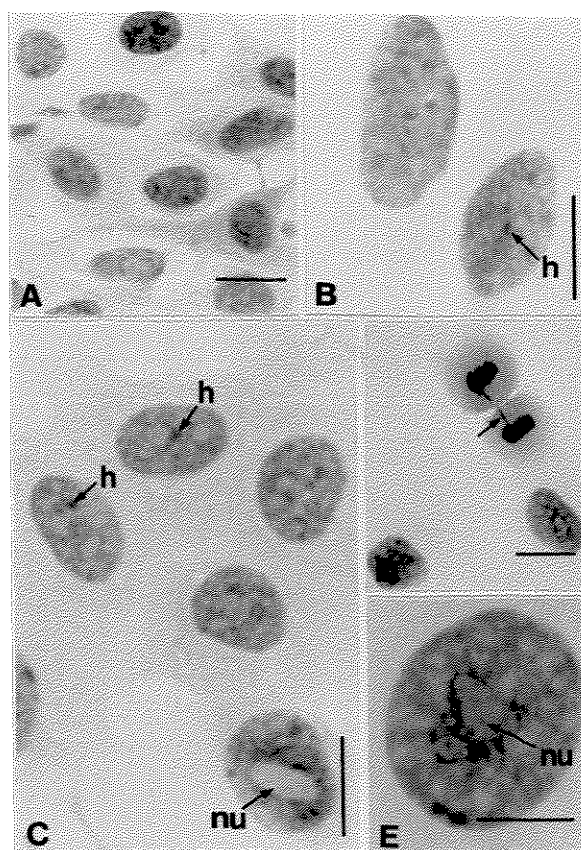


FIG.4- Forma e textura de núcleos interfásicos e observação de mitose de células MCF - 10F (A-C, controle; D e E, clone BP1) submetidas ao método de banda C de Sumner (modificado). Contracoloração com fast green a pH 2,7. **h**, corpos heterocromáticos; **nu**, nucléolos ; **seta**, ponte cromossômica. Barra menor = 10 μ m e barra maior = 20 μ m.

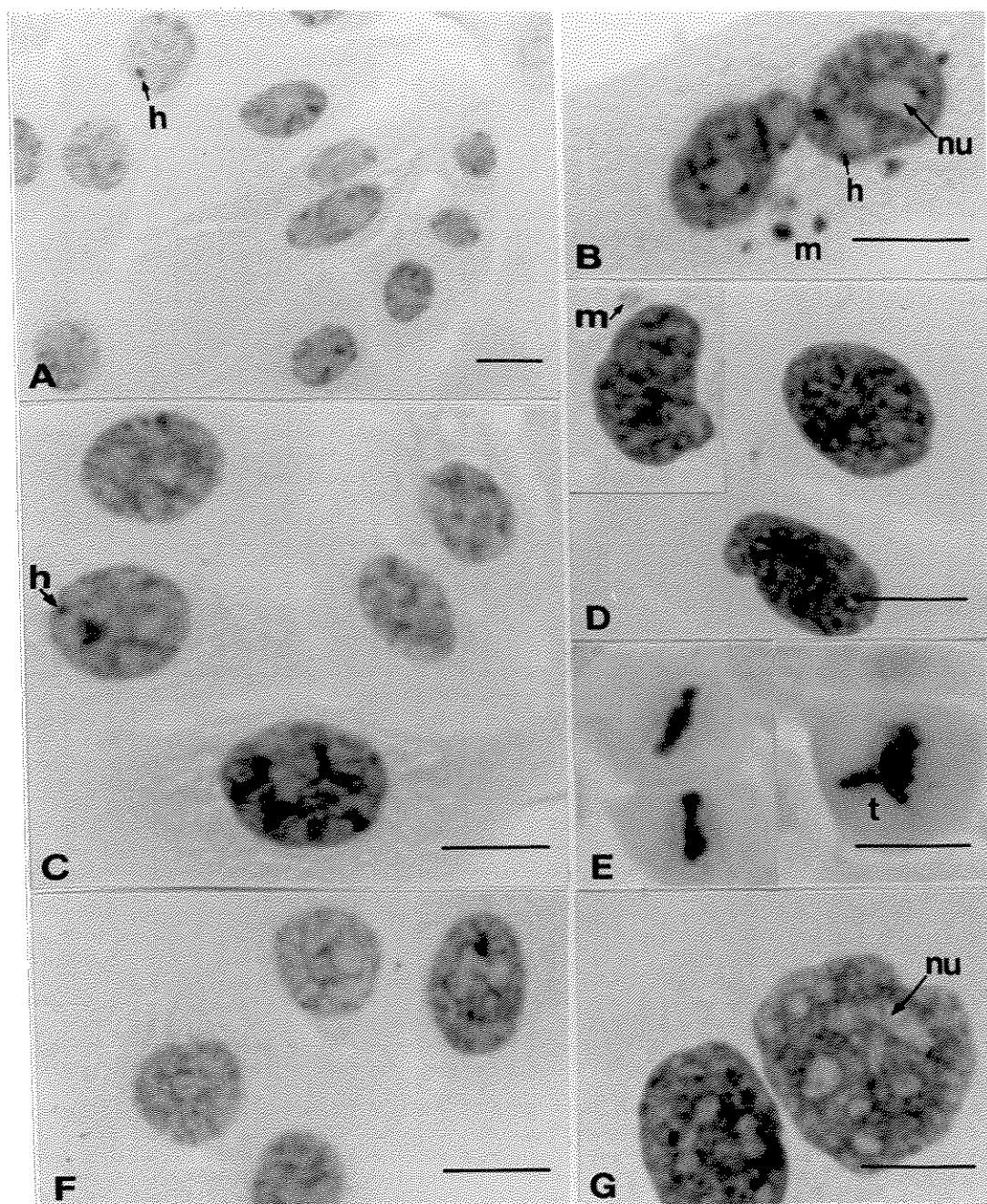


Fig. 5- Forma e textura de núcleos interfásicos e observação de mitoses em células MCF-10F, clone BP1- E (A-G) submetidas ao método de banda C de Sumner (modificado). Contracoloração com fast green a pH 2,7. **h**, corpos heterocromáticos; **m**, micronúcleos; **nu**, nucléolos; **t**, fuso tripolar. Barra menor = 10 μ m e barra maior = 20 μ m.

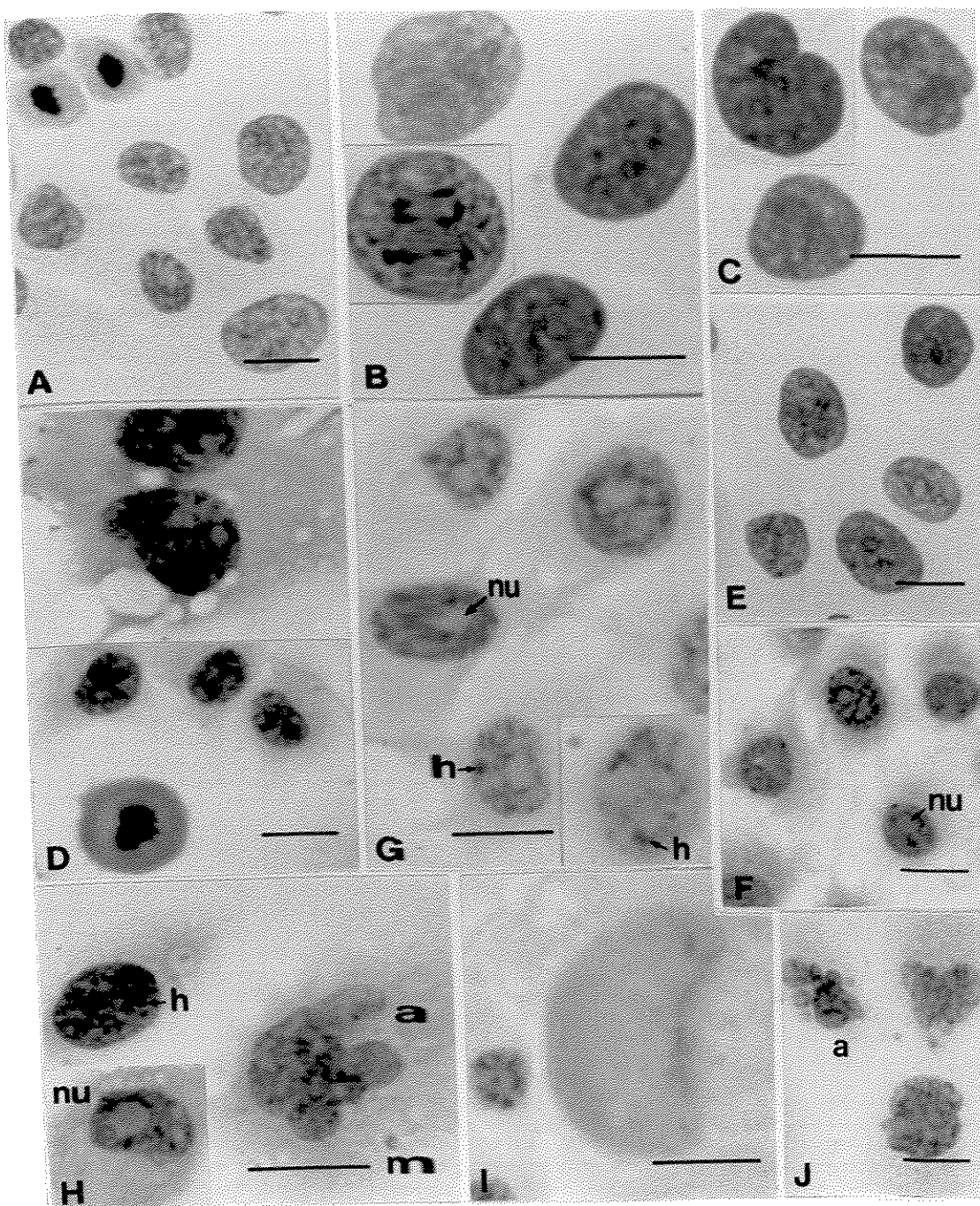


Fig. 6- Forma e textura de núcleos **interfásicos** e observação de mitoses em células MCF-10F (A-C, E, clone BP 1-E-1; D, F-J, clone BP1-Tras) submetidas ao método de banda C de Sumner (modificado). Contracoloração com fast green a pH 2,7. **a**, apoptose; **h**, corpos heterocromáticos; **m**, micronúcleos; **nu**, nucléolos. Barra menor = 10µm e barra maior = 20µm.

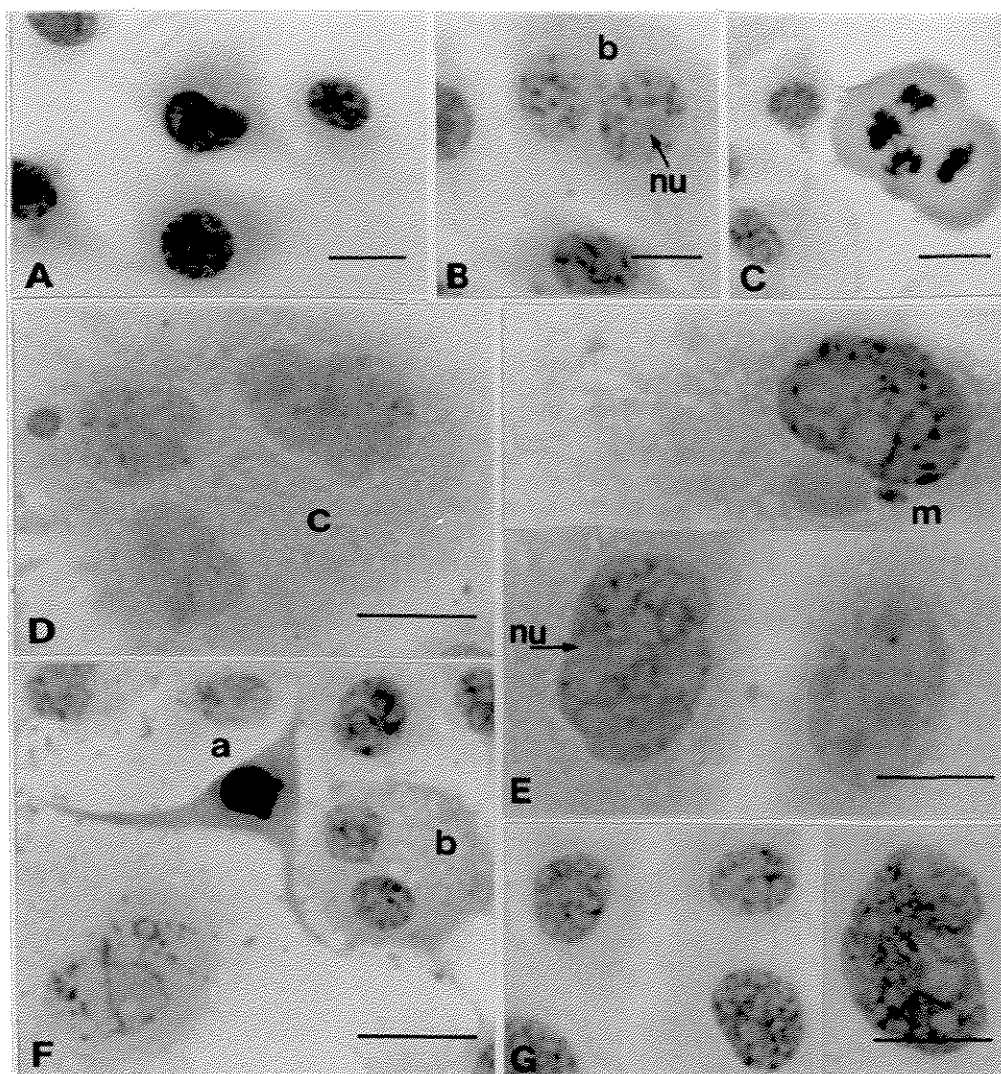


Fig.7- Forma, tamanho e textura de núcleos interfásicos e observação de mitose em células MCF - 10F (clone BP1-Tras) submetidas ao método de banda C de Summer (modificado). Contracoloração com fast green a pH 2,7. **a**, apoptose; **b**, célula binucleada; **c**, célula multinucleada; **nu**, nucléolos. Barra menor =10 μ m e barra maior = 20 μ m.

Uma grande diversidade em relação a forma, tamanho e número de nucléolos, corados com fast green, foi observada nos núcleos das células controle e de seus clones (Figs. 3A, E, F; 4C, E; 5B, G; 6D, F, G, H, J; 7A, B, D-G). Dada à frequente remoção de RNA com a metodologia de banda C de SUMNER (1972), os nucléolos apareceram corados apenas com o fast green ou em imagem negativa.

A textura cromatínica observada mostrou-se variada em todos os casos, às vezes, sendo evidentes pontos de cromatina condensada atribuíveis à heterocromatina constitutiva, a qual, através do método de banda C de SUMNER (1972), costuma se apresentar intensamente corada (Figs. 3A, F, G; 4B, C; 5B, C, F; 6G). Os fenótipos nucleares mais frequentes definidos pela textura cromatínica observada visualmente foram caracterizados nessas preparações por exibirem: 1) áreas cromatínicas mais intensamente coradas, de distribuição densa homogênea (Figs. 3B, F, I; 4E; 5D; 6B, C, E; 7A); 2) áreas cromatínicas palidamente coradas segundo uma trama filamentosa, mostrando poucos grânulos mais intensamente corados (Figs. 3A, E, F; 4A-C; 5A, C, F; 6A, B, G; 7D-F), e 3) áreas cromatínicas com abundantes grânulos grossos de distribuição irregular (Figs. 3B, G, I; 4A; 5B-D, G; 6B-D, H; 7A, G). As diferenças em textura podem estar relacionadas às fases do ciclo celular e acentuadas pelo próprio processo de transformação/tumorigênese. A simples observação visual qualitativa não permite maiores conclusões quanto a este item.

IV. 2) Índice mitótico, bi e multinucleação, micronúcleos e células gigantes e apoptóticas.

As células das linhagens BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras, que expressam o fenótipo tumorigênico em camundongos atímicos SCID, apresentam um número maior de células em divisão, como avaliado pelo índice mitótico, quando

comparados as células controles MCF-10F e transformadas BP1 (TABELA 1). Entretanto, quando se avalia a distribuição dessas células em divisão em diferentes fases do ciclo celular, não se observa diferença significativa entre as linhagem de células epiteliais mamárias controles ou transformadas (TABELA 2).

A porcentagem de células binucleadas e gigantes nas diferentes linhagens celulares controles ou transformadas não se mostrou alterada, contudo, quando se avalia as porcentagens de células multinucleadas e micronucleadas, estas foram significativamente maior nas células da linhagem BP1-Tras (TABELA 1 e 3). Ainda com relação a linhagem de células BP1-Tras, nestas a porcentagem de células apoptóticas foi significativamente maior em relação as demais linhagens celulares (TABELAS 3). Com relação às células micronucleadas, as que apresentavam dois ou mais micronúcleos foram, também, predominantemente observadas ocorrer na linhagem de celular BP1-Tras .

IV. 3) A basofilia em núcleos interfásicos, em células mitóticas e em células apoptóticas.

A metacromasia devido ao rRNA foi bem caracterizada no(s) nucléolo(s) de núcleos interfásicos (Figs. 8D,F e H; 9D-F; 10D), e em material em relocação durante a mitose, ou ainda, na forma de corpos pré-nucleolares em núcleos de células em citocinese (Figs. 8A-H; 9D-F; 10A-H; 11A e B), ao contrário do DNA na cromatina de núcleos interfásicos ou nos cromossomos de núcleos em divisão, que por apresentar valores de CEC (concentração crítica de eletrólitos) menores, apresenta-se ortocromático, após a coloração com uma técnica variante de CEC para o DNA (MELLO et al., 1993).

TABELA 1- Índice mitótico e apoptótico em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas e não transformadas.

CÉLULAS	Nº DE CÉLULAS ANALISADAS	CÉLULAS EM DIVISÃO (%)	Nº DE CÉLULAS ANALISADAS	CÉLULAS APOPTÓTICAS (%)
MCF-10F	2577	2,32 ^{a*}	2503	0,56 ^a
BP1	2570	3,15 ^a	2590	0,42 ^a
BP1-E	2537	4,37 ^b	2521	0,20 ^a
BP1-E1	2520	4,05 ^b	2505	0,28 ^a
BP1- <u>Tras</u>	2519	3,93 ^b	2531	2,21 ^b

* Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (teste de Goodman para contrastes entre proporções binomiais).

TABELA 2- Distribuição de núcleos em diferentes fases do ciclo celular em diferentes clones de células epiteliais mamárias, MCF-10F, transformadas e não transformadas.

CÉLULAS	Nº DE CÉLULAS EM DIVISÃO	CÉLULAS EM PRÓFASE (%)	CÉLULAS EM METÁFASE (%)	CÉLULAS EM ANÁFASE (%)	CÉLULAS EM TELÓFASE (%)	CÉLULAS EM CITOCINÉSE (%)
MCF-10F	60	5,0	46,7	6,7	13,3	28,3
BP1	80	7,5	51,2	11,3	7,5	22,5
BP1-E	111	8,1	45,9	4,5	15,3	26,1
BP1-E1	102	8,8	53,9	12,7	9,8	14,7
BP1- <u>Tras</u>	99	10,1	46,5	12,1	9,1	22,2
Análise Estatística		NS	NS	NS	NS	NS

NS = Diferenças entre os grupos não significativa para $p < 0,05$ (teste de Goodman para contrastes entre proporções binomiais).

TABELA 3- Porcentagem de células micronucleadas, bi- e multinucleares e gigantes em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas e não transformadas.

CÉLULAS	Nº DE CÉLULAS ANALISADAS	CÉLULAS BINUCLEADAS (%)	CÉLULAS MULTINUCLEADAS (%)	CÉLULAS GIGANTES (%)	CÉLULAS MICRONUCLEADAS (%)*
MCF-10F	2577	2,09 ^{a**}	0,23 ^a	0,12 ^a	1,18 ^a
BP1	2570	1,56 ^a	0,35 ^a	0,16 ^a	1,25 ^a
BP1-E	2537	1,30 ^a	0,32 ^a	0,35 ^a	1,43 ^a
BP1-E1	2520	1,23 ^a	0,28 ^a	0,39 ^a	1,39 ^a
BP1- <u>Tras</u>	2519	2,18 ^a	1,39 ^b	0,32 ^a	2,97 ^b

* Foram analisadas 2500 células por linhagem celular; ** Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (teste de Goodman para contrastes entre proporções binomiais).

Os diferentes padrões de relocação de metacromasia de rRNA durante a mitose em células da linhagem MCF-10A, como descrito por MELLO (1995) mostraram uma resposta idêntica quando avaliados em células controles (MCF-10F) e naquelas transformadas por benzo[a]pireno (BP1, BP1-E, BP1-E1) e pela transfecção com oncogene c-Ha-ras (BP1- Tras).

De um modo geral, a intensidade de metacromasia de rRNA em relocação durante a mitose nas células MCF-10F controles ou transformadas não mostrou diferenças marcantes. Com relação à frequência de corpos parecidos com nucléolos (nucleolus-like bodies), caracteristicamente observados próximos a placa cromossômica na metáfase ou próximos ao fuso em fases mitóticas subsequentes, se mostraram pouco frequentes nas células da linhagem MCF-10F em divisão, e, foram quase que escassamente encontrados nas células MCF-10F transformadas pelo benzo[a]pireno e transfectadas pelo oncogene c-Ha-ras (ver figuras 8-11).

Os cromossomos em final de prófase e em metáfase de células das linhagens MCF-10F (Figs. 8A-D), BP1 (Figs. 9D e E), BP1-E (Fig. 10A e B), BP1-E1 (Fig. 10F) e BP1-Tras (Fig. 11A), aparecem circundados de rRNA que se torna conspícuo sob a forma de pequenos pontos ou alguns corpos maiores e mais alongados com distribuição simétrica. Em algumas células da linhagem MCF-10F, pode-se observar a presença de um corpo parecido com nucléolo (nucleolus-like body), na periferia da massa cromossômica em final de prófase ou início de metáfase (Figs. 8A-D). Na anáfase, a reação de metacromasia de rRNA altera-se das bordas para as regiões entre as duas séries de cromossomos em migração, continuando até a telófase onde ocorre uma reestruturação do(s) nucléolo(s), como observado em células das linhagens MCF-10F (Figs. 8E, F e H), BP1, BP1-E (Fig. 10C e D), BP1-E1 (Fig. 10G) e BP1-Tras . A presença de um corpo parecido com

nucléolo (nucleolus-like body), próximo a um dos pólos do fuso mitótico, é observado ocorrer em algumas das células da linhagem MCF-10F (Figs. 8E, F e H), bem como, a presença de corpos pré-nucleolares em núcleos de células em citocinese (Figs. 8G, 10H e 11B), estes últimos observados em células das diferentes linhagens celulares estudadas.

A presença de corpos apoptóticos e de condensação cromatínica característica de células em apoptose puderam ser, também, observadas nos preparados submetidos à técnica variante de CEC para o DNA (MELLO et al., 1993, VIDAL et al., 1996a) (Figs. 9G; 11C-F). Nas figuras apoptóticas a metacromasia devida a RNA foi bem caracterizada em nucléolos com diferentes estados de integridade e no interior dos corpos apoptóticos.

