

ACHADOS CITOGENÉTICOS EM NEOPLASIAS DE *Mus musculus* DE LABORATÓRIO

¹Goldschmidt B.; ^{1*}Knaesel M.; ²Menezes R.C.; ³Trotte M.N.S.; ⁴Moura M.;
¹Marinho A.M.

1. Serviço de Primatologia, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz, Rio de Janeiro, Av. Brasil 4365, Cep: 21040-900. 2. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Serviço de Zoonoses/Fiocruz. 3. UERJ, Rua São Francisco Xavier 524, Maracanã, Cep: 20550-013. 4. Serviço de Controle de Qualidade, Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz

Apoio: FAPERJ

INTRODUÇÃO

A caracterização histopatológica de tumores é uma base importante para recomendar a intervenção terapêutica. No entanto, muitas das características histopatológicas não refletem o comportamento clínico de um tumor ou a sua resposta ao tratamento. A biologia de um tumor pode ser prevista pelo seu potencial proliferativo. A proliferação de um tumor representa a convergência de muitos fatores, incluindo tempo de ciclo celular, crescimento e morte celular. As regiões organizadoras dos nucléolos (NORs) são genes repetitivos que codificam o RNA ribossomal e portanto envolvidos na síntese das proteínas (Capao et al., 1985) crescimento celular (Das et al., 1986), diferenciação celular (Smetana e Likovsky, 1984) e portanto nas transformações malignas (Deleener et al., 1987). As NORs são definidas como o componente nucleolar que contém proteínas que são marcadas seletivamente pelos métodos de coloração pela prata. Após a coloração pela prata, as NORs podem ser facilmente identificadas como pontos pretos situados exclusivamente sobre a área de atividade nucleolar dos cromossomos.

Acredita-se que o número e o tamanho de AgNORs estejam correlacionados com a atividade celular no geral e possam ser um indicador do grau de potencial proliferativo ou de malignidade (Crocker e Nar, 1987; Egan et al., 1988; Shiraishi et al., 1991). Estudos realizados em diferentes tipos de tumores demonstraram que as células malignas apresentam com freqüência maior quantidade de AgNORs do que células não malignas de tecidos correspondentes (Trerè, 2000). Com base na quantidade mais elevada de AgNORs na interfase, células malignas foram distinguidas de células benignas ou normais (Derenzini e Trerè, 1991). Posição anormal de regiões organizadoras dos nucléolos foi relatada em tumores testiculares humanos (DeLozier-Blanchet et al., 1986). Vários relatos sugerem que grandes quantidades de AgNORs se correlacionam com alto grau de malignidade em tumores intestinais (Derenzini et al., 1988), em neuroblastomas (Egan et al., 1988), em lesões melanocíticas malignas (Egan e Crocker, 1988), e em tumores do cérebro (Shiraishi et al., 1991). Powers et al. (2004) realizaram análise citogenética em quatro linhagens celulares de feocromocitoma de camundongo com objetivo de identificar um denominador genético comum. Todas as linhagens

apresentaram perda do cromossomo 9 e três linhagens perderam o cromossomo 4. O cromossomo 4 do camundongo é homólogo ao cromossomo humano 1p, que é o mais frequentemente deletado nos feocromocitomas humanos. O cromossomo 9 do camundongo apresenta grandes áreas de homologia com os cromossomos humanos 3p, 3q, e 11q, que também estão frequentemente deletados. Estas comparações sugerem que o mecanismo genético e a gênese dos feocromocitomas podem ser similares entre espécies.

Com o objetivo de relacionar achados citogenéticos ao fenótipo dos tumores e investigar o potencial de diagnóstico na identificação do grau de atividade proliferativa ou malignidade, estudamos a expressão das AgNORs dos cromossomos e núcleos de células cultivadas dos tumores de *Mus musculus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados os tumores de quatro animais criados no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz/RJ sob o protocolo CEUA nº 0044/00.

Animal 1 – malhado, fêmea adulta com tumor de mama. Animal 2 – C3H, fêmea adulta com tumor de mama. Animal 3 – C57 Black, macho adulto com tumor em linfonodo e animal 4 – Balb/c, macho adulto com tumor na região escapular esquerda.

-Obtenção de cromossomos – um fragmento do tumor foi divulsionado e colocado em garrafa com 10 mL de meio de cultura (RPMI 1640), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e colchicina (200µ/mL) mantido a 37° C por 1 hora. Depois disso, o material foi hipotonizado em solução de KCl 0,075M por 30 minutos e fixado em metanol: ácido acético 3:1. As lâminas foram preparadas e secas ao ar.

-Coloração convencional – A lâmina foi imersa em solução de Giemsa a 3% em tampão fosfato com pH 6.8 durante 8 minutos e lavadas em água deionizada. As metáfases foram então identificadas, localizadas, analisadas e fotografadas.

