

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Leandro Petinari

Citotoxicidade do tamoxifeno em linhagens normais e
tumoriais e sua capacidade de induzir a
transformação celular *in vitro*

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

Orientadora: Profa. Dra. Selma Candelária Genari

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

P445c

Petrinari, Leandro

Citotoxicidade do tamoxifeno em linhagens normais e tumorais e sua capacidade de induzir a transformação celular *in vitro* / Leandro Petrinari. -- Campinas, SP:[s.n.], 2004.

Orientadora: Selma Candelária Genari

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

1. Celulas -- Cultura. 2. Celulas – Transformação. 3. Apoptose.
Genari, Selma Candelária. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Campinas, 05 de março de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Selma Candelária Genari (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz

Assinatura

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Assinatura

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento desta tese de mestrado, muitas pessoas especiais participaram e colaboraram para o êxito deste trabalho. Tenho plena consciência de que sem elas, tudo se tornaria mais difícil. Assim, gostaria de agradecer e dedicar os méritos dessa conquista a essas pessoas que tanto me incentivaram.

A Profa. Dra. Selma Candelária Genari, pela sua dedicação e brilhantismo profissional, que se tornou referência para minha formação acadêmica. Agradeço ainda pela sua confiança, compreensão, incentivo e pela convivência de vários anos, que muito contribuiu para minha vida profissional e pessoal. Ao seu marido German e a sua filha Rebeca, que sempre me apoiaram e me ajudaram desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior e a Patrícia da Luz Moreira, pela amizade, atenção e colaboração prestadas durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz, a Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato, e ao Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior, pela leitura cuidadosa e sugestões que muito contribuíram para a versão final deste trabalho e por aceitarem participar como membros da banca examinadora desta tese.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e ao Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP/UNICAMP), que forneceram apoio financeiro a este trabalho.

Aos meus pais Dorival e Nair, pelo amor, confiança e apoio, que sempre me deram, tendo as vezes que se sacrificarem por minha causa. Aos meus irmãos Fernando e Gustavo, que sempre me estimularam e acreditaram nas minhas conquistas.

Aos colegas de pós-graduação Estela, Grazielle, Manuel, Alberto, Samantha, Ana Cristina, Odair, Sérgio, Klélia, Marcelo, Karina, Laércio, Mônica, Amauri, Chico, pelo companheirismo e pelos momentos convividos juntos.

Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho, e as alunas Luciana Konecny Kohn e Márcia Aparecida Antonio, do CPQBA, que contribuíram de forma imprescindível, ao longo deste estudo.

A secretaria do Departamento de Biologia Celular da Unicamp, especialmente a Liliam A.S. Panagio, pela atenção e auxílio prestados.

A minha namorada Roberta pelo amor, carinho e compreensão a mim dedicado, mesmo nos momentos mais difíceis, e a seus pais José Roberto e Bete, seu irmão Renato e sua avó Cida, pelos momentos alegres que passamos juntos.

Ao Instituto de Biologia da Unicamp e a todos os professores do Departamento de Biologia Celular que muito contribuíram para a minha formação profissional.

ÍNDICE

Resumo	02
Abstract	03
Capítulo 1: Introdução	04
1. Carcinogênese Química	04
2. Transformação Celular in vitro	06
3. Características Biológicas dos Carcinógenos Químicos	09
4. Morte Celular	12
5. Carcinógenos Químicos	14
- Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	14
- 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno- DMBA	16
6. Antiestrógeno: Tamoxifeno	17
- Histórico	17
- Mecanismo de Ação	18
- Metabolismo	20
- Duração do Tratamento	21
- Resistência ao Tamoxifeno	21
- Efeitos Benéficos	23
- Efeitos Adversos	25
7. Células V79	27
8. Objetivos	29
9. Referências Bibliográficas	30
Capítulo 2: Artigo submetido à publicação	41
Abstract	42
Introduction	43
Materials and Methods	44
Results	49
Discussion	50
References	54
Capítulo 3: Conclusões	63
Anexo 1: Modelo comparativo do mecanismo de ação	65

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais freqüente entre as mulheres no Brasil, segundo dados do ministério da saúde. O tamoxifeno é uma das drogas mais utilizadas como coadjuvante na quimioterapia de mulheres que apresentam câncer de mama receptor de estrógeno positivo. Além disso, o tamoxifeno é aprovado e recomendado pela Food and Drug Administration (FDA), como quimiopreventivo em pacientes pré e pós-menopausa que apresentam risco aumentado de desenvolver câncer de mama, reduzindo em até 49% sua incidência em pacientes que o utilizaram por um período de seis anos. Apesar disso, os efeitos do tamoxifeno nas células e o seu mecanismo de ação ainda não estão totalmente elucidados.