IV. 4) *Resposta AgNOR + interfásica e mitótica.*

A resposta à reação de prata foi identificada como pontos ou agregados AgNOR + sobre os nucléolos na intérfase, ou ainda, como pontos AgNOR + sobre alguns cromossomos durante a divisão mitótica de células MCF-10F, transformadas ou não (Figs 11G e H). A resposta AgNOR + mitótica, portanto, não foi coincidente com a resposta de relocação de metacromasia de rRNA durante a divisão mitótica de células das linhagens MCF-10F, transformadas ou não

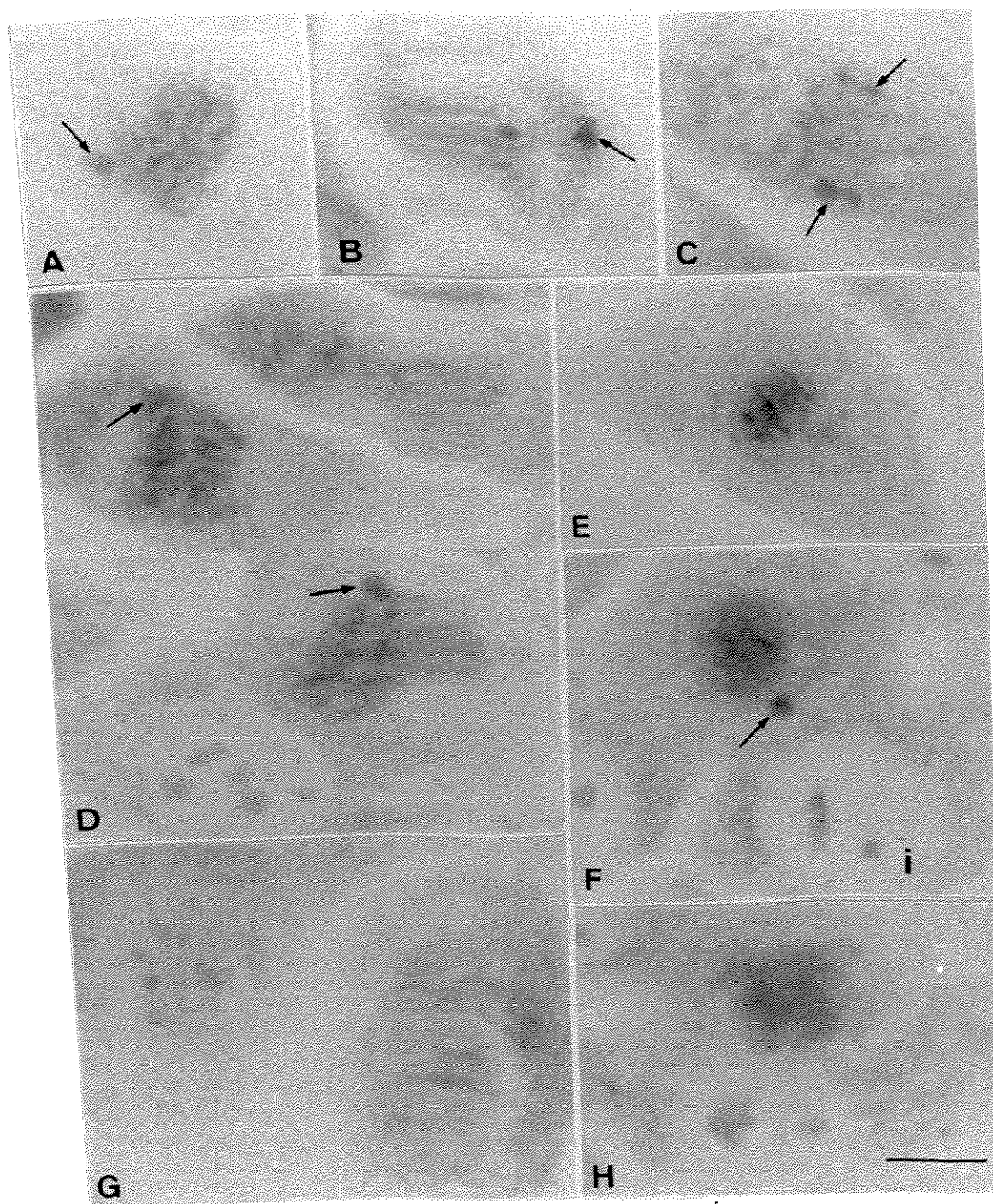


Fig. 8-Relocação de metacromasia de RNA em células MCF - 10F (controles) durante a pró-metáfase/anáfase (A - F e H) e citocinese (G); i= interfase; setas, corpos semelhantes a nucléolos (nucleolus-like bodies). Barra=10 μ m.

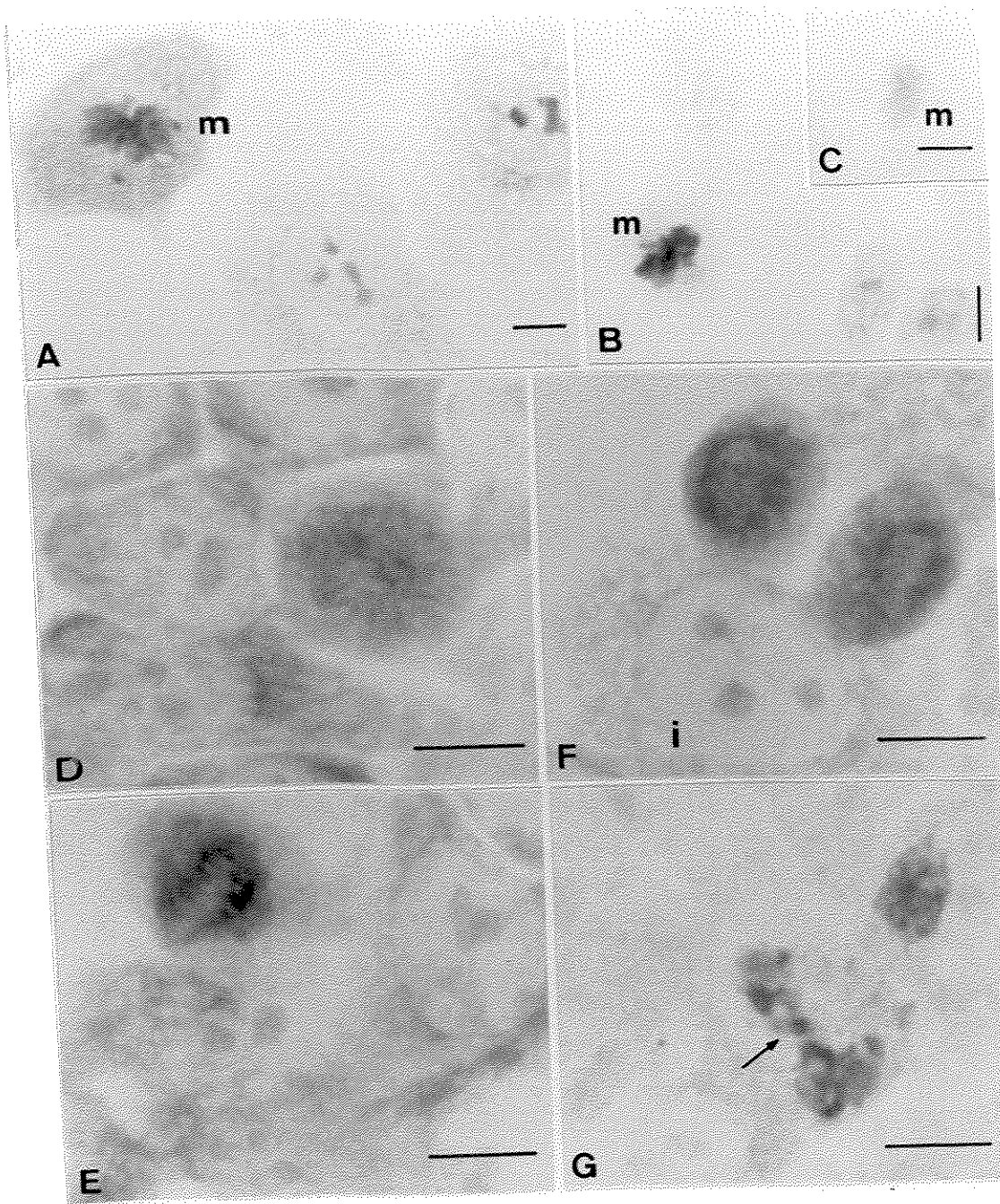


Fig. 9- Relocação de metacromasia de RNA em células MCF- 10F (clone BP1) durante a pró-metáfase, metáfase e citocinese(D-F). **A**, células coradas com AT pH4,0 ; **B**, células coradas com AT pH 4,0 após RNase; **C**, célula em metáfase corada com AT pH 4,0 + $MgCl_2$ à 0,05M, após tratamento com RNase; **seta**, apoptose; **i**= intérfase; **m**, metáfase; Barra = 10 μ m.

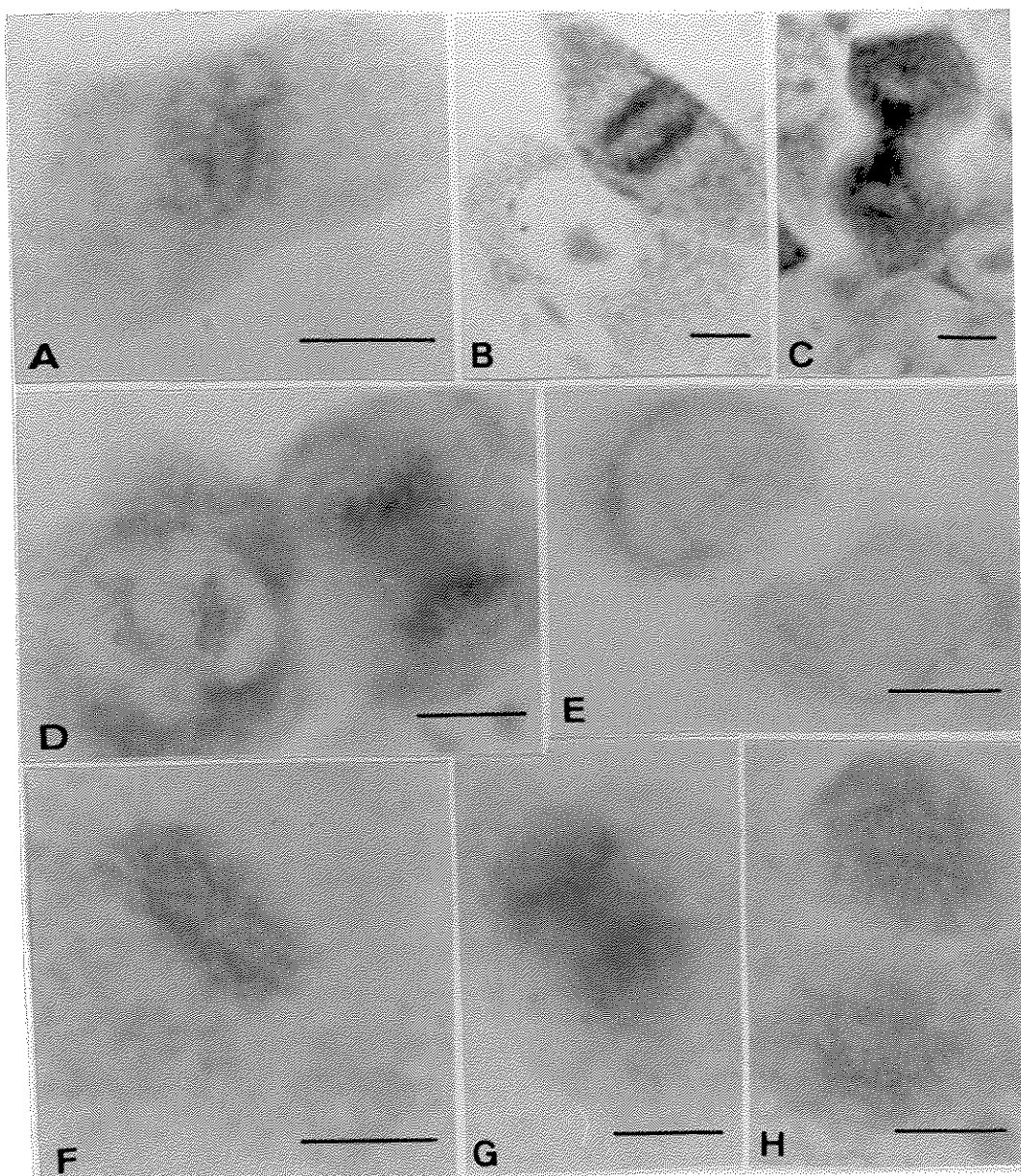


Fig. 10- Relocação de metacromasia de RNA em células MCF-10F (clone BP1-E) durante a pró - metáfase/citocinese (A - E) e de células MCF-10F (clone BP1-E1) durante a metáfase, anáfase e citocinese (F - H). Barra = 10 μ m.

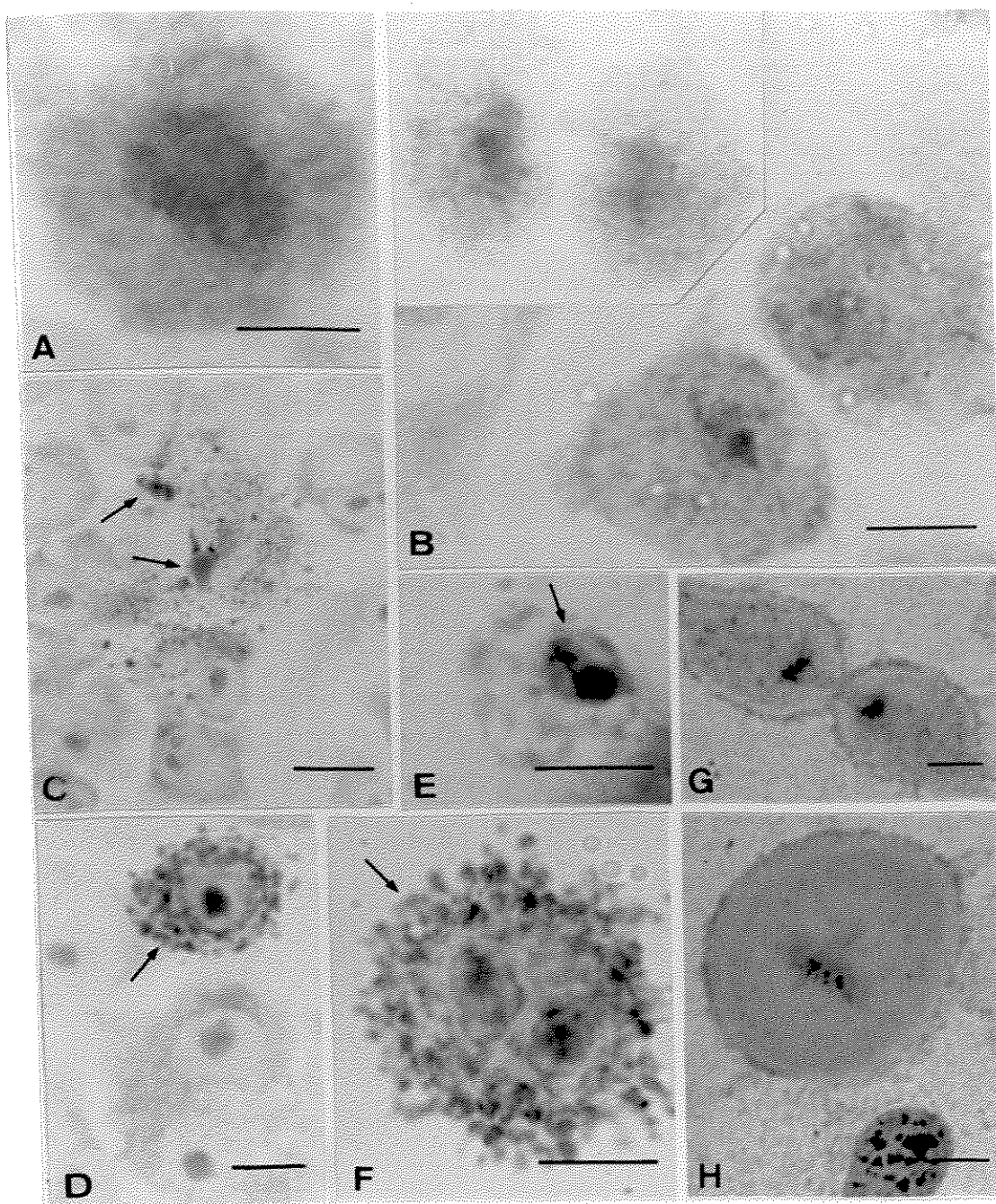


Fig. 11- Relocação de metacromasia de RNA em células MCF-10F (clone BP1-Tras), durante a metáfase, telófase e citocinese (A e B) e resposta ao método de AgNOR (G e H). setas, células apoptóticas. Barra = 10μm.

IV. 5) *Morfometria nuclear e nucleolar determinada por análise de imagem.*

IV. 5.1) Análise exploratória e testes estatísticos de dados morfométricos nucleares e nucleolares.

A análise descritiva dos dados foi feita utilizando-se estatística descritiva, histogramas de frequência e gráficos “box-plot”. Frente à grande variabilidade de resposta para a maioria das variáveis houve a necessidade de se processar a transformação dos dados para se aplicar o teste estatístico paramétrico de ANOVA, que pressupõe homogeneidade de variâncias, distribuição normal e independência das observações. Nos casos em que mesmo utilizando-se de dados transformados não se obteve homogeneidade de variância, ou ainda, como parâmetro de comparações, foi aplicado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, que pressupõe somente a independência das observações e é um “Rank” teste..

De uma forma geral, a análise estatística utilizando os dois testes estatísticos, paramétrico de ANOVA e não-paramétrico de Kuskal-Wallis, resultou em conclusões idênticas, com exceção de algumas decisões quanto a diferenças entre clones para os seguintes parâmetros: área, perímetro e número de nucléolos (Tabelas 6, 9 e 12). Sempre que possível as decisões estatísticas foram tomadas das comparações com o teste de ANOVA, assumindo que este trabalha com pressuposições de homogeneidade de variâncias, normalidade e independência das observações.

IV.5.2- Inferência estatística

A Tabela 4 apresenta os valores de média (X) e desvio padrão (SD) de cada uma das variáveis morfométricas avaliadas neste trabalho. De uma forma

TABELA 4- Média ($\bar{X}$) e desvio-padrão (SD) de parâmetros morfométricos nucleares e nucleolares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF - 10F, transformadas e não transformadas (n=100).

CÉLULAS	ÁREA NUCLEAR (μm^2)		ÁREA NUCLEOLAR (μm^2)		ÁREA NUCLEAR / ÁREA NUCLEOLAR		PERÍMETRO NUCLEAR (μm)		PERÍMETRO NUCLEOLAR (μm)		FATOR FORMA NUCLEAR		FATOR FORMA NUCLEOLAR		Nº DE NUCLEÓLOS	
	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD	$\bar{X}$	SD
MCF-10F	134,97	34,13	11,73	3,25	0,09	0,02	44,96	7,58	23,61	6,58	114,66	4,31	159,27	51,86	2,73	1,09
BP1	111,32	30,56	12,50	3,49	0,11	0,03	40,44	7,77	23,55	6,73	117,61	6,51	137,38	32,88	2,68	1,21
BP1-E	124,42	36,47	18,29	6,36	0,15	0,04	42,21	5,81	27,47	9,48	116,30	4,88	171,55	58,08	2,25	1,17
BP1-E1	123,15	31,59	16,15	4,46	0,14	0,03	42,17	5,46	27,26	5,72	116,18	5,68	142,02	24,45	2,48	0,93
BP1- <u>Tras</u>	144,71	56,41	24,92	8,44	0,18	0,03	44,39	8,15	23,84	6,64	113,25	4,25	127,29	16,73	1,54	0,69

onde: $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

geral, a análise dos dados morfométricos de cada variável mostra que estes nem sempre apresentam uma distribuição normal e homogênea, sendo evidentes a presença de dados aberrantes como se pode observar através dos histogramas e gráficos “ box-plot ” (Figuras 12 a 26), indicando que a variância das medidas não é constante para a maioria das variáveis.

O tamanho dos núcleos das células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, diminuiu com a transformação induzida pela exposição ao benzo[a]pireno (clones BP1, BP1-E e BP1-E1) (Tabela 5), como, também, se pode observar nos histogramas, pela frequência maior de valores de área nuclear em classes entre 50 e 150 μm^2 (Fig.12), ou através da distribuição das médias e variâncias dos dados de área nuclear no gráfico “box-plot” (Fig. 13). A presença de dados discrepantes foi mais marcante nos clones tumorigênicos quando comparado com as outras linhagens celulares (Figs. 13).

Com a transfecção do oncogene c-Ha-ras ao DNA das células do clone BP1, transformadas quimicamente, entretanto, nota-se uma variação maior dos valores de área nuclear maior, e, embora se observe no histograma uma frequência elevada de valores de área nuclear em classes entre 50 e 150 μm^2 , como nos clones transformados, a presença de núcleos com valores de área maiores eleva a variância dos dados, como se pode observar no gráfico “box-plot” (Fig. 13), de tal forma que impossibilitou a aplicação do teste estatístico de ANOVA, mesmo utilizando-se de transformações homoscedásticas de dados. Pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não se tem evidências suficientes para afirmar que o tamanho dos núcleos das células do clone BP1-Tras difiram das células MCF-10F (controles). Entretanto, os valores das áreas nucleares das células MCF-10F são estatisticamente diferentes quando comparados com os valores

Tabela 5- Comparações de áreas nucleares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	134, 97	34,13	A ^{2,3}	A
BP1	111,32	30,56	C	C
BP1-E	124, 42	36,47	B	B
BP1-E1	123,15	31,59	B	B
BP1- <u>Tras</u>	144, 71	56,41	ND	AB

¹ Foram analisadas 100 células por clone celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ³ A → C ordem decrescente das médias dos dados avaliados por ANOVA; ND = Não determinado pela ausência de homogeneidade da variância dos dados; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

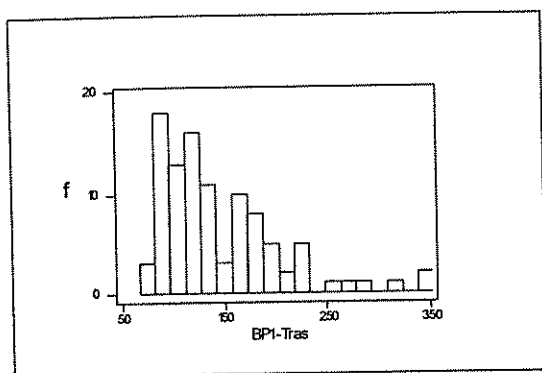
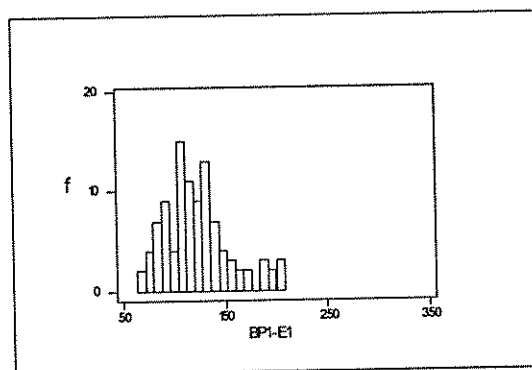
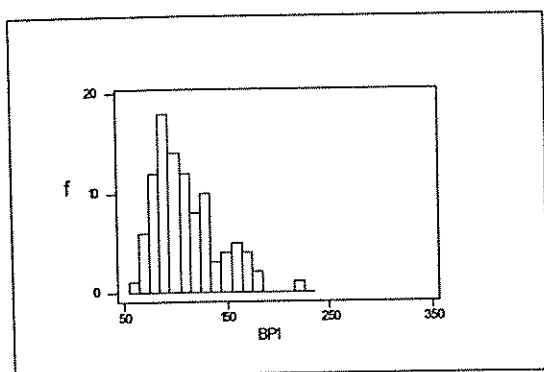
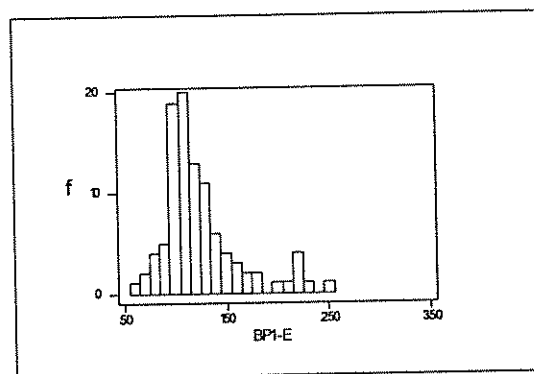
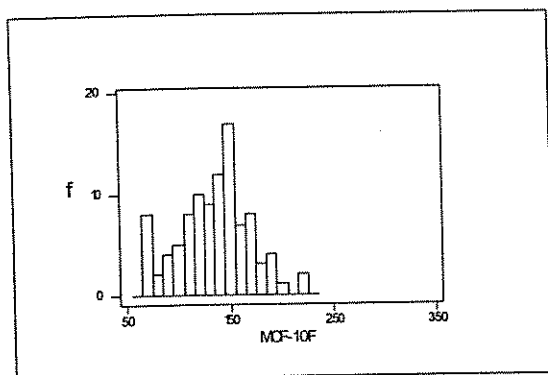


Figura 12- Histogramas de frequência (f) das áreas nucleares (μm^2) das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

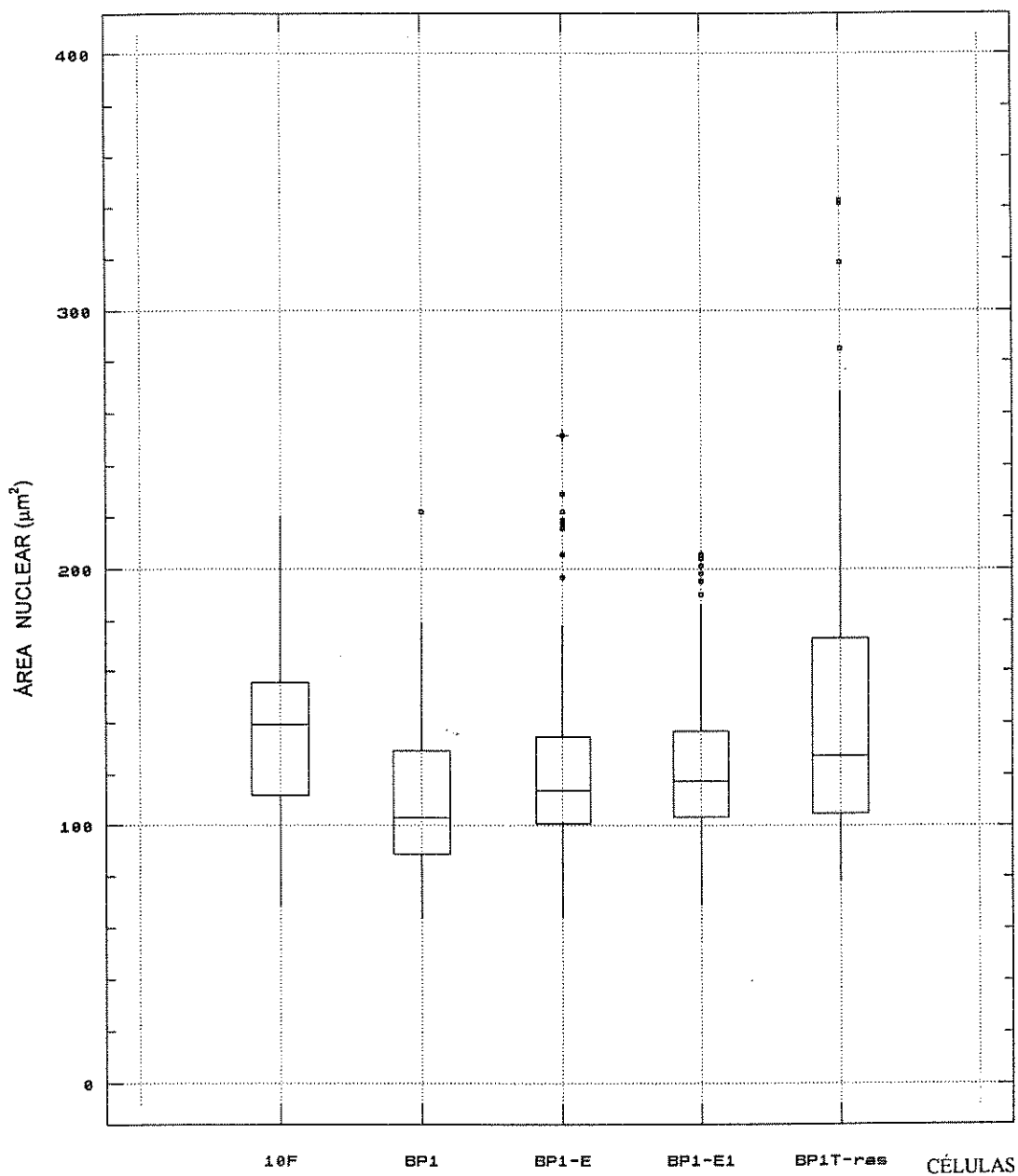


Figura 13 - Box-plot das áreas nucleares (μm^2) em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

nucleares das células dos clones transformado (BP1) e tumorigênicos (BP1-E e BP1-E1) (Tabela 5).