- Coloração das NORs – preparações de células do tumor foram coradas de acordo com o método descrito por Goodpasture e Bloom (1975) com algumas modificações. As lâminas foram incubadas em solução de HCl 10% a 56°C por 10 minutos e lavadas em água deionizada. Foram montadas com 3 gotas de solução de gelatina em 1% de ácido fórmico e 2 gotas de nitrato de prata a 50% e coberto por uma lamínula. A reação de coloração foi realizada por incubação das lâminas a 70°C até que estas adquiriram uma coloração marrom dourado e então foram coradas em solução 3% de Giemsa por 5 minutos. As mesmas metáfases localizadas pela técnica convencional de coloração e os núcleos foram analisadas para se estabelecer o padrão das AgNORs.

RESULTADOS

Animal 1 – Análise macroscópica do tumor evidenciou massa sugestiva de neoplasia na altura do primeiro par de glândulas mamárias torácicas, coloração brancacenta. Não há laudo histopatológico. Pela análise citogenética foram observadas células aneuplóides com 34 e 39 cromossomos.

Animal 2 – Análise macroscópica evidenciou massa de cerca de 4 cm de diâmetro localizada na altura do primeiro par de glândulas mamárias torácicas (lado esquerdo) de cor acinzentada. Sob microscopia, o tecido mamário apresentou processo neoplásico formado por células epiteliais pleomórficas, com nucléolos evidentes, por vezes apresentando-se em anel de sinete e com arranjos papilares e tubulares. Também foram observados túbulos apresentando secreção láctea, necrose de coagulação, figuras de mitose e embolo oncótico sendo diagnosticado carcinoma túbulo-papilar. Este tumor apresentou 32% de células com um cromossomo a mais (41 cromossomos).

Animal 3 – Análise macroscópica revelou linfonodos mandibulares, axilares e mesentéricos enfartados. Baço aumentado três vezes o normal com bordas arredondadas e nódulos no parênquima. Na análise microscópica os linfonodos e baço apresentavam processo neoplásico formado por células linfocíticas pleomórficas. Estes órgãos perderam sua arquitetura e apresentavam células neoplásicas invadindo suas cápsulas e o tecido adiposo adjacente indicando diagnóstico de linfoma. O tecido tumoral apresentou células (21%) com uma fusão entre dois cromossomos acrocêntricos.

Animal 4 – Análise macroscópica revelou massa de 2cm de diâmetro na região escapular esquerda. Ao corte, evidenciou conteúdo fluido e avermelhado. Processo neoplásico maligno por células epiteliais glandulares mamárias dispostas em padrão papilar, com crescimento difuso e infiltrado em tecidos adjacentes. As células apresentavam pleomorfismo e atividade mitótica moderada. Foram notados focos necróticos e de hemorragia. Os achados possibilitam diagnosticar Adenocarcinoma papilar mamário. As metáfases e os núcleos do tecido tumoral apresentaram 6 regiões organizadoras dos nucléolos, todas na região pericentromérica dos cromossomos envolvidos.

DISCUSSÃO

Os achados citogenéticos observados no presente estudo em tumores de quatro camundongos isogênicos, incluíram aneuploidia, fusão cêntrica (Robertsoniana) e aumento do número das regiões organizadoras dos nucléolos, e são similares àqueles obtidos em estudos com outras espécies.

A causa real da instabilidade, que é uma característica da maioria das neoplasias, é pouco compreendida (Stindl, 2008). Mutações gênicas específicas e aneuploidias adquiridas têm sido relacionadas às causas de instabilidade genética. Neste trabalho são demonstradas evidências de que a instabilidade genética no câncer causada por aneuploidia e alterações estruturais dos

cromossomos é uma etapa da transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa e pode representar um evento precoce no processo tumorigênico. Tanto no animal 1 como no animal 2, ocorreram eventos de aneuploidia com perda cromossômica no primeiro e excesso de um cromossomo no segundo, devido provavelmente à segregação anormal de cromossomos para as células filhas. Aneuploidia é uma das propriedades mais comuns do câncer (Rajagopalan et al., 2004), mas não está totalmente esclarecido se é essencial para a tumorigênese ou uma coincidência devido a desregulação oncogênica (Marx et al., 2002).

Foi descrito que a formação de fusões cromossômicas do tipo Robertsoniana suprimem a recombinação somática (Haigis e Dove, 2003). Um outro estudo relacionou esta fusão cromossômica a uma arquitetura nuclear alterada e subfertilidade em camundongos (Garagna et al, 2001). Em estudos de indução a tumores em camundongos BALB/c com e sem fusão cêntrica de cromossomos, foi demonstrado que o tipo de oncoproteína c-myc ativado pela translocação cromossômica em células de plasmocitoma de camundongo está alterada quando comparada com camundongos sem a translocação (Guffei et al, 2007). A fusão cêntrica entre cromossomos das células tumorais do animal 3 é do tipo Robertsoniana e pode ter similaridade com a descrição da literatura.

Os genes que codificam o RNA ribossomal estão presentes no genoma do camundongo em 100 a 200 cópias e apresentam uma distribuição multicromossômica das regiões organizadoras dos nucléolos (NORs) (Atwood et al. 1976; Dev et al. 1977; Winking et al. 1980). Em linhagens isogênicas de camundongos, as seqüências de DNAr estão geralmente localizadas próximo ao centrômero e em cinco cromossomos (Henderson et al. 1974; Elsevier and Ruddle 1975; Atwood et al. 1976).