Por outro lado, o tamanho dos nucléolos aumentou com a progressão tumorigênica de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas com a exposição ao benzo[a]pireno e com a transfecção do oncogene c-Ha-ras (Tabela 6). Praticamente, todos os valores de área nucleolar se concentram nas classes entre 10 e 20 μm^2 nas células dos clones MCF-10F e BP1, enquanto, uma considerável parcela dos valores de área nucleolar se distribuem em classes acima de 20 μm^2 nos clones de células que expressam o fenótipo tumorigênico (clones BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras) (Fig. 14). A variância de valores de área nucleolar e a presença de dados discrepantes foi mais marcante nos clones de células BP1-E e BP1-Tras (Fig.15).

O aumento na área do(s) nucléolo(s) associado a alterações no tamanho dos núcleos nas células MCF-10F, transformadas quimicamente (clones BP1, BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras), resultaram em um aumento progressivo de valores da variável razão área nucleolar/área nuclear, sendo este mais marcante nos clones celulares tumorigênicos (Tabela 7). Basicamente, como se observa nos histogramas de frequência (Fig.16), na maioria dos casos o(s) nucléolo(s) ocupou (aram) menos ou ao redor de 10% da área nuclear nas células dos clones MCF-10F e BP1, respectivamente. Entretanto, nos clones tumorigênicos de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F (clones BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras), na maioria dos casos o(s) nucléolo(s) ocupou (aram) entre 10 a 20% da área nuclear (Fig. 16). Valores maiores de média e variância da razão área nucleolar/área nuclear foram característicos dos clones que apresentam comportamento tumorigênico (clones BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras), e dados discrepantes foram observados somente nas células transformadas pelo benzo[a]pireno (clones BP1-E, BP1-E1) (Fig.17).

Tabela 6- Comparações de áreas nucleolares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	11,73	3,25	A ^{2,3}	A
BP1	12,50	3,49	A	A
BP1-E	18,29	6,36	C	B
BP1-E1	16,15	4,46	B	B
BP1- <u>Tras</u>	24,92	8,44	D	C

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ³ A → D, ordem crescente das médias dos dados transformados (ln logarítmica) avaliados por ANOVA; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

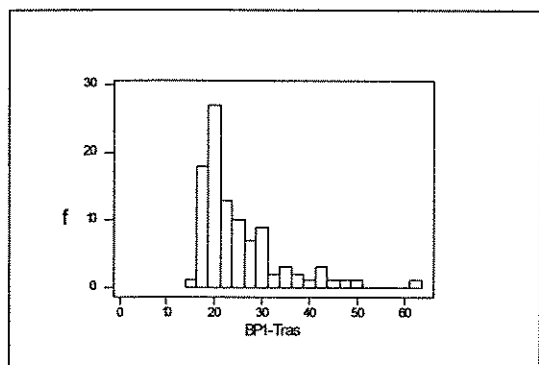
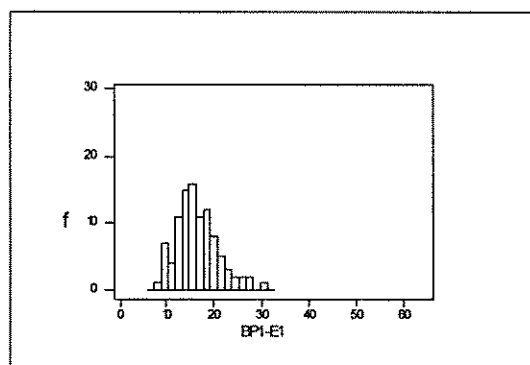
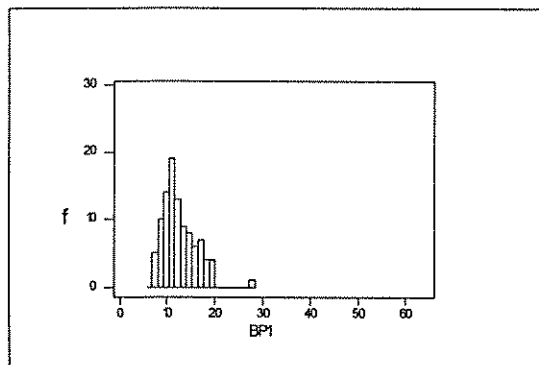
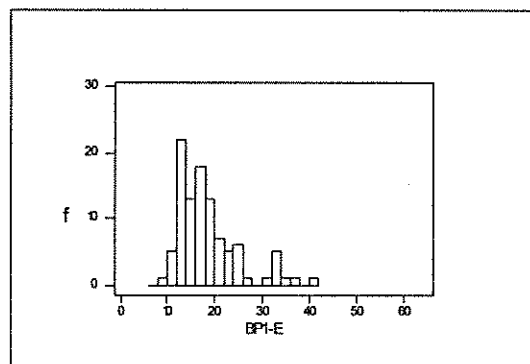
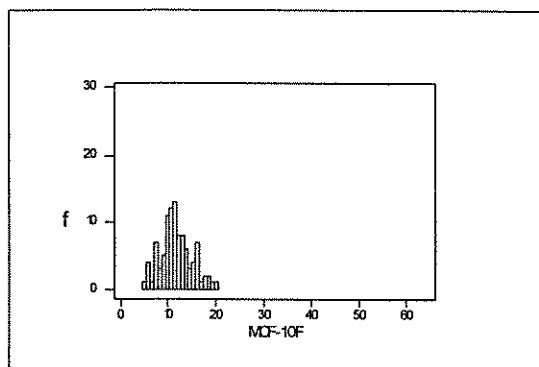


Figura 14- Histogramas de frequência (f) das áreas nucleolares (μm^2) das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

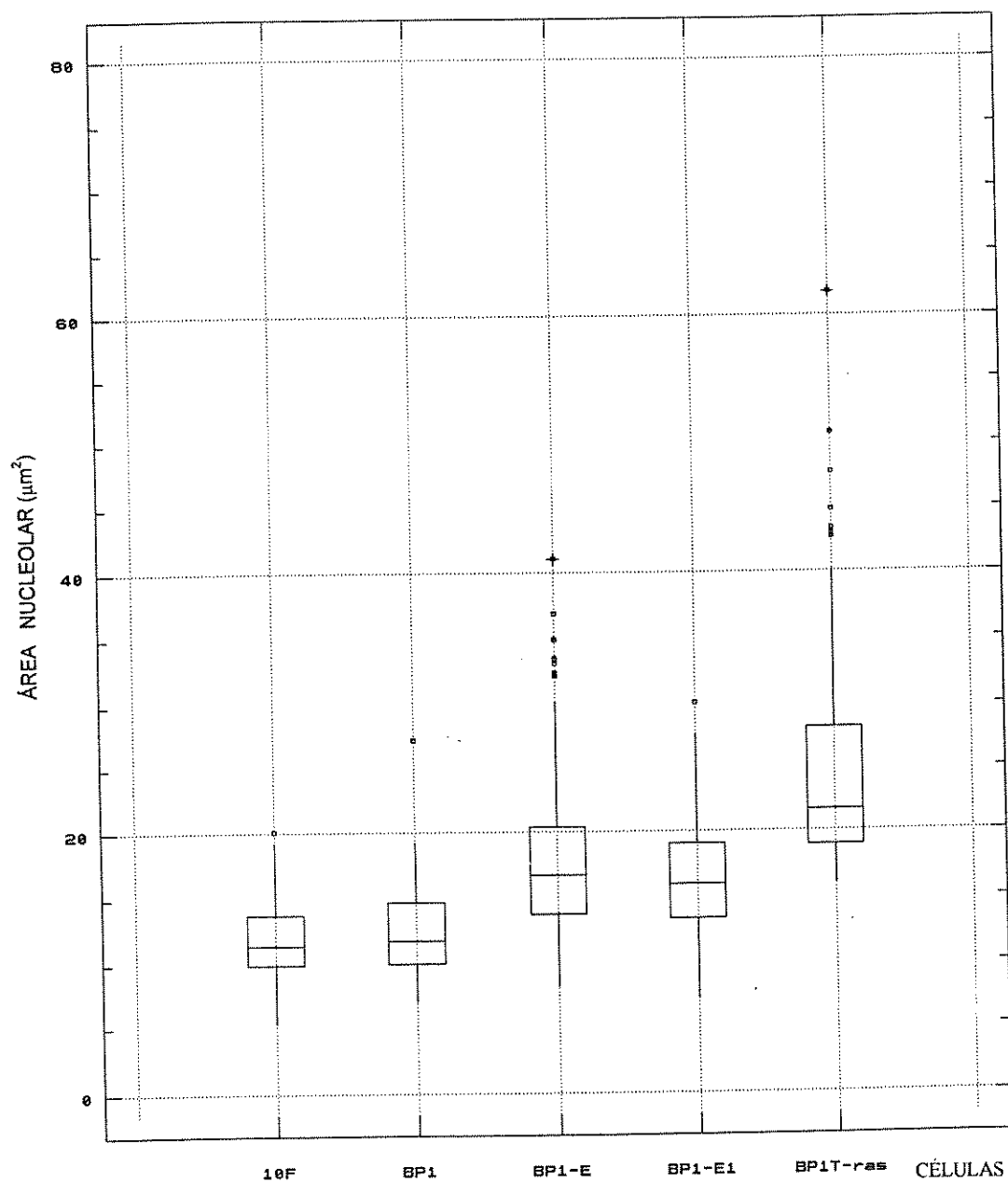


Figura 15 - Box-plot das áreas nucleolares (μm^2) em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

Tabela 7- Comparações dos valores da razão entre a área nuclear e a área nucleolar em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F , transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal - Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	0,09	0,02	A	A
BP1	0,11	0,03	B	B
BP1-E	0,15	0,04	C	C
BP1-E1	0,14	0,03	D	D
BP1- <u>Tras</u>	0,18	0,03	E	E

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ³ A → E, ordem crescente das médias dos dados transformados (ln logarítmica), avaliados por ANOVA; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

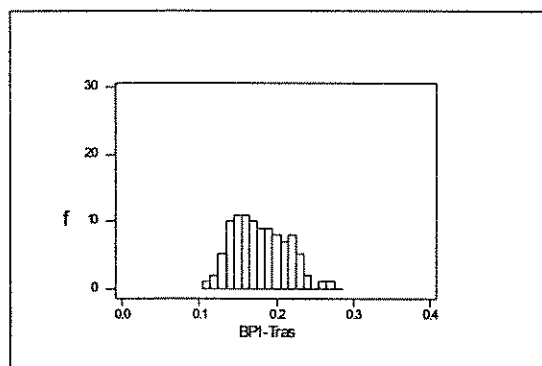
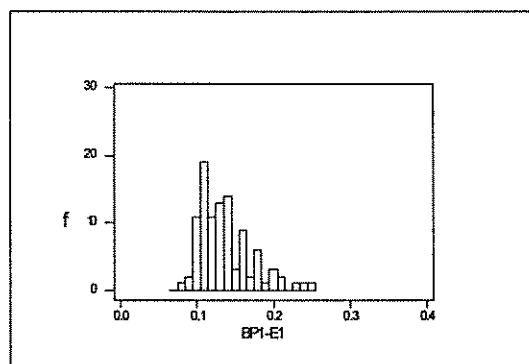
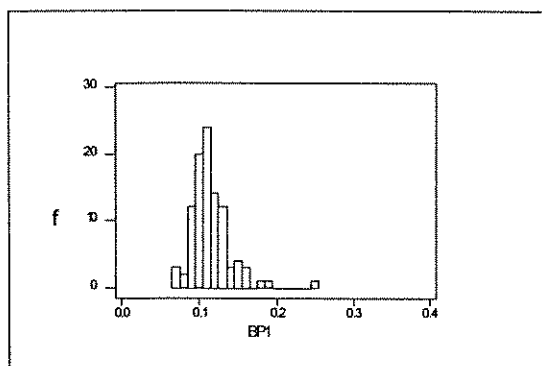
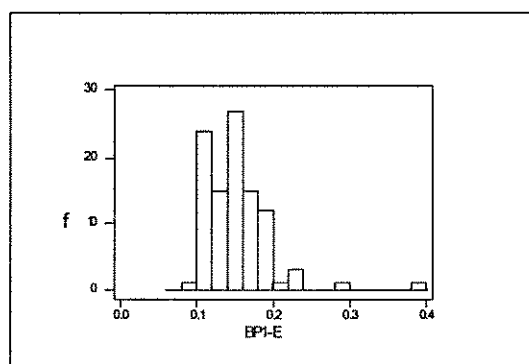
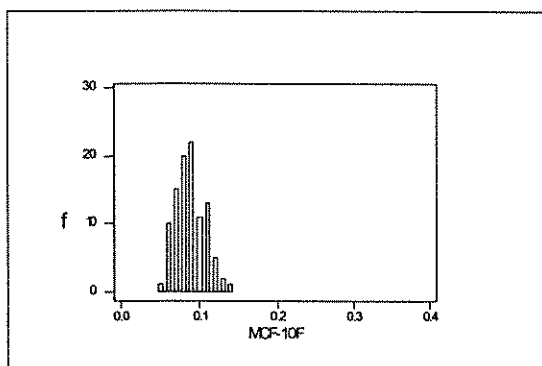


Figura 16- Histogramas de frequência (f) dos valores da razão entre as áreas nucleolares e as áreas nucleares das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

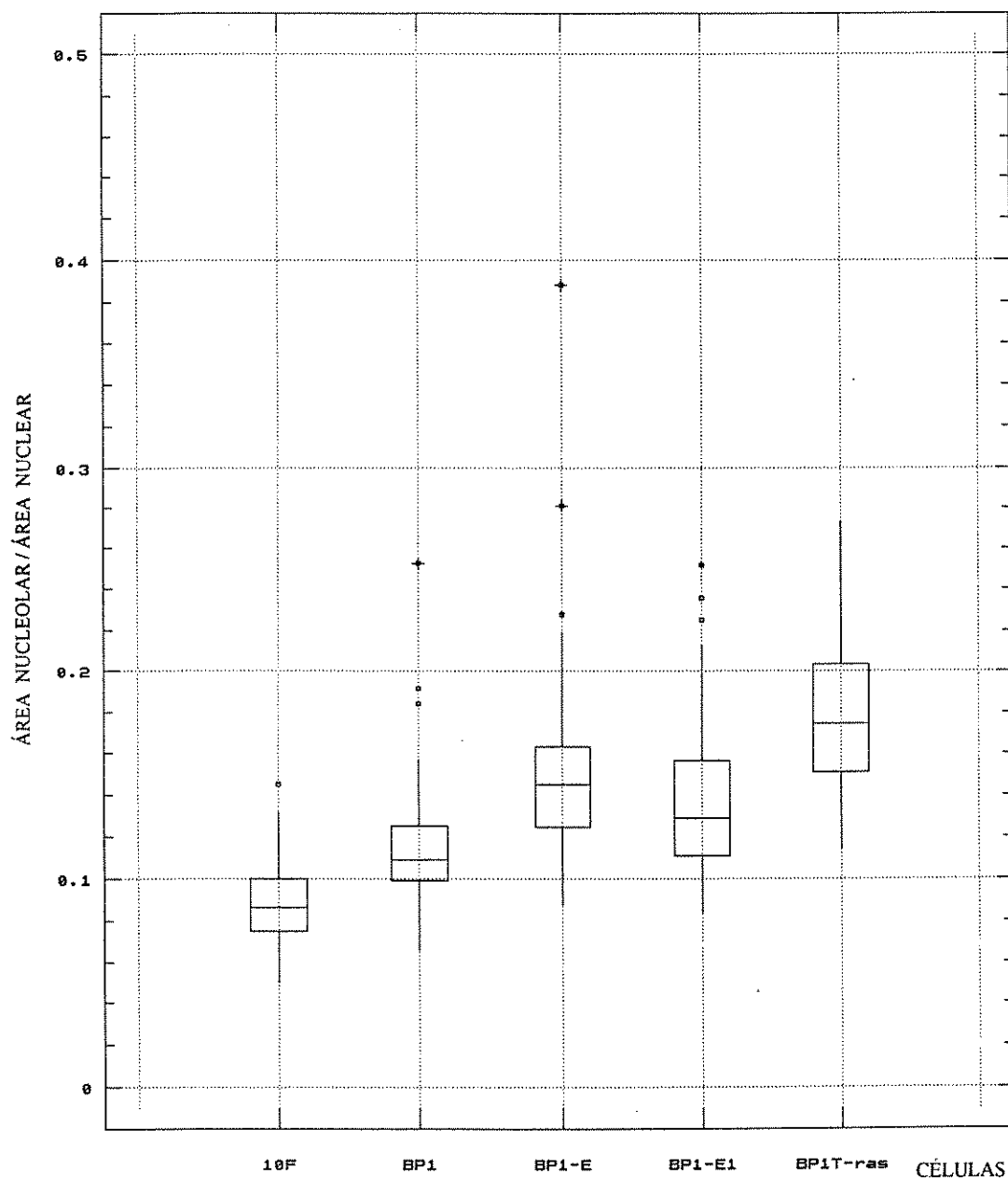


Figura 17 - Box - plot da razão entre as áreas nucleares e as nucleolares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

O perímetro dos núcleos diminuiu nas células transformadas com o benzo[a]pireno (clones BP1, BP1-E e BP1-E1) (Tabela 8). Uma frequência maior de valores de perímetro nuclear foi observada ocorrer em classes entre 30 e 50 μm^2 nos núcleos das células dos clones BP1, BP1-E e BP1-E1, enquanto, nos núcleos das células dos clones MCF-10 F e BP1-Tras esse valores se concentraram entre 40 a 60 μm^2 (Fig. 18), sendo a variância dos dados de perímetro nuclear significativamente maior nos núcleos das células do clone BP1-Tras (Fig. 19). Desta forma, baseando-se no fato de que o valor do fator forma é diretamente proporcional ao quadrado do perímetro e inversamente proporcional à área (ver fórmula em Materiais e Métodos) e nos resultados das comparações estatísticas (Tabela 9), os núcleos das células MCF-10F, transformadas pelo benzo[a]pireno (clones BP1, BP1-E e BP1-E1), tenderam a assumir formas mais elipsóides, enquanto, os núcleos das células MCF-10F e BP1-Tras tenderam a assumir formas mais circulares. Estes achados podem também ser verificados através dos histogramas de frequência dos valores do fator forma nuclear (Fig. 20). Valores discrepantes de perímetro e fator forma nucleares foram observados em todos os clones celulares (Figs. 19 e 21).

Por outro lado, o perímetro dos nucléolos aumentou com a progressão tumorigênica das células MCF-10F induzida pelo benzo[a]pireno (clones BP1-E e BP1-E1) (Tabela 10). Uma frequência maior de valores de perímetro nucleolar foi observada ocorrer em classes entre 10 a 30 μm^2 nos nucléolos das células dos clones MCF-10F, BP1e BP1-Tras, enquanto, nos núcleos das células dos clones BP1-E e BP1-E1, embora uma frequência grande de valores de perímetro nucleolar se concentrasse dentro deste intervalo, uma parte considerável de dados posicionou-se acima de 30 μm^2 (Fig. 22). Desta forma, baseando-se no fato de que o valor do fator forma é diretamente proporcional ao

Tabela 8- Comparações de perímetros nucleares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	44,96	7,58	A ^{2,3}	A
BP1	40,44	7,77	C	C
BP1-E	42,21	5,81	B	B
BP1-E1	42,17	5,46	B	B
BP1- <u>Tras</u>	44,39	8,15	AB	AB

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ³ A → C, ordem decrescente das médias dos dados transformados (inverso do quadrado) avaliados por ANOVA; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

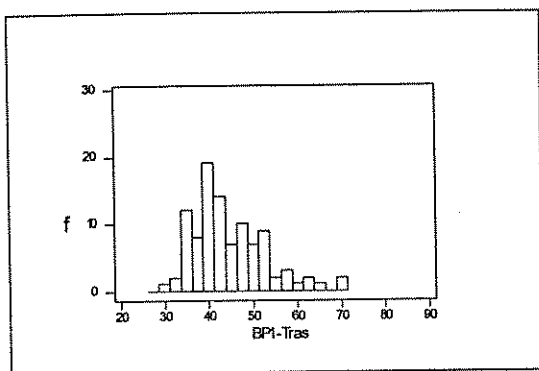
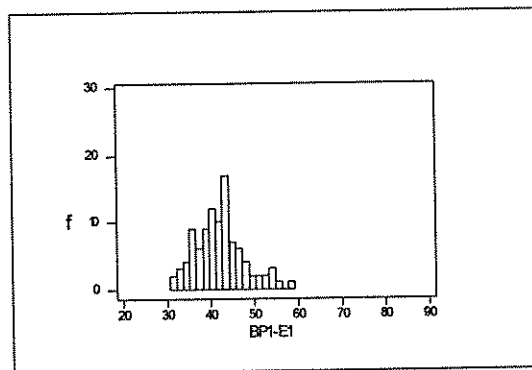
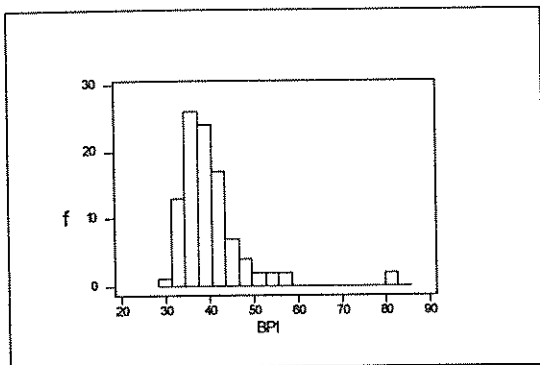
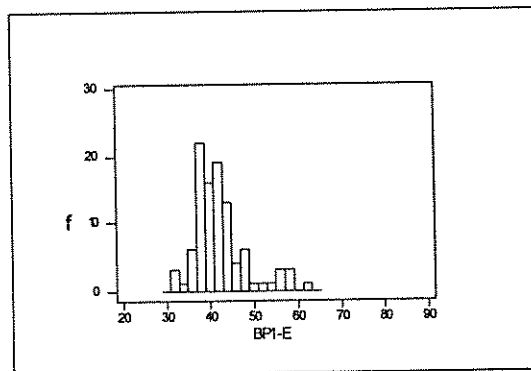
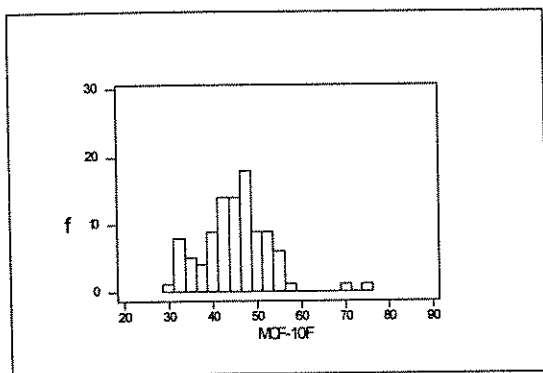


Figura 18- Histogramas de frequência (f) dos perímetros nucleares (μm) das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

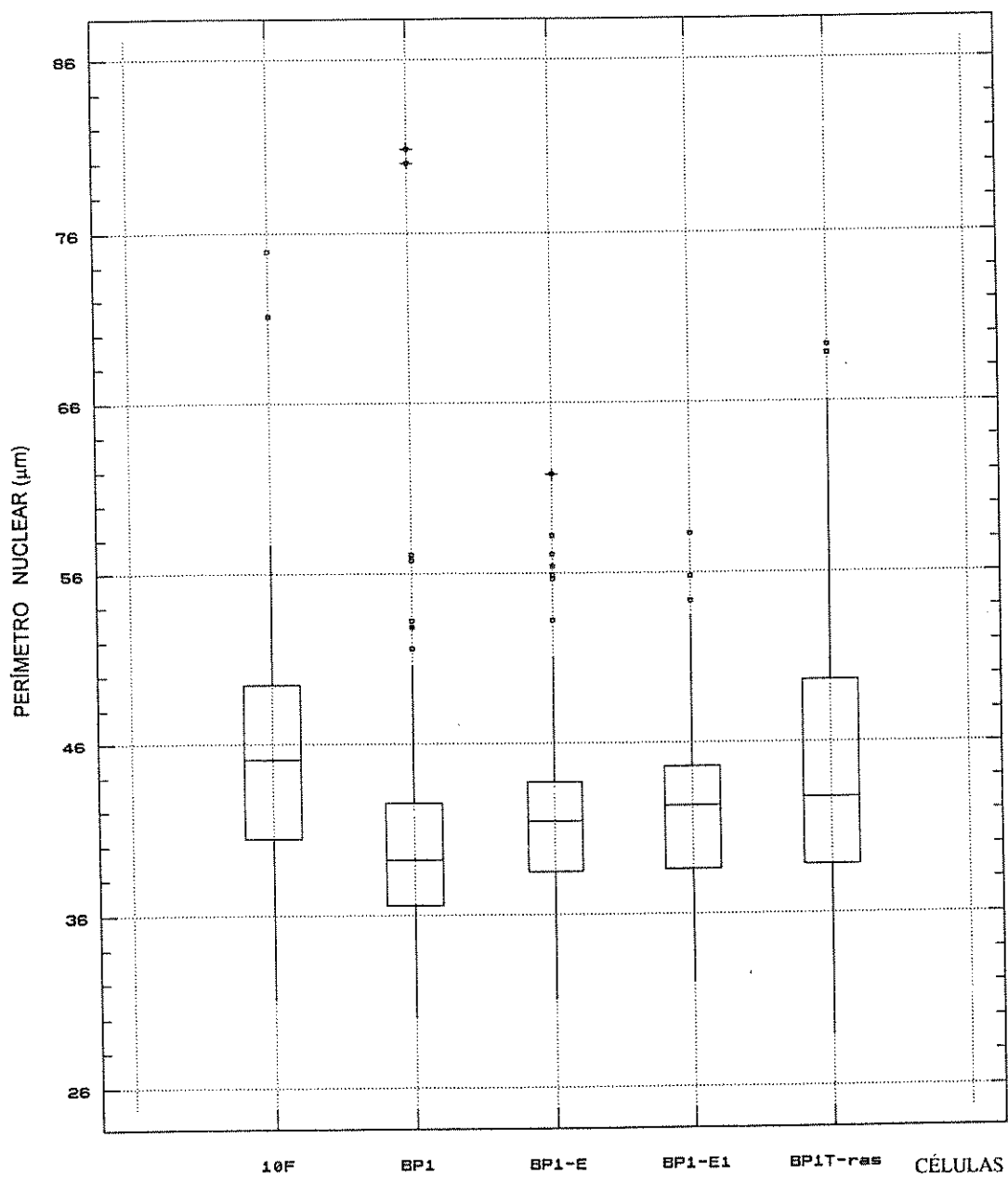


Figura 19 - Box-plot dos perímetros nucleares (μm) em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

Tabela 9- Comparações de fator forma nucleares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	114,66	4,31	ND	A ²
BP1	117,61	6,51	ND	BC
BP1-E	116,30	4,88	ND	AC
BP1-E1	116,18	5,68	ND	AC
BP1- <u>Tras</u>	113,25	4,25	ND	B

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ND = Não determinado pela ausência de homogeneidade da variância dos dados; $\bar{X}$ = Média aritmética, SD = Desvio-padrão.

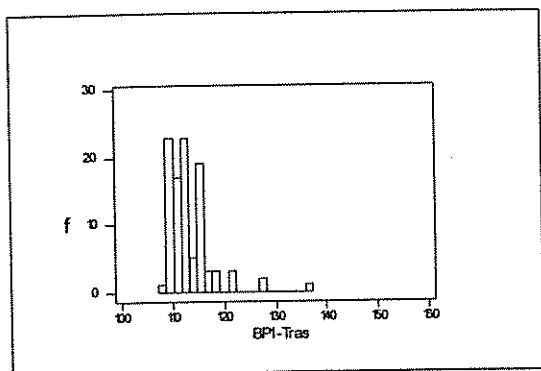
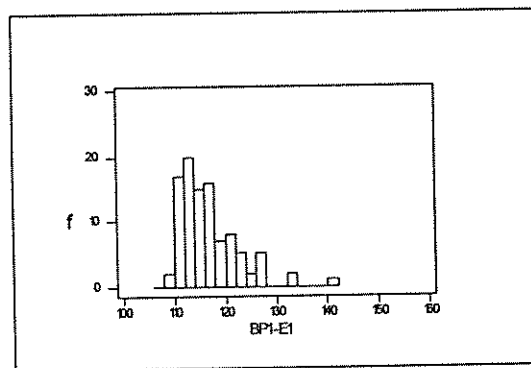
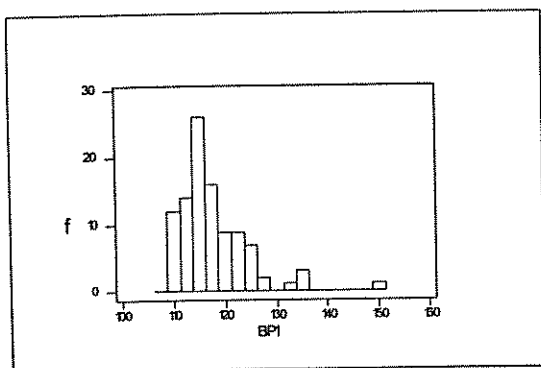
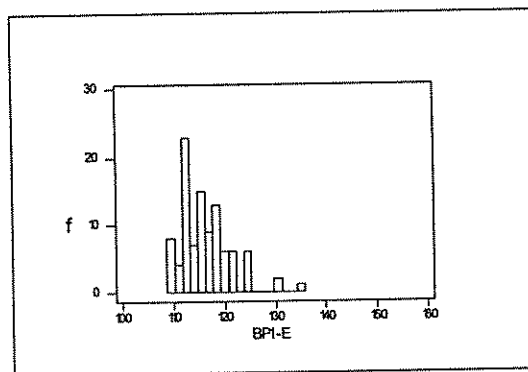
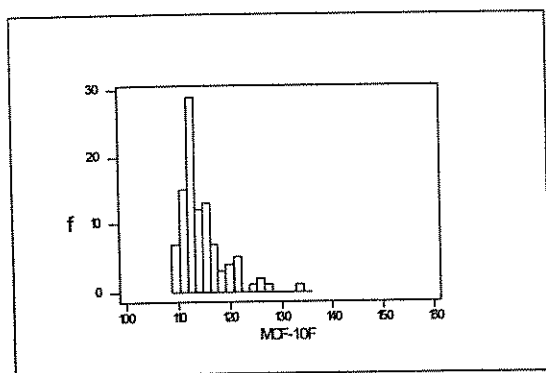


Figura 20- Histogramas de frequência (f) dos valores do fator forma nuclear das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

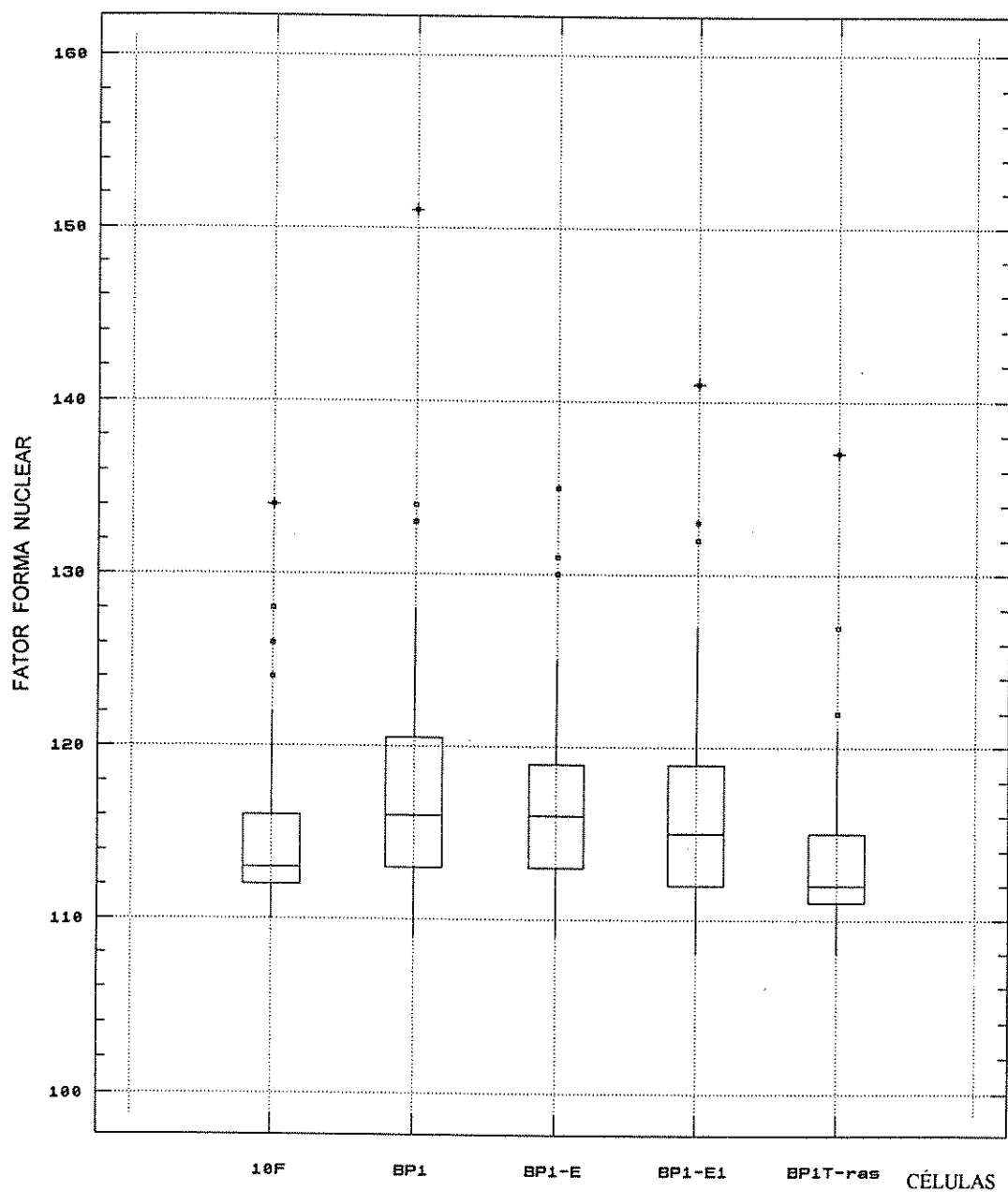


Figura 21 - Box-plot dos fatores forma nucleares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

quadrado do perímetro e inversamente proporcional à área (ver fórmula em Materiais e Métodos) e nos resultados das comparações estatísticas (Tabela 11), os nucléolos das células MCF-10F, transformadas pelo benzo[a]pireno (clones BP1-E e BP1-E1), tenderam a assumir formas mais irregulares, enquanto, os nucléolos das células MCF-10F e BP1 e BP1-Tras tenderam a assumir formas mais regulares. Estes achados podem também ser verificados através dos histogramas de frequência dos valores do fator forma nucleolar (Fig. 24). Valores discrepantes de perímetro foram observados nos clones BP1, BP1-E e BP1-Tras e, de fator forma nucleolares em todos os clones celulares (Figs. 22 e 25).

Uma diminuição no número de nucléolos foi observado ocorrer nos clones de células BP1-E e, especialmente em BP1-Tras (Tabela 12). Nos núcleos das células das células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas pelo benzo[a]pireno, foram observados até um máximo de 5 a 7 nucléolos, exceção feita às células do clone BP1-Tras onde foram observados núcleos com no máximo 3 nucléolos em 100 núcleos analisados (Fig.26 e 27). A variância do número de nucléolos foi maior nos núcleos das células do clone BP1-E (TABELA 12).

Tabela 10- Comparações de perímetros nucleolares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	23,61	6,58	A ^{2,3}	A
BP1	23,55	6,73	A	A
BP1-E	27,47	9,48	B	AB
BP1-E1	27,26	5,72	B	B
BP1- <u>Tras</u>	23,84	6,64	A	A

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ³ A → B, ordem crescente das médias dos dados transformados (raiz quadrada) avaliados por ANOVA; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

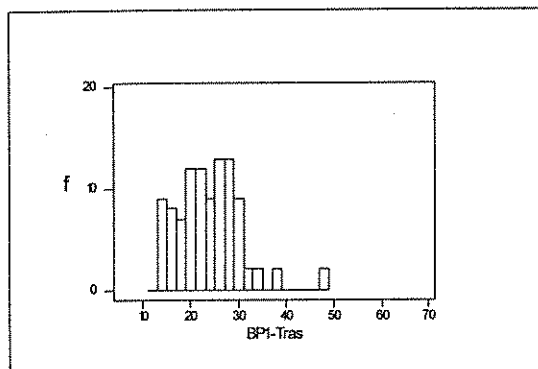
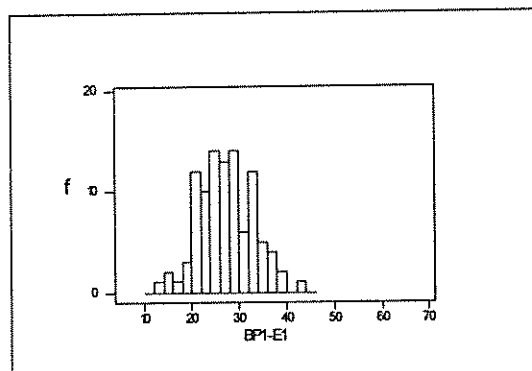
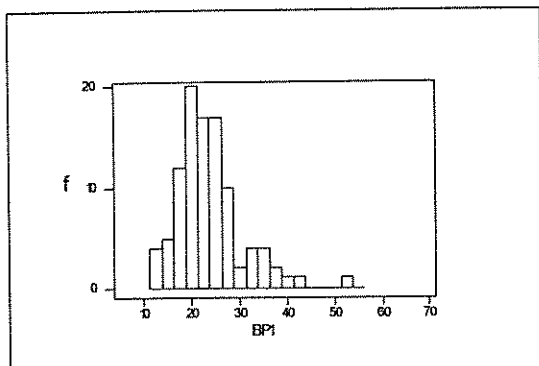
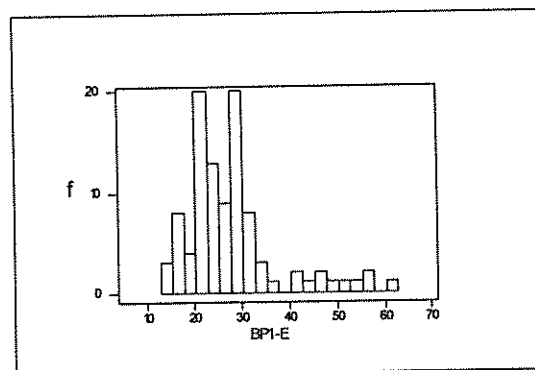
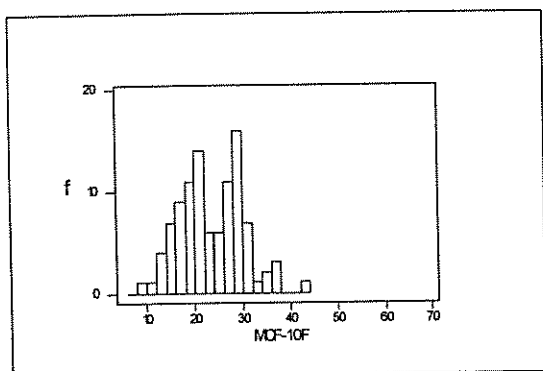


Figura 22- Histogramas de frequência (f) dos perímetros nucleolares (μm) das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

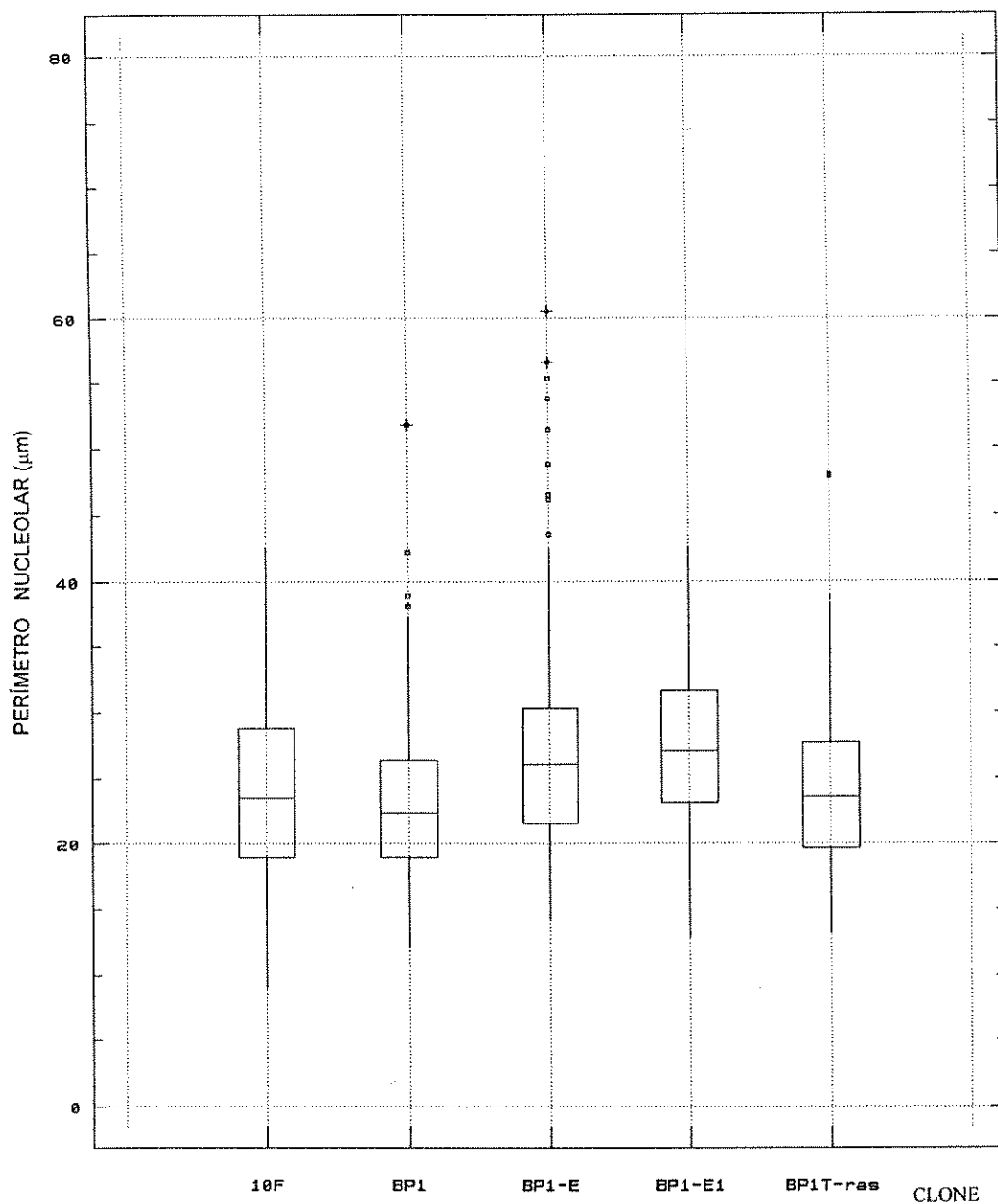


Figura 23 - Box-plot dos perímetros nucleolares (μm) em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

Tabela 11- Comparações de fator forma nucleolares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F , transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	159,27	51,86	ND	A ²
BP1	137,38	32,88	ND	B
BP1-E	171,55	58,08	ND	AC
BP1-E1	142,02	24,45	ND	A
BP1- <u>Tras</u>	127,29	16,13	ND	B

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ND = Não determinado pela ausência de homogeneidade da variância dos dados; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

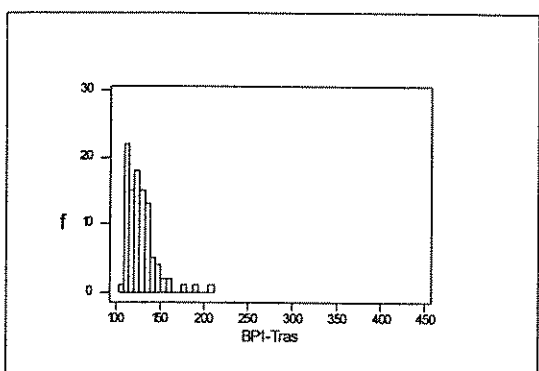
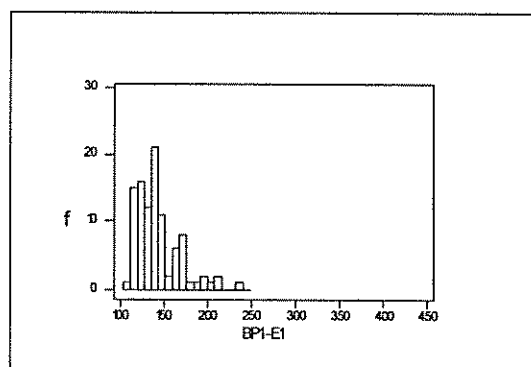
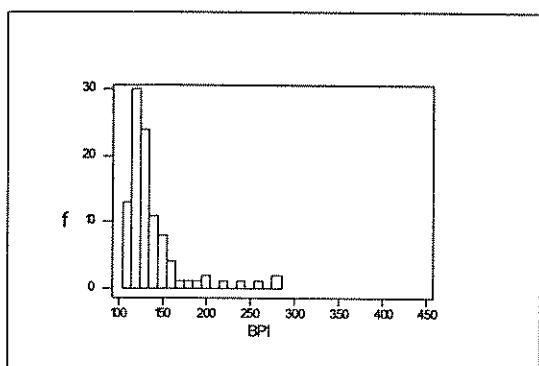
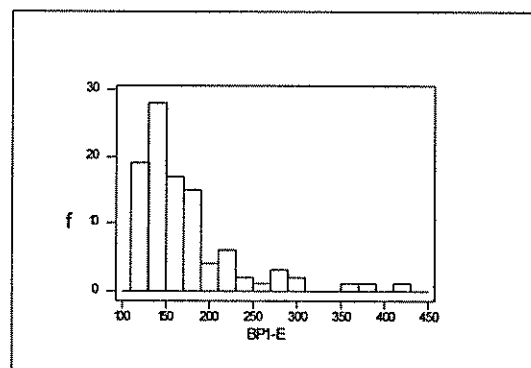
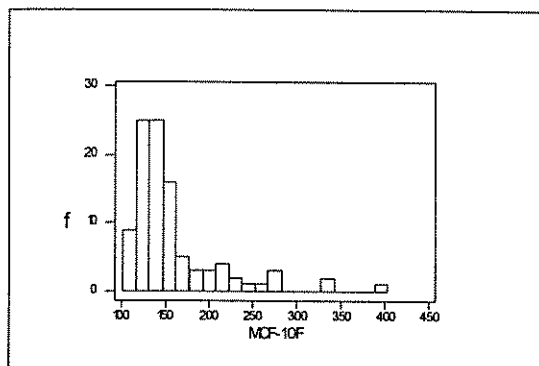