O aumento do número de regiões organizadoras dos nucléolos observada no tumor do animal 4 (6 cromossomos portadores) , indica que este tecido está com aumento da atividade de proliferação celular que é característica de malignidade, e poderá eventualmente ser utilizado como ferramenta de diagnóstico e tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATWOOD K. C.; GLUECKSOHN-WAELSCHM S.; Yu T., & HENDERSON A. S. (1976). Does the T-locus in the mouse include ribosomal DNA? *Cytogenet. Cell Genet.* 17:9-17.

CAPAO A. DE; BALDINI A.; MARLEKAJ P.; NATOLI C.; ROCCHI M.; ARCHIDIACONO N.; CIANFARINI S.; SPADONI GL.; BOSCHERINI B.(1985) Hormone-modulated rRNA gene activity is visualized by selective staining of the NORs. *Cell Biol. Intern. Rep.* 9: 791-796.

CROCKER J. & NAR P. (1987) Nucleolar regions in lymphomas. *J. Pathol.* 151: 111-118.

DAS B.C.; RANI R.; MITRA A.B.; LUTHRA U.K.(1986) The number of silver-staining NORs (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. *Mech. Ageing Devel.* 36: 117-123.

DELEENER A.; CASTELAIN P.; PREAT V.; DE-GERLACHE J.; ALEXANDRE H.; KIRSCH-VOLDERS M. (1987) Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 8: 195-121.

DELOZIER-BLANCHET C.D.; WALT H.; ENGEL E. (1986) Ectopic nucleolus organizer regions (NORs) in human testicular tumors. *Cytogenet. Cell Genet* 41: 107-113.

DERENZINI M.; ROMAGNOLI T.; CECCARELLI C.; EUSEBI V. (1988) Fixatives and silver stainability of the NOR proteins at the light microscopical level. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 1453.

DERENZINI M. & TRERE, D. (1991). Standardization of interphase AgNOR measurement by means of an automated image analysis system using lymphocytes as an internal control. *J. Pathol.* 165, 337–342.

DEV V. G.; TANTRAVAHU R.; MILLER D. A.; MILLER O. J.(1977). Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line. *Genetics* 86:389-398.

EGAN MJ & CROCKER J. (1988) Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J. Pathol.* 154: 247-253.

EGAN M.J.; RAAFAT F.; CROCKER J.; SMIT K.(1988) Nucleolar organizer regions in fibrous proliferations of childhood and infantile fibrosarcoma. *J. Clin. Pathol.* 41: 31-33.

ELSEVIER, S. M.& RUDDLE F. H. (1975). Location of genes coding for 18s and 28s ribosomal RNA within the genome of *Mus musculus*. *Chromosoma* 43: 187-201.

GARAGNA S.; ZUCCOTTI M.; THORNHILL A.; FERNANDEZ-DONOSO R.; BERRIOS S.; CAPANNA E.; REDI C.A. (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J Cell Sci* 114: 4429 – 4434.

GOODPASTURE, C. & BLOOM S. E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37-56.

GUFFEI A; LICHTENSZTEJN Z., SILVA A G. S.; LOUIS Y.S.F.; CAPORALI A; MAI S. (2007) c-Myc–Dependent Formation of Robertsonian Translocation Chromosomes in Mouse Cells. *Neoplasia* . 9(7): 578– 588.

HAIGIS K.M. & DOVE W.F. (2003). A Robertsonian translocation suppresses a somatic recombination pathway to loss of heterozygosity. *Nat Genet* 33:33 – 39

HENDERSON, A. S.; EICHER E. M.; Yu M. T.; ATWOOD K. C. (1974). The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. *Chromosoma* 49: 155- 160.

MARX J. (2002) Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science*. 297:544–6.

POWERS J.; TISCHLER A.; MOHAMMED M.; NAEEM R. (2004) Microarray-based comparative genomic hybridization of pheochromocytoma cell lines from neurofibromatosis knockout mice reveals genetic alterations similar to those in human pheochromocytomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* , 159(1): 27 – 31.

RAJAGOPALAN H. & LENGAUER C. (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature*. 432:338–41.

SHIRAISHI T.; TABUCHI K.; MINETA T.; MOMOSAKI M.; TAKAGI M. (1991) Nucleolar organizer regions in various human brain tumors. *J Neurosurg* 74: 979–984.

SMETANA K. & LIKOVSKY Z. (1984) Nucleolar silver-stained granules in maturing erythroid and granulocytic cells. *Cell Tissue Res*. 237: 367-370.

STINDL R. (2008) Defining the steps that lead to cancer: Replicative telomere erosion, aneuploidy and an epigenetic maturation arrest of tissue stem cells. *Medical Hypotheses*. 71, 126–140.

TRERE D. (2000) AgNOR staining and quantification. *Micron* 31: 127–131.

WINKING, H.; NIELSEN K. GROPP A. (1980) Variable positions of NORs in *MUS musculus*. *Cytogenet. Cell Genet*. 26: 158- 164.