Figura 24- Histogramas de frequência (f) dos valores do fator forma nucleolar das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

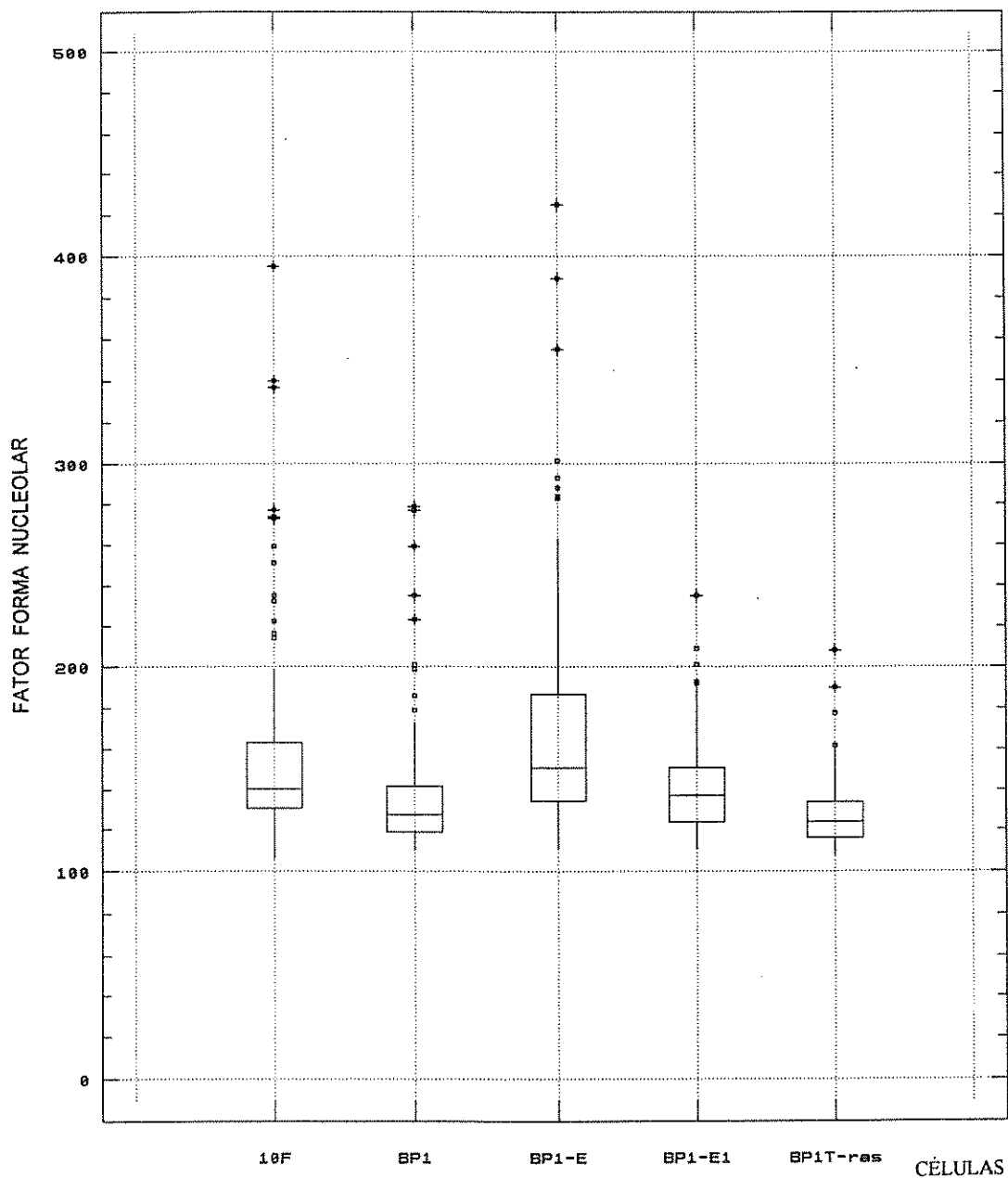


Figura 25 - Box-plot dos fatores forma nucleolares em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

Tabela 12- Comparações do número de nucléolos em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F , transformadas ou não, como avaliadas pelos testes estatísticos de ANOVA (paramétrico) e de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

Células ¹	$\bar{X}$	SD	ANOVA	Kruskal-Wallis
MCF-10F	2,73	1,09	A ^{2,3}	A
BP1	2,68	1,21	A	A
BP1-E	2,25	1,17	B	B
BP1-E1	2,48	0,93	A	AB
BP1- <u>Tras</u>	1,54	0,69	C	C

¹ Foram analisadas 100 células por linhagem celular; ² Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$; ³ A → C, ordem decrescente das médias dos dados transformados (inversa da raiz quadrada), avaliados por ANOVA; $\bar{X}$ = Média aritmética; SD = Desvio-padrão.

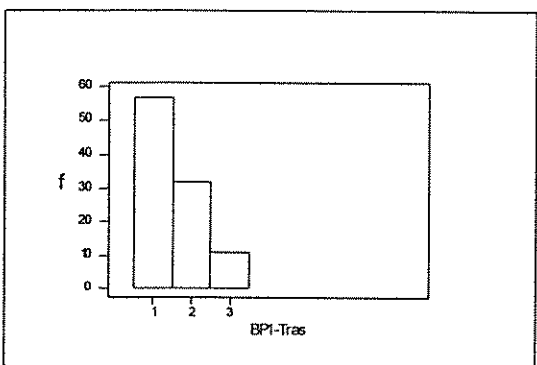
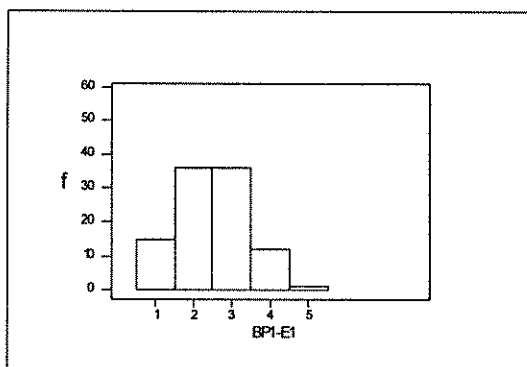
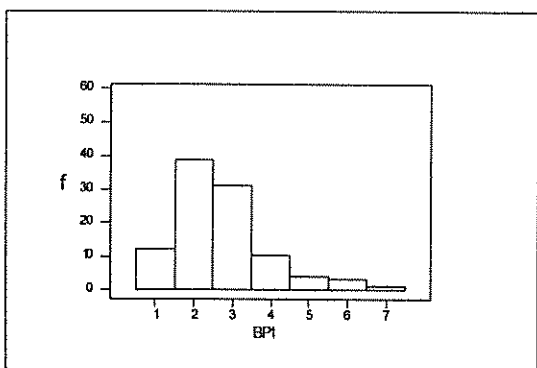
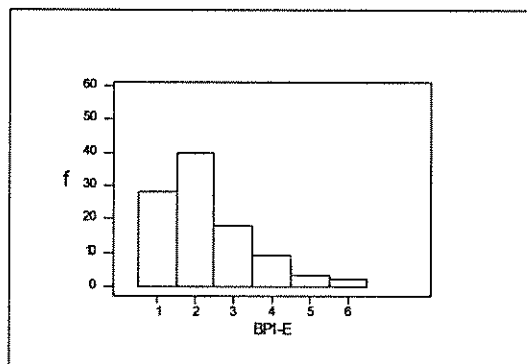
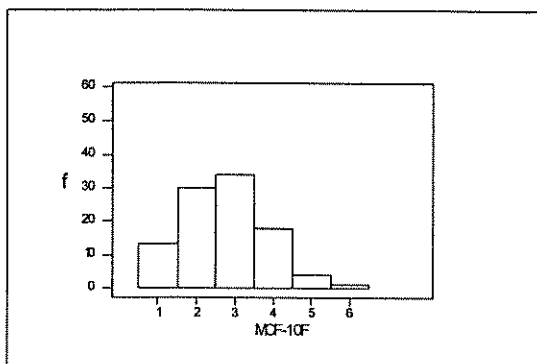


Figura 26- Histogramas de frequência (f) do número de nucléolos das células dos diferentes clones de células MCF-10F, transformadas ou não.

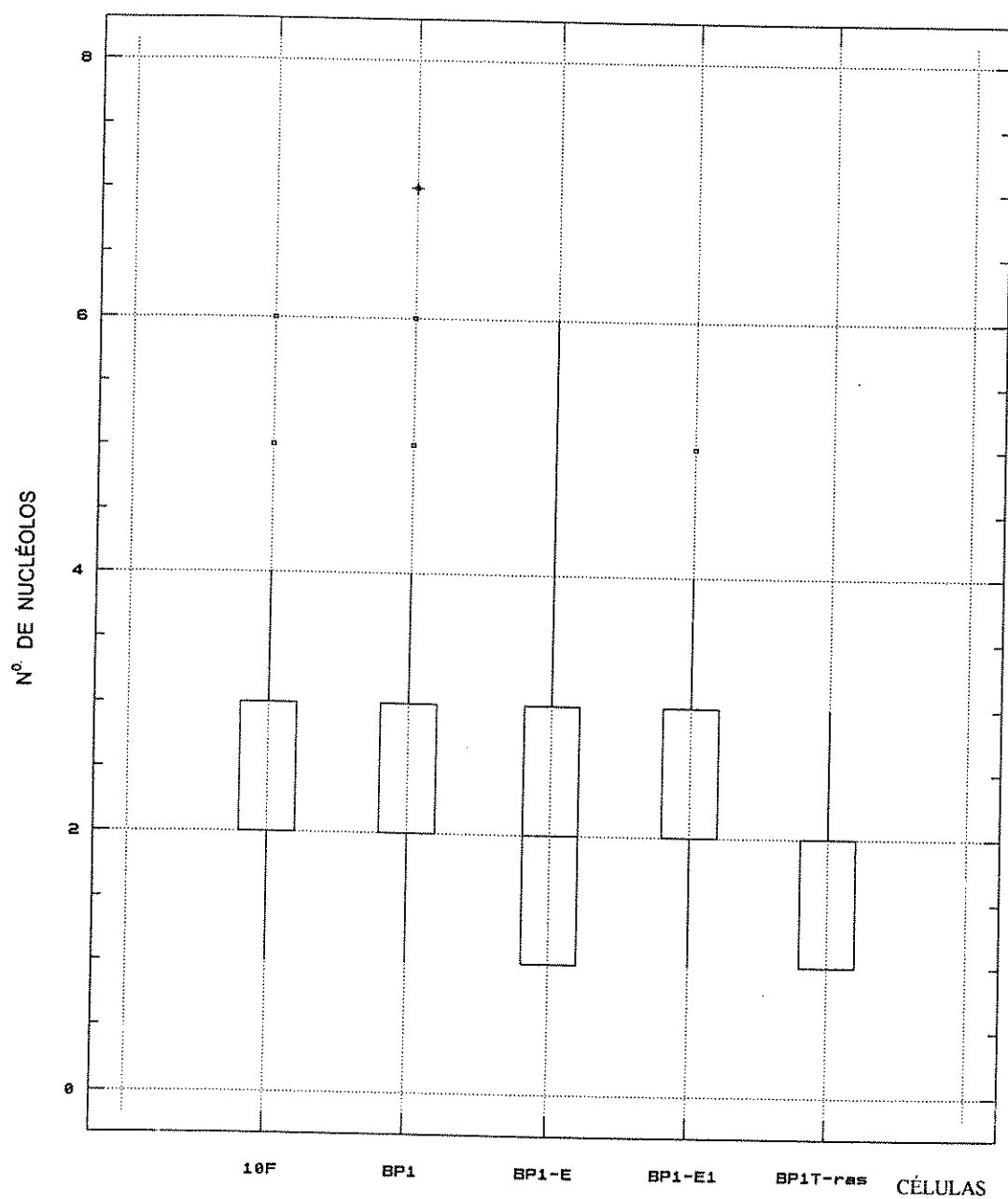


Figura 27 - Box-plot do número de nucléolos em diferentes clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

V- Discussão.

V.1) *Resposta de relocação de metacromasia de RNA durante a mitose de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.*

O padrão de relocação de metacromasia devida a rRNA com a mitose, em células MCF-10F, não se modifica com a transformação neoplásica induzida pela exposição ao benzo[a]pireno ou pela transfecção do oncogene c-Ha-ras. Esta relocação de rRNA, embora idêntica à de células da linhagem MCF-10A (MELLO, 1995), mostra menor intensidade na resposta metacromática e na frequência de corpos semelhantes a nucléolos (nucleolus-like bodies) do que em células da linhagem MCF-10A. Este fato, pode de certa forma ser associado as quantidades de rRNA relacionas às necessidades metabólicas diferentes destas duas linhagens de células epiteliais mamárias humanas, como comentado mais adiante.

Núcleos de células das linhagens MCF-10F, transformadas ou não, quando corados com azul de toluidina em presença de concentrações crescentes de íons Mg^{2+} exibem abolição de metacromasia devida ao DNA em concentrações iônicas de Mg^{2+} inferiores àquelas observadas para o RNA. Isto se deve ao fato de que o ponto de CEC (concentração crítica de eletrólitos) do DNA é menor do que o do RNA (MELLO et al., 1993).

Dos seus estudos da composição das glicosaminoglicanas ácidas em matriz extracelular animal com azul de alcian, SCOTT (1960) propôs o conceito de concentração crítica de eletrólitos, visando a localização e identificação de diferentes compostos aniônicos (COO^- e SO_3^-) nessa matriz. Segundo SCOTT (1960), CEC é a concentração específica de cátions inorgânicos na qual a alcionofilia de determinado substrato é abolida. Ao serem corados, então, com as

soluções contendo cátions inorgânicos, determinados substratos da matriz extracelular passam a exibir uma diminuição da intensidade de coloração em função da concentração dos íons inorgânicos na solução corante. Este fato se deve à competição entre as moléculas do corante catiônico com os cátions inorgânicos por sítios aniônicos disponíveis nos diferentes substratos (SCOTT, 1973).

O princípio da CEC foi estendido por VIDAL & MELLO (1989) e MELLO & VIDAL (1989) para estudos de mudanças na composição e/ou estruturas de complexos nucleoproteicos *in vitro* e *in situ*. Esses autores utilizaram como cátion inorgânico o Mg^{2+} e como corante catiônico o azul de toluidina (AT) à 0,025% em tampão McIlvaine. Em pH 4,0, as moléculas desse corante se ligam eletrostaticamente a grupos fosfatos disponíveis no DNA e RNA, ou seja, não ligados a proteínas, resultando na basofilia nuclear.

A basofilia nuclear é dita metacromática para o caso de coloração com AT, quando à medida em que as moléculas deste corante se ligam a grupos aniônicos disponíveis em determinados substratos em maior número e próximas umas das outras, ou seja, ocorrendo a formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros por empilhamento das moléculas de AT, se observa alteração no espectro de absorção anteriormente obtido para uma solução aquosa do corante a uma concentração de 10^{-6} M. Com o empilhamento das moléculas de AT, ocorre um deslocamento do pico de absorção de valores de 630 nm para picos de comprimento de onda mais curtos (hipsocromismo) (no máximo 540 nm), e, simultaneamente, se observa um abaixamento do pico de absorção anteriormente obtido (hipocromismo) (VIDAL, 1987). Visualmente, em preparações *in vitro* e *in situ*, o fenômeno de metacromasia é verificado pela coloração róseo-violeta.

Desta forma, a concentração de Mg^{2+} na qual é abolida a metacromasia do DNA ou do RNA num complexo nucleoprotéico é considerado

como o seu ponto de concentração crítica de eletrólitos (CEC) (VIDAL & MELLO, 1989). Considerando-se que no ponto de CEC de DNA em complexos DNA-proteínas a sua metacromasia é abolida, enquanto a metacromasia de RNA em complexos RNA-proteínas é bem evidente, MELLO et al., (1993) propuseram uma técnica variante de CEC aplicada para visualização de nucléolos, que, posteriormente, foi extendida para estudos de relocação de metacromasia de RNA durante a mitose (MELLO, 1995) e visualização de células apoptóticas (VIDAL et al., 1996a), como comentado mais adiante.

O nucléolo sofre alterações estruturais cíclicas durante a divisão celular, ou seja, se fragmenta no início da mitose e se reconstitui ao final da telófase de cada ciclo celular (BRINKLEY, 1965; NOËL et al., 1971). O nucléolo no início da prófase se desintegra e suas proteínas são distribuídas para locais específicos da célula: 1) algumas proteínas nucleolares permanecem associadas com as NORs (regiões organizadoras de nucléolos) durante todos os estágios da mitose, como o caso da RNA polimerase I e do fator de transcrição UFB (HERNANDEZ-VERDUN et al., 1980; ROUSSEL et al., 1994); 2) outras proteínas solubilizam-se em parte no citoplasma vindo a se integrar ao nucléolo em reformulação na telófase, como o caso da nucleolina e da proteína B23 (HERNANDEZ-VERDUN et al., 1980; ROUSSEL et al., 1994); 3) e um terceiro grupo de proteínas, conhecidas como proteínas passageiras (“passenger proteins”), alinham-se junto à periferia dos cromossomos (revestimento pericromossomal) durante a mitose (GAUTIER et al., 1992, 1994).

Durante a mitose das células MCF-10F, o material nucleolar metacromático se reorganiza dentro do citoplasma envolvendo as placas metafásicas e, na anáfase, a reação de metacromasia desloca-se das bordas para as regiões entre os dois blocos de cromossomos, sendo assim observada até a

telófase, quando ocorre uma reformulação do nucléolo (Figs. 8-11). A resposta de metacromasia de rRNA durante a mitose não coincide com a resposta AgNOR⁺ (Fig. 11) nem mesmo com a localização das proteínas passageiras e snRNAs observados por outros autores durante a divisão celular de diferentes tipos celulares (AZUM-GÉLADE et al., 1994; GAUTIER et al., 1992, 1994), confirmando dados de MELLO (1995).

Corpos nucleares (corpos esféricos e espiralados) e citoplasmáticos (corpos semelhantes a nucléolos), com características morfológicas e/ou ultra-estruturais similares aos nucléolos, vêm sendo descritos na literatura em células interfásicas, e, em divisão celular, respectivamente (BRINKLEY, 1965; NOËL et al., 1971; BRASCH & OCHS, 1992; MELLO, 1995; ROTH, 1995). Durante a divisão celular, mais precisamente durante a prófase até o início da telófase, corpos parecidos com nucléolos (“nucleolus-like bodies”) associados às massas cromossômicas ou livres no citoplasma podem ser identificados tanto em células vegetais como animais, como remanescentes nucleolares (BRINKLEY, 1965; NOËL et al., 1971; SATO et al., 1988,1989; MELLO, 1995). Estudos citoquímicos revelaram que estas estruturas apresentam uma natureza ribonucleoproteica (SATO et al., 1988,1989; MELLO, 1995).

Os corpos parecidos com nucléolos (nucleolus-like bodies) cujos tamanhos e frequência ao longo das diferentes fases da mitose são elevados nas células da linhagem MCF-10A não transformadas, intermediários nas células da linhagem MCF-10F não transformadas, pequenos e escassos nas células das linhagens MCF-10F transformadas pela exposição ao benzo[a]pireno ou pela transfecção do oncogene c-Ha-ras, podem, possivelmente, refletir diferenças metabólicas dessas linhagens, como também corroborado por dados de morfometria nucleolar comentados mais adiante. Conteúdos de rRNA excedentes

às necessidades funcionais poderiam ser confinados a esse corpos que seriam lisados em algum momento propício do ciclo celular. Nesse sentido, nas células da linhagem MCF-10F transformadas, seu metabolismo propiciaria máxima redução de tais excedentes, talvez com alguma vantagem energética.

Ao contrário da detecção interfásica de corpos espiralados (coiled bodies), um tipo especial de corpo nuclear (0,3 a 1,5 µm de diâmetro) tipicamente arredondado e composto de fibras espiraladas e grânulos, e, especialmente proeminente no nucleoplasma, ou mesmo no nucléolo de células hiperestimuladas e/ou tumorigênicas, inclusive de células epiteliais mamárias humanas (BRASCH & OCHS, 1992; OCHS et al., 1994), a ausência de corpos parecidos com nucléolos (nucleolus-like bodies) durante a mitose de células transformadas pelo benzo[a]pireno poderia estar correlacionado com o metabolismo e o grau de transformação *in vitro* destes clones celulares.

V. 2) Proliferação celular e apoptose em células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

O crescimento tumoral ou a expansão clonal de células transformadas em cultura é afetado diretamente pelo balanço entre a proliferação celular e a morte celular por necrose, apoptose ou por mitose catastrófica (mitose anômala), esta última observada principalmente em cultura de células. O fato de que células sofrendo mitose normal, mitose catastrófica ou apoptose compartilham de um número de características morfológicas, bioquímicas e genéticas (KING & CIDLOWSKI, 1995; EVAN et al., 1995), e, que vários genes, entre eles o p53, bcl-2/bax, c-myc, ras e algumas CDKs (proteínas kinases dependentes de ciclinas) são importantes na regulação destes processos, indicam a complexidade,

interrelação e a importância destes processos para o entendimento do comportamento biológico de diferentes neoplasias.

A aquisição da propriedade de induzir tumores em camundongos atímicos SCID (“severe combined immunodeficiency”) de células da linhagem MCF-10F transformadas, entre outros fatores, parece ser dependente de um estado proliferativo aumentado nestas células. As células provenientes de linhagens de MCF-10F transformadas pela exposição ao benzo[a]pireno (BP1-E, BP1-E1) e transfectadas com o plasmídio pH06T1 contendo o oncogene c-Ha-ras humano mutado (BP1-Tras), que expressam o fenótipo tumorigênico em camundongos atímicos SCID (CALAF & RUSSO, 1993; CALAF et al., 1995), apresentam uma atividade proliferativa aumentada, como avaliada pelo índice mitótico, quando comparadas às células controles (MCF-10F) e transformadas (BP1) (Tabela 1). Este fato demonstra que a transformação das células MCF-10F pelo benzo[a]pireno e pelo oncogene c-Ha-ras, dá origem à clones que expressam taxas proliferativas mais elevadas.

Em trabalho anterior, CALAF & RUSSO (1993) demonstraram que as células dos clones BP1-E apresentam tempo de duplicação de população (doubling time) (intervalo de tempo necessário para que ocorra uma duplicação total da população inicial) menor e número total de duplicações de populações (total doublings) (número total de duplicações de uma linhagem celular desde sua iniciação) maior quando comparadas às células da linhagens MCF-10F e parentais BP1, esta última apresentando valores intermediários comparado aos dos outros clones. Desta forma, a expressão do fenótipo tumorigênico nas linhagens celulares BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras parece estar associada à aquisição de uma vantagem proliferativa em relação às células parentais BP1 e controles MCF-10F.

A atividade proliferativa aumentada é uma das características mais marcantes das células tumorais (PRESTON-MARTIN et al., 1990), visto que, ao contrário das células normais, as células comprometidas com a malignização carecem dos mecanismos que controlam a progressão do ciclo celular (HARTWELL & KASTAN, 1994). Portanto, a detecção e a quantificação das células em proliferação representam parâmetros importantes para se avaliar o comportamento biológico de diferentes neoplasias.

A contagem das mitoses é talvez o método mais conveniente e o mais tradicional para estimar atividade proliferativa de células em cultura, e, em tecidos normais, adaptações fisiológicas ou patológicas. Dessa forma, a contagem de mitoses na forma de índice mitótico tem sido muito empregada pelos patologistas como parâmetro do prognóstico de diferentes neoplasias, inclusive nas neoplasias de mama (van DIEST et al., 1989; AALTOMAA et al., 1991; BIESTERFELD et al., 1995; JANNINK et al., 1995). Entretanto, muitos patologistas não reconhecem a contagem de mitoses como uma ferramenta prognóstica importante, visto que, este método mostra-se ineficiente sob vários aspectos, sendo o mais marcante a dificuldade no reconhecimento de figuras mitóticas, com a consequente baixa reprodutibilidade entre diferentes observadores (QUINN & WRIGHT, 1990).

A detecção de antígenos relacionados à incorporação de precursores do DNA (timidina tritiada ou bromodesoxiuridina (BrdU)) e à proliferação celular (Ki-67 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)) e, a quantificação de proteínas AgNOR⁺ vêm ganhando, atualmente, um grande espaço no contexto do estudo do comportamento e do prognóstico de diferentes neoplasias, quanto ao que se refere a identificação e quantificação de células em proliferação (QUINN & WRIGHT, 1990; HOFSTÄDTER et al, 1995). Embora a contagem de figuras de

mitose leve a uma subestimativa da fração de células em proliferação celular, visto que as células em intérfase não são consideradas neste tipo de análise, esta foi sensível em detectar um aumento de células em divisão nos clones de células MCF-10F que expressam o fenótipo tumorigênico. Estes resultados, portanto, estão de acordo com dados da literatura que indicam que as células MCF-10F transformadas e tumorigênicas (BP1-E) adquirem vantagem proliferativa em relação as parentais não tumorigênicas (BP1), e, principalmente em relação às controles (MCF-10F) (CALAF & RUSSO, 1995).

Uma contrapartida fisiológica contrária a proliferação celular, que regula a homeostase tecidual (número constante de células) e a taxa de crescimento tumoral, é a apoptose ou morte celular programada (RAFF, 1992; THOMPSON et al., 1992). Embora os termos apoptose e morte celular programada sejam extensamente utilizados como sinônimos, distinções entre eles podem ser feitas (MAJNO & JORIS, 1995).

O termo "morte celular programada" é empregado para situações onde existe um programa genético (relógio genético), que especifica o período em que a morte (suicídio) celular deve ser desencadeada, ocorrendo em condições fisiológicas específicas (metamorfose em insetos, regressão do útero pós-parto e mama na lactação, etc.), na embriogênese (desenvolvimento do sistema nervoso, etc.), durante a diferenciação celular e na dependência da cinética de renovação celular. Por outro lado, o termo "apoptose" é utilizado para especificar o programa genético que sinaliza os meios para produzir morte celular circunstancial, em decorrência de danos genéticos causados por radiação ou agentes químicos, da retirada de fatores tróficos, etc. Em outras palavras, existem muitas situações nas quais a morte celular programada ocorre por mecanismos distintos dos da apoptose (MAJNO & JORIS, 1995).

A apoptose pode ser induzida, por exemplo, pela radiação, agentes quimioterápicos, hiper ou hipotermia (choque térmico), adição ou retirada de hormônios e por linfócitos T citotóxicos (KERR et al., 1994). Desta forma, morte celular por apoptose, ao contrário da morte por necrose, proporciona um mecanismo protetor pelo qual células com danos no DNA ou com alterações patológicas, que poderiam interferir na homeostasia tecidual ou levar a transformação neoplásica, seriam eliminadas (WILLIAMS, 1990; SMITH & FORNACE, 1996). Entretanto, as células tumorigênicas durante a progressão rumo à malignidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* parecem carecer dos mecanismos que desencadeiam a apoptose favorecendo, desta forma, sua expansão clonal (PRESTON et al., 1994; BEDI et al., 1995).

Morfologicamente, a apoptose é caracterizada pela perda da integridade celular, condensação e segregação cromatínica, com a formação de massas granulares uniformes e delimitadas sobre o envelope nuclear (marginação da cromatina) e condensação do citoplasma. A progressão da condensação cromatínica é acompanhada pela invaginação das membranas celular e nuclear, seguido por quebra do núcleo (cariorrhexis) em fragmentos discretos que são, posteriormente, circundados por porções do envelope nuclear, e, pelo fenômeno de estrangulamento celular, que irão constituir os corpos apoptóticos (WHILE et al., 1989; GERSCHENSON & ROTELLO, 1992; KERR et al., 1994; MAJNO & JORIS, 1995). Bioquimicamente, a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA a nível nucleossomal, que pode ser facilmente reconhecida pelo aspecto em “escada” do DNA em gel de agarose (WHILE et al., 1989; GERSCHENSON & ROTELLO, 1992; KERR et al., 1994; MAJNO & JORIS, 1995), embora esta característica não possa ser utilizada como um marcador universal de apoptose

(COHEN et al., 1992; COLLINS et al., 1992; GERSCHENSON & ROTELLO, 1992; KERR et al., 1994; MAJNO & JORIS, 1995) .

Basicamente, a identificação de células apoptóticas pode ser feita: 1) a partir da marcação *in situ* de extremidades 3'-OH de DNA fragmentado (GAVRIELI et al., 1992; WIJSMAN et al., 1993); 2) a partir das características morfológicas avaliadas por microscopia eletrônica ou de luz (WHILE, 1980). Esta última pode ser efetuada em preparados submetidos a colorações citoquímicas de rotina como hematoxilina-eosina ou, mais recentemente, pelo método variante de CEC (VIDAL et al., 1996a).

Células apoptóticas, como identificadas pela variante do método de CEC (concentração crítica de eletrólitos), anteriormente, proposto para distinguir RNA de DNA (MELLO et al., 1993), foram observadas ocorrer em todos os clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não. A cromatina em processo de condensação, característica de núcleos de células em apoptose, foi observada corar-se em verde, da mesma forma que o DNA cromossômico de células MCF-10F em divisão, enquanto, a maior parte dos corpos apoptóticos coraram-se de violeta (Figs.11 D-F), pelo método proposto por MELLO et al. (1993). Núcleolos, corados de violeta, em diferentes estados de integridade foram, também, observados nas células MCF-10F em apoptose (Figs.11 D e F). Desta forma, o método variante de CEC aplicado a visualização de células apoptóticas (VIDAL et al., 1996a) mostrou-se uma ferramenta útil na determinação da localização e frequência destas células nos diferentes clones de células MCF-10F.

Da análise das porcentagens de células apoptóticas identificadas pelo método proposto por VIDAL et. al. (1996), observou-se que as células da linhagem BP1-Tras apresentaram taxas de apoptose significativamente elevadas

em relação as demais linhagens celulares controles (MCF-10F) e transformadas (BP1, BP1-E, BP1-E1) (Tabela 3). Este achado é intrigante e, vai de encontro aos fatos de que: 1) as células da linhagem BP1-Tras desenvolvem tumores em camundongos atímicos SCID em um período de latência menor (os tumores apareceram entre 47 e 60 dias após a inoculação em 11 dos 14 animais) que os tumores induzidos pelas células da linhagem BP1-E (os tumores apareceram entre 101 e 124 dias após a inoculação em 3 dos 3 animais inoculados (CALAF et al., 1995); 2) fibroblastos em cultura transfectados com o oncogene c-Ha-ras mutado, com moderada ou alta expressão da proteína oncogênica p21^{ras}, apresentam taxas de apoptose espontâneas menores (ARENDS et al, 1993, 1994) ou uma resistência maior à ação de substâncias genotóxicas e quimioterápicos (BURT et al., 1988; NIIMI et al., 1991; KUO et al., 1996) e radiação ionizante (SKLAR, 1988), quando comparado com fibroblastos transfectados com outros oncogenes como c-myc, HPV, v-erbB-2, v-raf, v-src, v-fes, v-mos; 3) taxas de apoptose elevadas em fibroblastos em cultura transfectados com determinados oncogenes, outros que o c-Ha-ras, influenciam o crescimento de tumores induzidos *in vivo*.

As células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, possuem dois alelos do proto-oncogene c-Ha-ras, identificados por dois fragmentos de restrição de 1.0 Kb e 1.2 Kb. A exposição das células do clone MCF-10F ao benzo[a]pireno resultou na perda de um dos alelos do oncogene c-Ha-ras, o de 1.0 Kb, observado ocorrer nos clones de células BP1 e BP1-E, enquanto amplificação do alelo remanescente, o de 1.2 Kb foi observado ocorrer somente no clone de células BP1-E (ZHANG et al., 1995). Além dessas alterações, a exposição ao benzo[a]pireno resultou, também, em mutação de ponto no códon 61 do alelo de 1.2 Kd, em ambos os clones celulares BP1 e BP1-E (ZHANG et al., 1995).

A ativação por mutação dos proto-oncogenes da família ras é frequentemente observada em diferentes tumores humanos (BOS,1989), induzidos quimicamente em animais de experimentação (BALMAIN & BROWN, 1988; BELINSKY & ANDERSON, 1991) ou em células em cultura após a exposição a diferentes carcinógenos químicos (POURZAND & CERUTIS, 1993; ZHANG et al., 1994). Mutações nos codons 12, 13, 61 nos genes da família ras (H-ras, K-ras e N-ras), convertem esses proto-oncogenes em oncogenes ativos, e, a manifestação de determinado membro dessa família parece ser tecido e tumores específicos (BOS, 1989). Ao lado da perda da atividade de genes supressores tumorais, a ativação de determinados oncogenes, em particular os da família ras, parece ter um importante papel nos processos iniciais da tumorigênese, bem como, na progressão de células epiteliais mamárias humanas rumo à malignização (BASOLO et al., 1991; CALAF et al., 1995).

As proteínas do proto-oncogene ras são membros de uma superfamília de proteínas de baixo peso molecular (20-29 kDa, designadas como LMWGS (low molecular weight GTP-binding proteins),ou simplesmente de proteínas relacionadas ao ras), que se ligam e hidrolizam GTP, desta forma, participando como reguladores críticos de uma ampla variedade de funções intracelulares, tais como, proliferação e diferenciação celular, tráfico intracelular de vesículas, função de NADPH oxidase e regulação do citoesqueleto (BOKOCH & DER, 1993). Basicamente, a superfamília das LMWGS pode ser dividida em pelo menos três subfamílias genes principais: ras, rab e rho (BOGUSKI & McCORMICK, 1993). Algumas das proteínas destes genes podem compartilhar ou antagonizar alguns processos biológicos importantes como proliferação celular ou apoptose.

Por exemplo, a proteína p21^{ras} associada à superfície da membrana plasmática, é uma proteína que apresenta uma certa homologia com as proteínas G e, como estas apresenta atividade GTPásica intrínseca, ligando e hidrolizando GTP em GDP e Pi, participando, desta forma, como as proteínas G, na transdução de sinais externos via a liberação de mensageiros secundários. Quando ativada oncogenicamente, via uma mutação de ponto, a proteína p21^{ras} perde sua atividade GTPásica intrínseca, levando a propagação contínua de sinais para o interior da célula, mesmo na ausência de um estímulo externo, desencadeando várias respostas celulares, entre elas a proliferação celular (BOGUSKI & McCORMICK, 1993; LOWY & WILLUMSEN, 1993). Existem também fortes evidências para o papel de algumas proteínas de determinados genes da subfamília rho no controle da proliferação celular, visto que fibroblastos transfectados com estes genes apresentam características de células transformadas, inclusive a expressão de tumorigênese em camundongos atímicos (AVRAHAM, 1990).

Desta forma, enquanto os genes da subfamília ras e rho podem estimular a proliferação celular, ras suprime e rho estimula apoptose (BURT et al., 1988; SKLAR, 1988; NIIMI et al., 1991; FERNÁNDEZ-SARABIA & BISCHOFF, 1993; ARENDS et al, 1993, 1994; JIMÉNEZ et al., 1995; WANG et al., 1995; KUO et al., 1996). Em algumas situações como no estresse nutricional, a expressão do gene rho pode induzir apoptose (JIMÉNEZ et al., 1995), enquanto, a expressão de ras (proteína p23^{R-ras}) quando associada a expressão de bcl-2 leva a supressão da apoptose (FERNÁNDEZ-SARABIA & BISCHOFF, 1993; WANG et al., 1996).

Diante dos fatos acima referidos e de que as células dos clones de células BP1-Tras se mostravam mais confluentes do que as dos outros clones

celulares, sugerem-se duas hipóteses para explicar a taxa elevada de células apoptóticas neste clone: 1) como células em confluência são mais sensíveis à apoptose (PEROTTI et al., 1990), o crescimento mais acelerado destas células diminuiria o aporte de nutrientes (estresse nutricional), levando à ativação de determinados genes indutores de apoptose como c-myc ou rho ; 2) a elevada taxa de apoptose estaria relacionada à eliminação de células geneticamente inviáveis, que no caso das células BP1-Tras é plausível (como comentado mais adiante).

O gene p53 supressor tumoral tem um papel fundamental na regulação da apoptose celular (SHIMAMURA & FISCHER, 1996) e a perda da sua função está diretamente relacionada a diminuição da sensibilidade à radiação e a drogas quimioterapêuticas pelas células tumorais ou p53 negativas (VELCULESCU & EL-DEIRY, 1996). A indução de apoptose por uma via independente da ação do gene p53 é comumente observada em diferentes sistemas, inclusive durante o remodelamento ou progressão tumorigênica da mama (Li et al., 1996; SHIBATA et al., 1996). Desta forma, independentemente de qualquer uma das hipóteses sugeridas aqui para explicar a elevada taxa de células apoptóticas observadas no clone BP1-Tras, o mecanismo de indução de apoptose é certamente independente da ação do gene p53 , visto que as células MCF-10F, transformadas ou não, carecem da função deste gene (BARNABAS et al., 1995).

V. 3) Alterações nucleares, nucleolares e cromatínicas em células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não.

A instabilidade genética, que é caracterizada por mutações de ponto, translocações, deleções, aberrações citogenéticas, rearranjos e amplificação gênicas, parece ser a força que direciona a célula rumo à malignidade (HARTWELL et al., 1994; TLSTY et al., 1995). A transfecção do oncogene c- ou

v-Ha-ras ao DNA de diferentes tipos de células em cultura é suficiente para induzir a transformação das mesmas (YOAKUM et al., 1985, HURLIN et. al., 1989; BASOLO et al., 1991; CALAF et al., 1995). Entretanto, tem sido relatado na literatura que em alguns casos as células transfectadas com o oncogene c- ou v-Ha-ras tornam-se geneticamente instáveis, levando à alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais, em amplificação gênica e indução de mitose aberrantes nessas células (ICHIKAWA et al., 1990; WANI et al., 1994; DENKO et al, 1994, 1995).

Nossos resultados mostram que o clone BP1-Tras apresenta uma incidência estatisticamente maior de células micronucleadas quando comparado com a dos demais clones celulares controle ou experimentais, inclusive os que expressam o fenótipo tumorigênico em camundongos atímicos (Tabela 3). Este achado, aliado ao fato de que células NIH 3T3 (MELLO & RUSSO, 1989; MELLO & CHAMBERS, 1994; DENKO et al., 1995) e mesmo células MCF-10A (MELLO et al., 1994) quando transfectadas com o oncogene c-Ha-ras também apresentam uma incidência aumentada de células micronucleadas em relação às células controle ou transformadas, parecem ser indicativos de que estas células epiteliais mamárias humanas transformadas quimicamente e transfectadas com o oncogene c-Ha-ras sejam mais instáveis geneticamente. Nossos resultados indicam, também, que a frequência de micronucleação não se altera com a transformação induzida pelo benzo[a]pireno (clone BP1) nem com a progressão tumorigênica (clones BP1-E e BP1-E1), quando comparada com a das células MCF-10F (Tabela 3).

De modo geral, o acúmulo de alterações genéticas, induzidas pela transfecção do oncogene c-Ha-ras, gerando instabilidade nos núcleos das células da linhagem BP1-Tras, como inferido pela elevada frequência de células

micronucleadas, poderia estar sendo favorecida pela perda nestas da função do gene p53, designado como o guardião do genoma celular (LANE, 1992).

O gene supressor p53 é inativado na maioria dos cânceres humanos, inclusive no câncer de mama (GREENBLATT et al., 1994; OZBUN & BUTEL, 1995). A alteração na função desempenhada pelo gene p53 pode se dar por mutações que incluem deleções do gene inteiro, levando à perda completa da expressão deste gene supressor, mutações de ponto que dão origem a proteínas p53 mutantes que carecem de atividade de p53 nativa ou por sequestro e inativação por oncoproteínas virais ou da própria célula (VOGELSTEIN & KINZLER, 1992; SMITH & FORNACE, 1995; SELIVANOVA & WIMAN, 1995). Células que carecem da atividade do gene p53 se mostram geneticamente instáveis (LIVINGSTONE et al., 1992; TAINSKY et al., 1995; SMITH & FORNACE, 1995) e são, portanto, mais suscetíveis a quebras no DNA e a alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais (AGAPOVA et al., 1996).

A inativação da função do gene p53 parece ser decisiva para a imortalização de células em cultura e, conseqüentemente para a sua transformação neoplásica (SMETS, 1980; SHAY et al., 1991; NEWBOLD et al., 1993; RUSSO et al., 1993; BARNABAS et al., 1995; GAO et al., 1996). As células da linhagem MCF-10F e linhagens celulares derivadas da exposição ao benzo[a]pireno mostram alterações no gene p53, ou seja, estas células expressam uma proteína p53 mutante inativa funcionalmente, e, parece que tais alterações não se modificaram com a expansão clonal destas células rumo à progressão tumorigênica (BARNABAS et al., 1995).

A progressão do ciclo celular parece ser regulada em determinados pontos críticos, denominados como “checkpoints”. Basicamente durante o ciclo celular, três pontos críticos principais são conhecidos: as transições G1/S, G2/M e

Anáfase/Telófase (“spindle checkpoint”). Estes pontos de retardo ou pausa do ciclo celular são importantes para a célula na eliminação, pelo sistema de reparo, de erros espontâneos de replicação ou danos de DNA, induzidos por radiação e agentes químicos, que poderiam se constituir em mutações (mutações de ponto, deleções, rearranjos cromossômicos e aneuploidia), com a duplicação do DNA ou progressão do ciclo celular (HARTWELL & KASTAN, 1994). O gene p53 tem importantes papéis na regulação transcripcional de efetores negativos que regulam os diferentes “checkpoints”, em especial o G1 (LANE, 1992). Desta forma, a inativação de p53 e, conseqüentemente, a perda do papel do “checkpoint” G1, aumentaria a probabilidade do aparecimento de células em divisão com quebras no DNA (KASTAN et al., 1991; LEVINE et al., 1994; HARTWELL & KASTAN, 1994).

A presença de um grande número de células micronucleadas no clone de células BP1-Tras é decorrente, provavelmente, da perda da função da proteína p53 mutante em retardar a progressão do ciclo celular na vigência de alterações genéticas no DNA destas células (KASTAN et al., 1991). Desta forma, com a progressão do ciclo celular e síntese de DNA, muitas das alterações genéticas induzidas pela instabilidade destas células decorrentes da transfecção do oncogene c-Ha-ras ,e , não eliminadas pelo sistema de reparo da célula, poderiam resultar em quebras cromossômicas (clastogênese) e dar origem a fragmentos cromossômicos que iriam se constituir, posteriormente, em micronúcleos nas células-filhas (TOLBERT et al., 1992; FENECH, 1993). Deve-se levar em consideração, também, o fato de que interferências com o aparato (fuso) mitótico (aneuploidogênese) podem se constituir em um outro mecanismo importante de formação de micronúcleos (TOLBERT et al., 1992; FENECH, 1993), embora se

tenha relatos na literatura da participação do gene p53 no “spindle checkpoint”(CROSS et al., 1995).

A frequência de células multinucleadas foi, também, significativamente maior nas células do clone BP1-Tras, quando comparado com os demais clones de células, MCF-10F, transformadas ou não (Tabela 1). Com relação às porcentagens de células binucleadas e gigantes, estas não se mostraram alteradas com a transformação induzida pela exposição ao benzo[a]pireno ou pela transfecção do oncogene c-Ha-ras. A multinucleação ou policariocitose pode resultar da divisão celular sem a ocorrência subsequente de citocinese, ou ainda, pela fusão de células mononucleares (KAMEL et al., 1990), ou ainda, induzida pelo tratamento de células em cultura com substâncias químicas antineoplásicas, como a cisplatina e a bleomicina (ver referências em MIRANDA et al., 1996). Este fenômeno pode ocorrer, frequentemente, em condições neoplásicas e em certas infecções virais. Nas neoplasias a ocorrência de células multinucleadas pode ser devido a uma falha nos mecanismos de regulação da divisão celular, ou, alternativamente, pela falta de uma coordenação adequada entre as divisões nuclear e citoplasmática (KAMEL et al., 1990).

O fato de que o fenômeno de multinucleação parece não estar relacionado com a progressão tumorigênica de células MCF-10F transformadas pelo benzo[a]pireno (Tabela 3), e, de que dados da literatura mostram que células MCF-10A (MELLO et al., 1994), e HeLa (MIRANDA et al., 1996), transfectadas com o oncogene c-Ha-ras apresentam uma frequência elevada de células multinucleadas sugerem que este fenômeno se deva, provavelmente, ou à instabilidade genéticas destas células, devido a perda dos mecanismos de controle do ciclo celular, como comentado anteriormente, ou ainda, devido a alterações no

mecanismo de controle da citocinese pela expressão de ras (MIRANDA et al., 1996).

Alterações nucleares, sustentadas por modificações na expressão de determinados oncogenes que atuam em sítios específicos da célula, parecem ser uma característica intrínseca do câncer (PIENTA et al., 1989). von HANSEMAN (1890) foi o primeiro a postular que anormalidades da morfologia nuclear em células tumorais poderiam estar relacionadas com suas propriedades biológicas e comportamento clínico, e, somente, quase 100 anos depois é que evidências bioquímicas e genéticas deram o suporte necessário para a noção de que o comportamento aberrante das células se devia a lesões genéticas dentro dos seus núcleos (UNDERWOOD, 1990).

O tamanho, forma e textura de núcleos de células tumorais são registrados como características importantes no diagnóstico e classificação de determinadas neoplasias, e, certas características como o pleomorfismo, picnose e figuras mitóticas são tão comuns e gerais em tecidos neoplásicos que são utilizadas como parâmetros relevantes na distinção entre lesões benígnas e malignas (UNDERWOOD, 1990). Destas características, o pleomorfismo nuclear, que reflete distúrbios na ploidia nuclear e síntese de DNA, está intimamente relacionado com a atividade proliferativa e agressividade dos tumores, inclusive nos tumores de mama (KIMITOWSKI & JANSON, 1990). Núcleos de forma irregular foram observados em todos os clones de células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas ou não. Entretanto, nas células dos clones transformados pela exposição ao benzo[a]pireno, e, em especial nas células do clone transfectado com o oncogene c-Ha-ras se observa um pleomorfismo nuclear mais acentuado.

Vários relatos na literatura tentam associar alterações de tamanho, forma e textura cromatínica com o diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de mama (BAAK et al., 1985; KOMITOWSKI & JANSON, 1990; AALTOMAA et al., 1991; TAJIMA et al., 1991; SKJORTEN et al., 1991; PIENTA et al., 1991). Nossos resultados mostram que alterações nucleares e cromatínicas podem ser associadas à transformação química das células MCF-10F pelo benzo[a]pireno.

De uma forma geral, houve uma diminuição do tamanho e perímetro dos núcleos, e, estes passaram a apresentar formas mais irregulares com a transformação das células MCF-10F pelo benzo[a]pireno (Tabelas 5, 8 e 10). A predominância de núcleos menores nestes clones se deva, provavelmente à perda de DNA e/ou à compactação cromatínica, á semelhança do que foi verificado em núcleos de células de carcinomas renais por VIDAL (1992). Uma diminuição nas quantidades Feulgen-DNA, como avaliadas pelas densidades ópticas integradas (IOD - do inglês “integrated optical densities”) associada a um aumento das densidades ópticas (OD - do inglês “optical densities”) nucleares são indicativas da presença de aneuploidia (hipoploidia) e de distribuição heterogênea de cromatina mais condensada nos núcleos dos clones de células tumorigênicas (VIDAL et al., 1996a). Desta forma, estes achados confirmam a hipótese levantada pelas comparações morfométricas de núcleos de células MCF-10F, corados com azul de toluidina (método variante de CEC).

Os núcleos das células do clone BP1-Tras não diferem estatisticamente dos núcleos das células MCF-10F (controle) quanto aos parâmetros de área, perímetro e fator forma nucleares (Tabela 5, 8 e 10). A variação dos valores de área Feulgen absorvente e conteúdos Feulgen-DNA dos núcleos das células do clone BP1-Tras (MELLO et al., 1996) comprovam o

comportamento diferenciado destas células em relação aos demais clones celulares quimicamente transformados (BP1, BP1-E e BP1-E1).

Alterações na estrutura cromatínica estão geneticamente relacionadas à modificações na expressão gênica (FELSENFELD et al., 1996; STEGER & WORKMAN, 1996), e, fenotipicamente relacionadas a modificações nos estados de compactação cromatínica, caracterizando diferentes fenótipos nucleares (MELLO & CHAMBERS, 1994; MELLO et al., 1992, 1994, 1995). Os fenótipos nucleares mais frequentemente observados nas preparações de células MCF-10F coradas com o método de banda C (modificado de SUMNER, 1972), que evidencia regiões de heterocromatina constitutiva, foram caracterizados por: 1) áreas cromatínicas mais intensamente coradas de distribuição densa homogênea; 2) áreas cromatínicas pouco coradas segundo uma trama filamentosa, mostrando poucos grânulos mais intensamente corados; 3) áreas cromatínicas com abundantes grânulos grossos de distribuição irregular (Figs. 3-7). Estes diferentes fenótipos nucleares especificados qualitativamente podem estar relacionadas à diferentes fases do ciclo celular ou acentuados pelo próprio processo de transformação e progressão tumorigênica das células MCF-10F. Embora, as avaliações por análise de imagem de parâmetros espectrais em núcleos corados pela reação de Feulgen, realizadas por MELLO et al. (1996) e Vidal et. al. (1996a) nos diferentes clones de células MCF-10F, se constituam em procedimentos mais adequados na caracterização de diferenças de supraorganização ou textura cromatínica que possam ser associadas à progressão tumorigênica de células MCF-10F, nossas observações são relevantes pois são sugestivas de alterações de textura cromatínica nestes núcleos corados pelo método de banda C.

O tamanho dos nucléolos das células dos clones BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras, que expressam o fenótipo tumorigênico, aumentou com a transformação

induzida pelo benzo[a]pireno e pela transfecção com o oncogene humano c-Ha-ras, quando comparado ao tamanho dos nucléolos das células dos clones BP1(transformado) e MCF-10F (controle) (Tabela 6). Entretanto, um aumento de perímetro e predominância de nucléolos de formas mais irregulares foram observadas somente nos clones BP1-E e BP1-E1 (Tabelas 8 e 11). Quanto ao número de nucléolos, observou-se uma diminuição no número de nucléolos nas células dos clones BP1-E1 e BP1-Tras, quando comparado aos demais clones celulares (Tabela 12).

O nucléolo têm um papel chave na célula no que diz respeito ao processo de síntese protéica, pois é o sítio de síntese e processamento de RNA ribossomal, e, está envolvido ativamente na síntese e distribuição de RNA nuclear e citoplasmático (KAMEL et al., 1990). Esta organela é composta de quatro componentes principais, além de enzimas e proteínas estruturais e funcionais: os centros fibrilares, os componentes fibrilares, os componentes granulares e cromatina associada (SCHEER & WEISENBERGER, 1993; SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993). A organização e proporções destes componentes, assim como, a posição, número, forma e tamanho nucleolar em um determinado tipo celular pode variar amplamente, dependendo do grau de diferenciação, estágio do ciclo celular ou condição patológica. Em geral, células em proliferação ou ativas metabolicamente têm nucléolos mais proeminentes e em maior número (KAMEL et al., 1989).

O nucléolo sempre foi reconhecido como uma organela celular que se torna proeminente em lesões proliferativas, especialmente as neoplásicas, e, para muitos patologistas, a simples presença do nucléolo já é um indicativo de malignidade naqueles tecidos onde as proliferações benignas têm nucléolos inconspícuos. O aumento do número e tamanho nucleolar é comumente observado

e relacionado ao diagnóstico, prognóstico e estadiamento do câncer de mama (HELPA et al., 1989; van DIEST et al., 1990; TAJIMA et al., 1991).

O aumento da área nucleolar observado nas células dos clones BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras pode estar relacionado a um aumento da atividade de transcrição de rRNA nestas células com a transformação neoplásica induzida pela exposição ao benzo[a]pireno ou a transfecção do oncogene c-Ha-ras, corroborando também com esta hipótese o fato de que os corpos parecidos com nucléolos (nucleolus-like bodies) serem pequenos e escassos nas células em divisão destes clones. Contudo, não foi observado existir uma correlação entre o aumento do número de nucléolos e a aquisição do fenótipo tumorigênico em células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, *in vitro*, quando confrontados com dados da literatura referentes as observações sobre o desenvolvimento do câncer de mama *in vivo*. Enquanto, o número de nucléolos não se mostrou alterado nas células dos clones BP1 e BP1-E, com a transformação pelo benzo[a]pireno, uma diminuição do número de nucléolos nas células dos clones BP1-E e BP1-Tras pode estar relacionada, provavelmente, a ocorrência de fusão nucleolar.

VI- Considerações finais.

Os principais achados observados com a progressão neoplásica de células MCF-10F, induzida pela exposição ao benzo[a]pireno e pela transfecção do oncogene c-Ha-ras estão resumidos na Tabela 13.

O rRNA em relocação durante a mitose de células MCF-10F, transformadas ou não, parece participar de uma complexa arquitetura que envolve os cromossomos na placa metafásica e passa a se distribuir ao longo do fuso mitótico, entre as massa cromossômicas em migração para os polos, vindo a constituir em parte os corpos pré-nucleolares nas células-filhas resultantes, como já descrito para as células MCF-10A em divisão (MELLO, 1995). A distribuição de rRNA relocado com a divisão celular não é coincidente com a distribuição de proteínas AgNOR⁺ (ROUSSEL et al., 1994; MELLO, 1995), proteínas passageiras e snRNAs (AZUM-GÉLADE et al., 1994; GAUTIER et al., 1992, 1994), indicando funções celulares distintas destas, talvez estrutural, embora ambas parecem ser incorporadas aos corpos pré-nucleolares na telófase. Os achados de metacromasia menos intensa do RNA relocado e de maior escassez de corpos semelhantes a nucléolos durante a divisão celular nas células MCF-10F transformadas são sugestivos de redução nestas de conteúdos rRNA excedentes, talvez com vantagens energéticas.

Visto que aductos de BPDE-DNA (B[a]P-N2-guanina) e (B[a]P-N6-adenina)-aductos) podem bloquear a transcrição gênica e causar alterações na estrutura cromatínica (CHEN et al., 1992; KOCH et al., 1993), e, que a transformação das células MCF-10F pelo benzo[a]pireno foi acompanhada por várias alterações em genes importantes que regulam o crescimento e diferenciação destas células (ZHANG et al., 1995), estes se constituem em importantes fatos que

Tabela 13 - Alterações nucleares e nucleolares observadas durante a progressão neoplásica de células epiteliais mamárias humanas, MCF - 10F, transformadas pelo benzo[a]pireno e transfectadas pelo oncogene c-Ha-ras.

Características Avaliadas	Clones Transformados			
	BP1	BP1-E	BP1-E1	BP1-Tras
Cinética Nuclear :				
Proliferação Celular	→	↑	↑	↑
Apoptose	→	→	→	↑
Alterações Nucleares :				
Tamanho	↓	↓	↓	→
Perímetro	↓	↓	↓	→
Forma	I	I	I	R
Alterações Nucleolares :				
Tamanho	→	↑	↑	↑
Perímetro	→	↑	↑	→
Forma	R	I	I	R
Número	→	↓	→	↓
Alterações Celulares :				
Binucleação	→	→	→	→
Multinucleação	→	→	→	↑
Células Gigantes	→	→	→	→
Micronucleação	→	→	→	↑
Relocação de rRNA	→	→	→	→
Presença de “nucleolus-like bodies”	↓	↓	↓	↓

onde : → = não se alterou em relação as células MCF-10F; ↑ = aumentou em relação as células MCF-10F; ↓ = diminuiu em relação as células MCF-10F; R = núcleos ou nucléolos com formas mais regulares; I = núcleos ou nucléolos com formas mais irregulares.

podem dar suporte aos achados de alterações nucleares e cromatínicas observadas com a transformação induzida pela exposição ao benzo[a]pireno. A instabilidade genética das células BP1-Tras induzidas pela transfecção do oncogene c-Ha-ras leva a alterações nucleares particulares, como micro e multinucleação, alterações cromatínicas e de conteúdo de DNA, como observado também por outros autores em outros tipos celulares (MELLO et al., 1994; DENKO et al., 1995; MIRANDA et al., 1996), que indicam a existência de mecanismos morfofuncionais distintos e complexos que envolvem a progressão neoplásica de células MCF-10F *in vitro*.

VII- Abstract.

Cellular and nuclear morphophysiological changes were investigated by cytochemistry and image analysis in clones of human breast epithelial cells, MCF-10F, transformed by benzo[a]pyrene and expressing different stages of progression to neoplastic transformation (BP1, BP1-E and BP1-E1 clones), and additionally transfected with the c-Ha-ras oncogene (BP1-Tras).

A mitotic index increase was observed with the neoplastic progression. On the other hand, an increase in frequency of apoptotic cells, as identified by a critical electrolyte concentration method, was only observed in BP1-Tras cells.

RNA relocation during mitosis, identified by a metachromatic response, was found to differ when comparing nontransformed and transformed MCF-10F cells. The exception refers to the presence of nucleolus-like bodies found close to the chromosomal plate at metaphase or to the spindle in subsequent mitotic phases. These bodies were not abundant in nontransformed MCF-10F cells, and become much more scarce in the transformed cells, possibly due to decrease in surplus RNA involved.

Nuclear pleomorphism was predominant in the cell clones expressing tumorigenesis phenotypes (BP1-E, BP1-E1 and BP1-Tras cells). Nuclear abnormalities such as karyorhexis, karyolysis, multinucleation and micronucleation were more frequent in BP1-Tras cells. All cell clones exhibited binucleate and giant cells, but no change in their frequencies could be detected when comparing the various cell clones. Some nuclear phenotypes could be characterized in the nontransformed and transformed cells. However, they may be associated with the neoplastic progression or even with different cell cycle phases.

A decrease in nuclear area, perimeter and form factor, but an increase in nucleolar area and perimeter were found with advancing tumorigenesis process in the benzo[a]pyrene-transformed cells. These changes may be due to a decrease in Feulgen-DNA amounts (hypodiploidy) and/or increase in chromatin packing states, although an increased transcriptional activity occurs at the nucleolar level. In particular, the nuclear sizes and perimeter of BP1-Tras cells increased as compared to those of BP1, BP1-E and BP1-E1 cells, but were not found to differ from values of the nontransformed MCF-10F cells. The nuclear area and perimeter increase may be associated to a certain aneuploidy degree promoted by the ras-transfection. Nucleolus sizes and numbers in BP1-E and BP1-Tras cells were found to differ from those of MCF-10F, BP1 and BP1-E1 cells, and nucleolar sizes increasing with the decrease in nucleolus numbers were observed in BP1-E BP1-Tras cells. Nucleolus fusion and enlargement certainly reflect metabolic activities enhanced in BP1-E and BP1-Tras cells when comparing these to the other cell clones.

The nuclear morphometry data on the benzo[a]pyrene-transformed cells and on those additionally transfected by the c-Ha-ras oncogene indicated the existence of complex and distinct morphofunctional mechanisms involving of the *in vitro* transformation of the MCF-10F cells. The increase in frequency of micronuclei and multinucleate cells and in aneuploidy in the BP1-Tras cell clone could be related to the genomic instability induced by ras-transfection.

VIII- Resumo.

Alterações morfofisiológicas celulares e nucleares foram investigadas através de métodos citoquímicos e de análise de imagem em células epiteliais mamárias humanas, MCF-10F, transformadas com o benzo[a]pireno, e que expressam diferentes estágios da progressão tumoral (clones BP1, BP1-E e BP1-E1), e, adicionalmente, num clone transfectado com o oncogene c-Ha-ras (BP1-Tras).

Um aumento no índice mitótico foi observado com a progressão neoplásica. Por outro lado, um aumento em células apoptóticas, evidenciadas por uma variante do método de concentração crítica de eletrólitos, foi observado somente nas células BP1-Tras.

Relocação de RNA durante a mitose, identificável por resposta metacromática, não diferiu quando se compararam células MCF-10F transformadas e não transformadas, exceto com relação à presença de corpos semelhantes a nucléolos (“nucleolus-like bodies”) encontrados próximos à placa cromossômica na metáfase ou ao fuso nas fases mitóticas subsequentes. Estes corpos não foram abundantes nas células MCF-10F não transformadas e se tornaram mais escassos ainda nos clones celulares transformados, talvez por menores quantidades de RNA excedentes estarem envolvidas em tais condições.

Pleomorfismo nuclear foi predominante nos clones celulares que expressam o fenótipo tumorigênico (BP1-E, BP1-E1 e BP1-Tras). Anormalidades nucleares tais como, cariorréxis, cariólise, multinucleação e micronúcleos foram mais frequentes nas células BP1-Tras. Todos os clones exibiram células binucleadas e gigantes, mas nenhuma alteração nas suas frequências puderam ser detectadas quando os vários clones celulares foram comparados entre si. Alguns

fenótipos nucleares puderam ser caracterizados nas células transformadas e não transformadas. Entretanto, estes poderiam estar associados com a progressão neoplásica, ou mesmo, com as diferentes fases do ciclo celular.

Uma diminuição na área, perímetro e fator forma nucleares, mas um aumento na área e perímetro nucleolares foram encontrados com o avanço do processo tumorigênico nas células transformadas com o benzo[a]pireno. Estas alterações podem ser devidas a uma diminuição nas quantidades Feulgen-DNA (hipodiploidia) e/ou a um aumento nos estados de empacotamento cromatínico, embora um aumento na atividade transcripcional ocorra a nível nucleolar. Em particular, os tamanhos e perímetros nucleares das células BP1-Tras aumentaram quando comparados aos das células BP1, BP1-E e BP1-E1, mas não diferiram dos valores para células MCF-10F não transformadas. O aumento na área e no perímetro nuclear pode estar associado a uma certa aneuploidia promovida pela transfecção com o oncogene c-Ha-ras. Os tamanhos e número de nucléolos nas células BP1-E e BP1-Tras diferiram dos das outras células, e, um aumento da tamanho nucleolar com uma diminuição do número de nucléolos foi observado ocorrer nas células BP1-E e BP1-Tras. Fusão nucleolar e aumento em tamanho certamente refletem atividades metabólicas aumentadas nas células BP1-E e BP1-Tras quando comparadas aos outros clones celulares.

Os dados de morfometria nuclear nos clones celulares transformados pelo benzo[a]pireno e transfectados com o oncogene c-Ha-ras indicam a existência de mecanismos morfofuncionais distintos e complexos que envolvem a progressão neoplásica de células MCF-10F *in vitro*. O aumento na frequência de células micronucleadas e multinucleadas e aneuploidia nas células BP1-Tras poderia estar relacionado à instabilidade genética induzida pela transfecção do oncogene ras.

IX- Referências Bibliográficas.¹

- AALTOMAA, S., LIPPONEN, P., ESKELINEN, M., ALHAVA, E., SYRJÄNEN, K. Nuclear morphometry and mitotic indexes as prognostic factors in breast cancer. **Eur. J. Surg.**, v. 157, p. 319-324, 1991.
- ADAMI, H-O, ADAMS, G., BOILYE, P., EWERTZ, M., LEE, N.C., LUND, E., MILLER, A.B., OLSSON, H., STELL, M., TRICHOPOULOS, D., TEILINIUS, H. Chapter II: Breast cancer etiology. **Int. J. Cancer (Suppl 5)**, p.22-39, 1990.
- AGAPOVA, L. S., ILYINSKAYA, G. V., TUROVETS, N. A., IVANOV, A. V., CHUMAKOV, P.M., KOPNIN, B.P. Chromosome changes caused by alterations of p53 expression. **Mutation Res.**, v. 354, p. 129-138, 1996.
- ARENDS, M.J., MCGREGOR, A.H., TOFT, N.J., BROWN, E.J.H., WLYLLIE, A.H. Susceptibility to apoptosis is differentially regulated by *c-myc* and mutated *Ha-ras* and is associated with endonuclease availability. **Br. J. Cancer**, v. 68, p. 1127-1133, 1993.
- ARENDS, M.J., ANGUS, H., MCGREGOR, A.H., WLYLLIE, A.H. Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed *myc*, *ras*, and HPV oncogenes. **Amer. J. Pathol.**, v. 144, p. 1045-1057, 1994.
- AUBELE, M., AUER, G., FALKMER, U., VOSS, A., RODENACKER, K., JÜTTING, U., HÖFLER, H. Identification of a low-risk group of stage I breast cancer patients by cytometrically assessed DNA and nuclear texture parameters. **J. Pathol.**, v. 177, p. 377-384, 1995.
- AVRAHAM, H. *rho* gene amplification and malignant transformation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 168, 114-124, 1990.
- AZUM-GÉLADE, M.C., NOAILLAC-DEPEYRE, J., CAIZERGUES-FERRER, M., GAS, N. Cell cycle redistribution of U3snRNA and fibrillarin. Presence in the cytoplasmic nucleolus remnant and in the prenucleolar bodies at telophase. **J. Cell Sci.**, v.107, p. 463-475, 1996.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 1989. 19p

- BAAK, J.P.A., VAN DOP, H., KURVER, P.H.J., HERMANS, J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. **Cancer**, v. 56, p. 374-382, 1985.
- BAAK, J.P.A. Mitosis counting in tumors. **Human Pathol.**, v.21, p. 683-685, 1990.
- BALMAIN, A., BROWN, K. Oncogene activation in chemical carcinogenesis. **Adv. Cancer Res.**, v. 51, p. 147-182, 1988.
- BAND, V., ZAGETOWSKI, D., KULESA, V., SAGER, R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. **Proc. Natl. Acad. USA**, v. 87, p. 4631-4667, 1990.
- BARNABAS, N., MORAES, R., CALAF, G., ESTRADA, S., RUSSO, J. Role of p53 in MCF - 10F cell immortalization and chemically - induced neoplastic transformation. **J. Int. Onc.**, v. 6, p. 963-968, 1995.
- BASOLO, F., ELLIOTT, J., TAIT, L., RUSSO, J. Transformation of human breast epithelial cells by c-Ha-ras oncogene. **Mol. Carcinogen.**, v. 4, p. 25-35, 1991.
- BEDI, A., PASRICHA, P.J., AKHTAR, A.J., BARBER, J.P., BEDI, G.C., GIARDIELLO, F.M., ZEHNHANNER, B.A., HAMILTON, S.R., JONES R.J. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. **Cancer Res.**, v. 55, p. 1811-1816, 1995.
- BELINSKY, S.A., ANDERSON, M.W. Activation of the *ras*-proto-oncogene in rodent model systems: implications for understanding mechanisms of carcinogenicity. In: News horizons in molecular toxicology: a symposium sponsored by the Toxicology Division of Lilly Research Laboratories. PROBST, G.S., VODIWIK, M.J., BORATO, M.A. (eds.), 1991.
- BIESTERFELD, S., NOLL, I., NOLL, E., WOHLTMANN, D., BÖCKING, A. Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer. **Human Pathol.**, v. 26, p. 47-52, 1995.

- BODELL, W.J., DEVANESAN, P.D., ROGAN, E.G., CAVALIERI, E.L. 32-P-postlabeling analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in vivo. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 2, p. 312-315, 1989.
- BOGUSKI, M.S., McCORMICK, F. Proteins regulating RAS and its relatives. **NATURE**, v.366, p.643-654, 1993.
- BOKOCH, G.M., DER, C.J. Emerging concepts in the RAS superfamily of GTP-binding proteins. **FASEB J.**, v. 7, p. 750-759, 1993.
- BOREK, C. X-ray-induced in vitro neoplastic transformation of human diploid cells. **Nature**, v. 283, p. 776-778, 1980.
- BORING, C.C., SQUIRES, T.S., TONG, T. Cancer statistics, 1991. **C.A. Cancer J. Clin.**, v.41, p. 19-36, 1992.
- BOS, J.L. *ras* Oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, v. 49, p. 4682-4689, 1989.
- BOS, J.L., KREIJ, C.F. Genes and gene products that regulate cell proliferation: Critical targets in carcinogenesis. In. VAINIO, H., MAGEE, P.N., McGREGOR, D.B., McMICHAEL, A.J (eds.). Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. Lyon, **IARC. Sci. Publ.**, n^o. 116, p.57-62, 1992.
- BRASCH, K., OCHS, R.L. Nuclear bodies (Nbs): A newly "rediscovered" organelle. **Exp. Cell Res.**, v. 202, p. 211-223, 1992.
- BRINKLEY, B.R. The fine structure of the nucleolus in mitotic divisions of Chinese hamster cells in vitro. **J. Cell Biol.**, v.27, p. 411-422, 1965.
- CALAF, G., RUSSO, J. Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 483-492, 1993.
- CALAF, G., ZHANG, P.L., ALVARADO, M.V., ESTRADA S., RUSSO, J. c-Ha-*ras* enhances the neoplastic transformation of human breast epithelial cells treated with chemical carcinogens. **Intern. J. Oncol.**, v.6, p.5-11, 1995.
- CHANG, S.E. In vitro transformation of human epithelial cells. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 823, p. 161-194, 1986.

- CHEN, R.H., MAHER, V.M., BROUWER, J., van de PUTTE, P., McCORMICK, J.J. Preferential repair and strand-specific repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in HPRT gene of diploid human fibroblasts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 5413-5417, 1992.
- COHEN, G.M., SUN, X-M., SNOWDEN, R.T., DINSDALE, D., SKILLETER, D.N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. **Biochem. J.**, v. 286, p. 331-334, 1992.
- COLLINS, R.J., HARMON, B.V., GOBÉ, G.C., KERR, J.F.R. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. **Int. Radiol. Biol.**, v. 61, p. 451-453, 1992.
- CONNEY, A.H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. **Cancer Res.**, v. 42, p. 4875-4917, 1982.
- COOPER, C.S., GROVER, P.L., SIMS, P. The metabolism and activation of benzo[a]pyrene. **Prog. Drug Metab.**, v. 7, p. 295-396, 1983.
- CROSS, S.M., SANCHEZ, C.A., MORGAN, C.A., SCHIMKE, M.K., RAMEL, S., IDZERDA, R.L., RASKIND, W.H., REID, B.J. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. **Science**, v. 267, p. 1353-1356, 1995.
- DEITCH, A.D. Cytochemistry of proteins. In: **Introduction to quantitative cytochemistry**. Ed.: G.L. WIED. New York/London:Academic Press. p.452-468, 1966.
- DENKO, N.C., GIACCIA, A.J., STRINGER, J.R., STAMBROOK, P.J. The human Ha-*ras* oncogene genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 5124-5128, 1994.
- DENKO, N., STRINGER, J., WANI, M., STAMBROOK, P. Mitotic and post mitotic consequences of genomic instability induced by oncogenic Ha-*ras*. **Somatic Cell Mol. Genet.**, v. 21, p. 241-253, 1995.
- EL-BAYOUMY, K. Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 585-590, 1992.

- ESKELINEN, M.J., LIPPONEN, P.K., COLLAN, Y., SYRJÄNEN, K.J. The role of nucleolar organizer regions as prognostic factors in breast cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 27, p. 989-992, 1991.
- EVAN, G.I., BROWN, L., WHYTE, M., HARRINGTON, E. Apoptosis and cell cycle. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 825-834, 1995.
- FARBER, E. The multistep nature of cancer. **Cancer Res.**, v. 44, p. 4217-4223, 1984.
- FEARON, E.R., VOGELSTEIN, B.. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, p.759-767, 1990.
- FEARON, E.R., JONES, P.A. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. **FASEB J.**, v.6, p.2783-2790, 1992.
- FELSENFELD, G., BOYES, J., CHUNG, J., CLARK, D., STUDITSKY, V. Chromatin structure and gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.9384-9388, 1996.
- FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Res.**, v. 285, p. 35-44, 1993.
- FERNANDEZ-SARABIA, M.J., BISCHOFF, J.R. Bcl-2 associates with the *ras*-related protein R-ras p23. **Nature**, v. 366, p.274-275, 1993.
- GAUTIER, T., DAUPHIN-VILLEMANT, C., ANDRÉ, C., MASON, C., ARNOULT, J., HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification and characterization of a new set of nucleolar ribonucleoproteins which line the chromosomes during mitosis. **Exp. Cell Res.**, v. 200, p. 5-15, 1992.
- GAUTIER, T., FOMPROIX, N., MASSON, C., AZUM-GÉLADE, M.C., GAS, N., HERNANDEZ-VERDUN, D. Fate of specific nucleolar perichromosomal proteins during mitosis: Cellular distribution and association with U3 snoRNA. **J. Biol. Cell**, v. 82, p. 81-93, 1994.

- GAO, Q., HAUSER, S.H., LIU, X-L, WAZER, D.E., MADOC-JONNES, H., BAND, V. Mutant p53-induced immortalization of primary human mammary epithelial cells. **Cancer Res.**, v.56, p. 3129-3133, 1996.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v. 119, p. 493-501, 1992.
- GELBOIN, H.V. Benzo[a]pyrene metabolism, activation, and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. **Physiol. Rev.**, v.60, p. 1107-1166, 1980.
- GERSCHENSON, L.E., ROTELLO, R.J. Apoptosis: a different type of cell death. **FASEB J.**, v. 6, p. 2450-2455, 1992.
- GIRI, D.D., NOTTINGHAM, J.F., LAWRY, J., DUNDAS, .A.C., UNDERWOOD, J.C.E. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. **J. Pathol.**, v. 157, p. 307-313, 1989.
- GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinominal populations. **Ann. Math. Statist.**, v. 35, p. 716-725, 1964.
- GREENBLATT, M.S., BENNETT, W.P., HOLLSTEIN, B.M., HARRIS, C.C. Mutations in the *p53* tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4855-4878, 1994.
- HARRIS, C.C. Human tissues and cells in carcinogenesis research. **Cancer Res.**, v. 47, p. 1-10, 1987.
- HARRIS, J.R., LIPPMAN, M.E., VERONESE, U., WILLET, W. Breast cancer(First of the three parts). **N. Engl. J Med.**, v. 327, p. 319-328, 1992.
- HARTWELL, L.H., KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-1828, 1994.
- HELPAP, B. Nucleolar grading of breast cancer: Comparative studies on frequency and localization of nucleoli and histology, stage, hormonal receptor status and lectin histochemistry. **Virchows Archiv. A Pathol.**, v. 415, p. 501-

508, 1989.

HERNANDEZ-VERDUN, D., HUBERT, J., BOURGEOIS, C.A., BOUTEILLE, M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures. **Chromossoma**, v. 79, p. 349-362, 1980.

HOFSTÄDTER, F., KNÜCHEL, R., RÜSCHOFF, J. Cell proliferation assessment in oncology. **Virchows Arch.**, v. 427, p. 323-341, 1995.

HOLLSTEIN, M., SIDRANSSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C. p53 mutations in human cancers. **Science**, v., 253, p. 49-53, 1991.

HURLIN, P.J., MAHER, V.M., McCORMICK, J.J. Malignant transformation of human fibroblastis caused by expression of a transfected T24 HRAS oncogene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.187-191, 1989.

IARC. "Polynuclear aromatic compounds, Part 3, Industrial exposures in aluminium production coal gasification, coke production and iron and steel fouding, v. 34". Lyon, France: **IARC**, pp.39-41, 1993.

ICHIKAWA, T., KYPRIANOU, N., ISAACS, J.T. Genetic instability and acquisition of metastatic ability by rat mammary cancer cells following v-Ha-ras oncogene transfection. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6349-6357, 1990.

JANNINK, I., van DIEST, P.J., BAAK, J.P.A. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: Classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. **Hum. Pathol.**, v. 26, p. 1086-1092, 1995.

JIMÉNEZ, B., ARENDS, M., ESTEVES, P., PERONA, R., SANCHEZ, R., RAMÓN y CAJAL, S., WYLLIE, A., LACAL, J.L. Induction of apoptosis in NIH 3T3 cells after serum deprivation by overexpression of *rho*-p21, a GTPase protein of the *ras* superfamily. **Oncogene**, v. 10, p.811-816, 1995.

KAMEL, H.M.H., KIRK, J., TONER, P.G. Ultrastructural pathology of the nucleus. **Curr. Opinon. Pathol. : Pathology of the nucleus**. J.C.E. UNDERWOOD (ed.). Springer-Verlag, Berlin.v.32, p. 16-65, 1990.

- KASTAN, M.B., ONYEKWERE, O., SIDRANSKY, D., VOGELSTAIN, B., CRAIG, R.W. Participation of p53 protein in cellular response to DNA damage. **Cancer Res.**, 51, p. 6304-6311, 1991.
- KELSLEY, J., BERKOWITZ, G.S. Breast cancer epidemiology. **Cancer Res.**, v. 48, p. 5615-5623, 1988.
- KENYON, K., COTENTE, S., TRACKMAN, P.C., TANG, J., KAGAN, H.M., FRIEDMAN, R.M. Lysyl oxidase and *rrg* messenger RNA. **Science**, v. 253, p. 802, 1991
- KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.
- KIER, L., BRUSICK, D., AULETTA, A., VON HALLE, E., BROWN, M., SIMMON, V., DUNKEL, V., McCANN, J., MORTELMANS, K., PRIVAL, M., RAO, T., RAY, V. The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Res.**, v. 168, p. 69-240, 1986.
- KING, K., CIDLOWSKI, J.A. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. **J. Cell Biochem.**, v.58, p. 175-180, 1995.
- KOCH, K.S., FLETCHER, R.G., GROND, M.P., INYANG, A.I., LU, X.P., BRENNER, D.A., LEFFERT, H.L. Inactivation of plasmid report gene expression by one benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct in adult rat hepatocytes. **Cancer Res.**, v. 53, p. 2279-2286, 1993.
- KOMITOWSKI, D., JANSON, C., Quantitative features of chromatin structure in the prognosis of breast cancer. **Cancer**, v. 65, p. 2725-2730, 1990.
- KUO, M-L., CHOU, Y-W., CHAU, Y-P., MENG, T-C. Differential induction of apoptosis in oncogene-transformed NIH 3T3 cells by methylmethanesulfonate. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 481-488, 1996.
- KUROKI, T., CHIDA, K., HOSOMI, J., KONDO, S. Use of human epidermal cells in study of carcinogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 92, p. 271s-274s, 1989.

- LANE, D.P. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, p. 15-16, 1992.
- LEVINE, A.J., PERRY, M.E., CHANG, A., SILVER, A., DITTMER, D., WU, M., WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v. 69, p. 409-416, 1994.
- LEVINGSTONE, L.R., WHITE, A., SPROUSE, J., LIVANOS, E., JACKS, T., TLSTY, T.D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. **Cell**, v. 70, p. 923-935, 1992.
- LI, D., MIANYING, W., DHINGRA, K., HITTELMAN, W.N. Aromatic DNA adducts in adjacent tissues of breast cancer patients: Clues to breast cancer etiology. **Cancer Res.**, v.56, p.287-293, 1996.
- LOWY, D.R., WILLUMSEN, B.M. Function and regulation of RAS. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 851-891, 1993.
- MCCORMICK, J.J., MAHER, V.M. Towards an understanding of the malignant transformation of diploid human fibroblasts. **Mutation Res.**, v. 199, p. 273-291, 1988.
- McMANUS, M.E., BURGESS, W.M., VERONESE, M.E., HUGGETT, A., QUATTROCHI, L.C., TUKEY, R.H. Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochromes P-450. **Cancer Res.**, v. 50, p. 3367-3376, 1990.
- MAJNO, G., JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 3-15, 1995.
- MANSUR, C.D., ANDROPHY, E.J. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1155, p. 323-345, 1993.
- MARSHALL, E. Search for a killer: Focus shifts from fat to hormones. **Science**, v.259, p. 618-621, 1993.
- MELLO, M.L.S. Relocation of RNA metabolism at mitosis. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 28, p.149-154, 1995.

- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C. Critical electrolyte concentration of the heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. **Cytobios**, v. 59, p. 87-93, 1989.
- MELLO, M.L.S., RUSSO, J.. Image analysis of Feulgen-stained c-H-ras-transformed NIH/3T3 cells. **Biochem. Cell Biol.**, v.68, p.1026-1031, 1990.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; GOLEMBIESKI, W., RUSSO, J.. Image analysis of Feulgen-stained NIH/3T3 cells transformed with DNA of 4-nitroquinoline 1-oxide treated human breast epithelial cells. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 70, p. 109-116, 1992.
- MELLO, M.L.S., VIDAL, B.C., DANTAS, M.M., MONTEIRO, A.L.P. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 26, p. 1-3, 1993.
- MELLO, M.L.S., CHAMBERS, A.F.. Image analysis of Feulgen-stained transformed NIH/3T3 cells differing in p21 expression and ras-induced metastatic ability. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, 16: 113-123, 1994.
- MELLO, M.L.S., LIN, T.Y., RUSSO, J.. Scanning microphotometry image analysis of Ha-ras-transformed human breast epithelial cells. **Anal. Cell. Pathol.**, v.7, p.301-319, 1994.
- MELLO, M.L.S., CONTENTE, S., VIDAL, B.C., PLANDING, W., SCHENCK, U. Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization assessed by image analysis. **Exp. Cell Res.**, v. 220, p. 374-382, 1995.
- MELLO, M. L. S., RUSSO, J., VIDAL, B. C. Feulgen - DNA amounts in benzo[a]pyrene - transformed human breast epithelial cells subjected to transfection with c-Ha-ras oncogene. In: **IV Congresso da Associação Latino-Americana de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (ALAMCTA)**, Viña del mar, Chile, 1996, p.106.
- METTLIN, C. Breast cancer risk factors: Contributions to planning breast cancer control. **Cancer**, (Suppl) v. 69, p. 1904-1910, 1992.
- MILLER, E.C., MILLER, J., Mechanisms of the chemical carcinogenesis. **Cancer**,

v. 47, p. 1055-1064, 1981.

MILO, G.E., OLDHAM, J.W. ZIMMERMAN, R., HATCH, G.G., WEISBRODE, S. Charecterization of human cells transformed by chemical and physical carcinogenes. **In Vitro**, v. 17, p. 719-729, 1981a.

MILO, G.E., WEISBRODE, S.A., ZIMMERMAN, R., McCLOSKEY, J.A. Ultraviolet radiation-induced neoplastic transformation of normal human cells, in vitro. **Chem. Biol. Interact.**, v. 36, p. 45-59, 1981b.

MIRANDA, E.I., SANTANA, C., ROJAS, E., HERNÁNEZ, S., OSTRSKY-WEGMAN, P., GARCÍA-CARRANCÁ, A. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-Ha-ras. **Mutation Res.**, v. 349, p. 173-182, 1996.

MÜNGER, K., PHILPS, W.C. The human papillomavirus E7 protein as a transforming and transactivating factor. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1155, p. 111-123, 1993.

NEWBOLD, R.F., CUTHBERT, A.P., THEMIS, M., TROTT, D.A., BLAIR, A.L., LI, W. Cell immortalization as a key, rate-limiting event in malignant transformation-approaches toward a molecular genetic analysis. **Toxicol. Lett.**, v. 67, p.211-230, 1993.

NOËL, J.S., DEWEY, W.C., ABEL, J.H., THOMPSON, R.P. Ultrastructure of the nucleolus during the Chinese hamster cell cycle. **J. Cell Biol.**, v. 40, p. 830-847, 1971.

OCHS, R.L., STEIN Jr, T.W., TAN, E.M. Coiled bodies in the nucleolus of breast cancer cells. **J. Cell Sci.**, v.107, p. 385-399, 1994.

OZBUN, M.A., BUTEL, J.S. Tumor suppressor *p53* mutations and breast cancer: a critical analysis. **Adv. Cancer Res.**, v. 66, p. 71-141, 1995.

PEROTTI, M., TODDEI, F., MIRABELLI, F. Calcium-dependent DNA fragmentation in human synovial cells exposed to cold shock. **FEBS Lett.**, v. 259, p. 331-334, 1990.

PHILLIPS, D.H. Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature*, v. 303, p. 468-472, 1983.

- PHILLIPS, D.H., GROVER, P.L. Biologically-active and chemically-reactive polycyclic hydrocarbon metabolites. In: BERLIN, A., DRAPER, M., HEMMINKI, K., VAINIO, H. Monitoring human exposure to carcinogenic and mutagenic agents. Lyon, **IARC. Sci. Publ.**, no. 59, p. 47-61, 1984
- PIENTA, K.J., PARTIN, A.W., COFFEY, D.S.. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. **Cancer Res.**, v.49, p.2525-2532, 1989.
- PIENTA, K.J., COFFEY, D.S. Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. **Cancer**, v. 68, p. 2112-2016, 1991.
- PINKERTON, P.H., DUBÉ, I.D.. Chronic myeloid leukaemia as a paradigm for oncogenesis. **Diagn. Oncol.**, v.1, p.288-297, 1991.
- PITOT, H.C.. A molecular biology of carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.72, p.962-970, 1993.
- PITOT, H.C., DRAGAN, Y.P.. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. **Mechanisms of Carcinogenesis - The FASEP Journal**, 5:2280- 86, 1991.
- POURZAND, C., CERUTIS, P. Mutagenesis of H-*ras* codons 11 and 12 in human fibroblastis by N-ethyl-N-nitrosurea. **Carcinogenesis**, p. 14, p. 2193-2196, 1993.
- PRESTON, G.A., LANG, J.E., MARONPOT, R.R., BARRET, J.C. Regulation of apoptosis by low serum in cells of diferent stages of neoplastic progression: Enhanced susceptibility after loss of a senescence gene and decreased susceptibility after loss of a tumor suppressor gene. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4214-4223, 1994.
- PRESTON-MARTIN, S., PIKE, M.C., ROSS, R.K. JONES, P.A., HERDERSON, B.E. Increased cell division as a cause of human cancer. **Cancer Res.**, v. 50, p. 7415-7421, 1990.
- PRESS-SCHWARTZ, D., BAIRD, W.M., NIKBAKHT, A., MERRICK, B.A., SELKIRK, J.K. Benzo[a]pyrene: DNA adduct formation in normal human

mammary epithelial cell cultures and the human mammary carcinoma T47D cell line. **Cancer Res.**, v. 46, p.2697-26702, 1986.

QUINN, C.M., WRIGHT, N.A. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: Evaluation of methods and applications as prognostic variables. **J. Pathol.**, v. 160, p. 93-102, 1990.

RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, v. 356, p. 397-400, 1992.

RHIM, J.S., YOO, J.H., PARK, J.H., THRIVES, P., SALEHI, Z., DRITSCHILO, A. Evidence for the multistep nature of in vitro human epithelial cell carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 50, p. 5636s-5657s, 1990.

RONCO, A., LARRAN, J., LÓPEZ, A., VILCHES, J. AgNOR and breast cancer. A study by image analysis. **Histol. Histopathol.**, v. 9, p. 309-313, 1994.

ROTH, M.B. Spheres, coiled bodies and nuclear bodies. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7 p. 325-328, 1995.

ROUSSEL, P., HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. **Exp. Cell Res.**, v. 465, p. 465-472, 1994.

RUSSO, J., CALAF, G., SOHI, Q., TAHIN, P.L., ZHANG, M.E., ALVARO, M.E., ESTRADA, S., RUSSO, I.H. Critical steps in breast carcinogenesis. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.698, p.1-20, 1993

SATO, S., WILLSON, C., DICKINSON, H.G. Origin of nucleolus-like found in the nucleoplasm and cytoplasm of *Vicia faba* meristematic cells. **Biol. Cell**, v. 64, p. 321-329, 1988.

SATO, S., WILLSON, C., DICKINSON, H.G. The RNA content of the nucleolus and nucleolus-like inclusions in the anther of *Lilium* estimated by an improved RNA-gold labelling method. **J. Cell Sci.**, v. 94, p. 675-68, 1989.

SCHWARZACHER, H.G., WACHTLER, F. The nucleolus. **Anat. Embryol.**, v.188, p. 515-536, 1993.

- SCOTT, J.E. Aliphatic ammonium salts in the assay of polysaccharides from tissues. **Methods of Biochemical Analysis**. v. 8, p. 145-197, 1960.
- SCOTT, J.E. Affinity, competition and specific interactions in the biochemistry and histochemistry of polyelectrolytes. **Biochem. Soc. Transact.**, v. 1, p. 787-806, 1973.
- SILIVANOVA, G., WILMAN, K.G. *p53*: a cell cycle regulator activated by DNA damage. **Adv. Cancer Res.**, v. 66, p.143-180, 1995.
- SHAY, J.W., WRIGHT, W.E., WERBIN, H. Defining the molecular mechanisms of immortalization. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1072, p. 1-7, 1991.
- SHIMAMURA, A., FISHER, D.E. *p53* in life and death. **Clin. Cancer Res.**, v. 2, p.435-440, 1996.
- SKLAR, M.D. The *ras* oncogene increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. **Science**, v. 239, p. 645-647, 1988.
- SMETS, L.A. Cell transformation as a model for tumor induction and neoplastic growth. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 605, p. 93-111, 1980.
- SMITH, M.L., FORNACE, A.J. jr. Genomic instability and the role of *p53* mutations in cancer cells. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 7, p. 69-75, 1995.
- SMITH, M.L., FORNACE, A.J. Jr. Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. **Mutation Res.**, v. 340, p. 109-124, 1996.
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating heterochromatin. **Exp. Cell Res.**, v.75, p. 304-306, 1972.
- SOULE, H.D., MALONEY, T.M., WOLMAN, S.R., PETERSON, JR, W.D., BRENZ, R., McGRATH, C.M., RUSSO, J., PAULEY, R.J., JONES, R.F. BROOKS, S.C. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6075-6086, 1990.
- STAMPFER, M.R., BARTLEY, J.C. Induction of transformation and continuous

cell lines from normal human mammary epithelial cells after exposure to benzo[a]pyrene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 2394-2398, 1985.

STEGER, D.J., WORKMAN, J.L. Remodeling chromatin structures for transcription: What happens to the histones?. **BioEssays**, v. 18, p. 875-884, 1996.

SUGDEN, B. An intricate route to immortality. **Cell**, v. 57, p.5-7, 1989.

SUGIMURA, T. Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. **Science**, v.75, p. 81-86, 1992

TAIT, L., SOULE, H.D., RUSSO, J. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer Res.**, v. 50, p. 6087-6094, 1990.

TAJIMA, Y., ISHIGE, H., KONDO, Y. Morphometric studies for objective diagnosis of intraductal carcinoma of the breast. **Acta Pathol. Jpn.**, v. 41, p. 604-609, 1991.

THOMPSON, C.L., McCOY, Z., LAMBERT, J.M., ANDRIES, M.J., LUCIER, W. Relationships among benzo(a)pyrene metabolism, benzo(a)pyrene-diol-epoxide: DNA adduct formation, and sister chromatid exchanges in human lymphocytes from smokers and nonsmokers. **Cancer Res.**, v. 49, p.6503-6511, 1989.

THOMPSON, H.J., STRANGE, R, SCHEDIN, P.J. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. **Cancer Epidem.. Biom. Prev.**, v. 597, p. 597-602, 1992.

TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Res.**, v. 27, p. 69-77, 1992.

TLSTY, T.D., BRIOT, A., GUALBERTO, A., HALL, I., HESS, S., HIXON, M., KUPPUSWAMY, D., ROMANOV, S., SAGE, M., WHILE, A. Genomic instability and cancer. **Mutation Res.**, v. 337, p. 1-7, 1995.

- UNDERWOOD, J.C.E. Nuclear morphology and grading in tumours. In: **Curr. Opinon. Pathol.: Pathology of the nucleus**. J.C.E. UNDERWOOD (ed.). Springer Verlag Berlin v.32, p. 1-15, 1990.
- van DIEST, P.J., MOURIQUAND, J., SCHIPPER, N.W., BAAK, J.P.A.
Prognostic value of nucleolar morphometric variables in cytological breast cancer specimens. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 157-159, 1990.
- VELCULESCU, V.E., EL-DEIRY, W.S. Biological and clinical importance of the *p53* tumor suppressor gene. **Clin. Chem.**, v. 42, p. 858-868, 1996.
- VIDAL, B.C. Métodos em Biologia celular. In: Biologia Celular. VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. (Eds.). Livraria Atheneu, p. 5-34, 1987.
- VIDAL, B.C.. Human renal carcinoma: Feulgen-DNA and chromatin condensation determinated by scanning cytometry. **Revta. Brasil. Genét.**, v.15, p. 945-961, 1992.
- VIDAL, B.C., SCHLÜTER, G., MOORE, G.W. Cell nucleus pattern recognition: Influence of staining. **Acta Cytochem.**, v. 17, p. 510-521, 1973.
- VIDAL, B.C., RUSSO, J.. Nuclear phenotypical changes of human breast eptthelial cells treated with carcinogens. **Micros. Elect. y Biol. Cell.**, v.11,p.145-157, 1987.
- VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleoprotein complexes *in vitro*. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 22, p. 471-478, 1989.
- VIDAL, B.C. PLANDING, W.; MELLO, M.L.S. & SCHENCK, U.. Quantitative evaluation of AgNOR in liver by high-resolution image cytometry. **Anal. Cell.Path.**, v.7, p.27-41, 1994.
- VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. Re-evaluating the AgNOR staining response in Triton X-100-treated liver cells by image analisis. **Anal. Cell Pathol.**, v. 9, p. 39-43, 1995.
- VIDAL, B.C., BARBISAN, L.F., MARIA, S.S., RUSSO, J., MELLO, M.L.S.

Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method.
Apoptosis, v. 1 (in press, 1996 a)

VIDAL, B.C., RUSSO, J., MELLO, M.L.S. Image analysis of the Feulgen-stained benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells. In: **IV Congresso da Associação Latino-Americana de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (ALAMCTA)**, Viña del mar, Chile, 1996 b, p.105.

VOGELSTEIN, B., FEARON, E.R., KERN, S.E., PREISINGER, A.C., LEPPERT, M., NAKAMURA, Y., WHITE, R., SMITS, A.M., BOLS, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **New Engl. J. Med.**, v.319, p.525-532, 1988.

VOGELSTEIN, B., KINZLER, K.W., p53 function and dysfunction. **Cell**, v. 70, p. 523-526, 1992.

ZHANG, P-L, CAFAF, C., RUSSO, J. Allele loss and point mutation in codons 12 and 61 of the c-Ha-ras oncogene in carcinogen-transformed human breast epithelial cells. **Mol. Carcinog.**, v. 9, p. 46-56, 1994.

ZHANG, P-L., CHAI, Y.L., HO, T.Y., CALAF, G., RUSSO, J. Activation of c-myc, c-neu and int-2 oncogenes in the transformation of the human breast epithelial cell line MCF-10F treated with chemical carcinogenesis in vitro. **Int. J. Onc.**, v.6, p. 963-968, 1995.

WANG, H.G., MILLAN, J.A., COX, A.D., DER, C.J., RAPP, U., BECK, T., ZHA, H., REED, J.C. R-ras promotes apoptosis caused by growth factor deprivation via a *bcl-2* suppressible mechanism. **J. Cell Biol.**, v. 129, 1103-1114, 1996

WANI, M.A., XU, X., STAMBROOK, P.J. Increased methotrexate resistance and *dhfr* gene amplification as a consequence of induced Ha-ras expression in NIH 3T3 cells. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2504-2508, 1994.

WARSHAWSKY, D. Environmental sources, carcinogenicity, mutagenicity, metabolism and DNA binding of nitrogen and sulfur heterocyclic aromatics. **J. Environ. Sci. Healt**, v. 10, p.1-71, 1992.

- WARSHAWSKY, D., LIVINGSTON, G.K. FONOUNI-FARD, M., FADOW, K
Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 26, p. 109-118, 1995.
- WIENCKE, J.K., McDOWELL, M.L., BODELL, W.J. Molecular dosimetry of DNA adducts and sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with benz[a]pyrene. **Carcinogenesis**, v. 11, p. 1497-1502, 1990.
- WIJSMAN, J.H., JONKER, R.R., KEIJZER, R., VAN DE VELDE, C.J.H., CORNELISSE, C.J., VAN DIERENDONCK, J.H. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labeling of fragmented DNA. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 41, p. 7-12, 1993.
- WILLIAMS, G.T. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. **Cell**, v. 65, p. 1097-1098, 1991.
- WOLTERBERG, A.P.M., ROGGEHAND, R. STEENWINKEL, M.J.S.T., BAAAN, R.A., RUTTEN, A.A.J.J.L. Formation and repair of benzo[a]pyrene-DNA adducts in cultured hamster tracheal epithelium determined by 32P-postlabeling analysis of unscheduled DNA synthesis. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 463-467, 1993.
- WYLE, A.H., KERR, J.F.R., CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- YOAKUM, G.H., LECHNER, J.F., GABRIELSON, E.W., KORBA, B.E., MALAN-SHIBLEY, L., WILLEY, J.C., VALERIO, M.G., SHAMSUDDIN, A.M., TRUMP, B.F., HARRIS, C.C. Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. **Science**, v. 227, p. 1174-1179, 1985.