Assim o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa do tamoxifeno em linhagens celulares não tumorais (V79, 3T3, MDCK, VERO) e tumorais (MCF-7, NCI-ADR, HT-29, PC-03, OVCAR-3, 786-0, K-562, UACC-62, NCI-460). Nota-se que as linhagens celulares normais foram mais susceptíveis ao efeito citotóxico do tamoxifeno do que as linhagens tumorais. A partir disso, foram analisados os índices de apoptose e de necrose e as características morfológicas em microscopia óptica e eletrônica de varredura das células V79, que apresentaram maior sensibilidade à exposição ao tamoxifeno.

O efeito citotóxico do tamoxifeno promoveu a apoptose e a necrose, quantificadas por citometria de fluxo, de forma dose dependente nas células V79, atingindo os maiores índices na concentração de 50 μ M. Além disso, as células tratadas apresentaram fragmentação nuclear, formação de micronúcleos além de núcleos gigantes, aparecimento de “blebbing” e “pits” na sua superfície, características estas associadas ao perfil apoptótico. O tamoxifeno foi ainda responsável por causar transformação nas células V79 de modo semelhante ao DMBA, um agente comprovadamente carcinogênico, levando ao crescimento em múltiplas camadas com perda de inibição por contato.

Assim, conclui-se que a capacidade do tamoxifeno em promover a transformação das células V79, provavelmente se deve a abundante expressão de receptores de estrógeno presente nestas células, podendo este fato associar-se à formação de neoplasias em tecidos com grande expressão desse receptor, como o endométrio uterino, sendo esse o principal efeito adverso da terapia com o tamoxifeno.

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasia among Brazilian women, according to the Health Ministry data. Tamoxifen is one of the most used coadjuvant drugs in the chemotherapy of women who present breast cancer with receptor estrogen positive. Moreover, tamoxifen is approved and recommended by the Food and Drug Administration (FDA) as a chemopreventive in pre and post menopause patients that show an increased risk to develop breast cancer, reducing up to 49% its incidence in patients that used it for a period of six years. However, tamoxifen effect on cells and its mechanism of action are not fully understood.

Thus, the aim of this work was to evaluate the tamoxifen antiproliferative activity in no tumoral (V79, 3T3, MDCK, VERO) and tumoral (MCF-7, NCI-ADR, HT-29, PC-03, OVCAR-3, 786-0, K-562, UACC-62, NCI-460) cell lines. It should be noticed that normal cell lines were more susceptible to the cytotoxic effect of tamoxifen than tumoral ones. Considering this, apoptosis and necrosis indexes were established for V79 cells and their morphological characteristics in optical and electron microscopy were also analyzed, since they were more susceptible to tamoxifen exposition.

The cytotoxic effect of tamoxifen promoted apoptosis and necrosis, which were quantified by flow cytometry, in a dose-dependent manner on V79 cells, reaching their highest indexes at a 50 μ M concentration. Furthermore, treated cells presented nuclear fragmentation, micronucleus formation besides giant nucleus, appearance of blebbing and pits on their surface, which is a characteristic associated to the apoptotic pattern. Tamoxifen was also responsible for the transformation of V79 cells in a similar way to DMBA, a known carcinogenic agent, leading to multi-layer growth and lost of contact inhibition.

Therefore, it was concluded that tamoxifen capacity in promoting V79 cells transformation is probably due to the abundant expression of estrogen receptors present on these cells, which may be associated to neoplasia formation on tissues with high receptor expression, like the uterine endometrium, being this the main side effect of tamoxifen therapy.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1 – Carcinogênese Química

A base química para o câncer foi primeiramente proposta em 1775, quando Sir Percival Pott, médico inglês, apontou os efeitos nocivos da fuligem e do alcatrão no aumento da incidência do câncer escrotal em trabalhadores que efetuavam limpeza em chaminés, devido a um longo período de exposição a tais agentes. Estudos subsequentes, realizados no início do século XX, comprovaram que tais agentes levaram à formação de tumores, quando inoculados em animais susceptíveis (ARCHER, 1992). Atualmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como o benzo(a)pireno e o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno, foram isolados desses produtos de combustão e identificados como agentes carcinogênicos (VON TUNGELN et al.,1999).

Desde esses primeiros estudos, outros diversos componentes químicos vêm sendo identificados como carcinogênicos, através de diferentes linhas de investigação, como estudos epidemiológicos, ou a partir de testes de citotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*, ou ainda testes *in vivo* com animais de experimentação. A identificação de prováveis carcinógenos presentes em nossa alimentação e meio ambiente é importante para prevenir a múltipla exposição a esses compostos, uma vez que, alguns tipos de câncer são induzidos quimicamente e envolvem o acúmulo progressivo de alterações genéticas, nas células do organismo exposto (HEIDELBERGER et al., 1983). Assim há uma grande dificuldade em se estabelecer o envolvimento de um determinado carcinógeno no desenvolvimento de um câncer em particular. Por isso a utilização de apenas um carcinógeno em protocolos

experimentais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é de extrema importância para se determinar a relação entre o agente causal e o processo neoplásico (KANEKO et al., 2002).

Os carcinógenos químicos são classificados em dois grupos principais, os carcinógenos genotóxicos e os não-genotóxicos. A diferença entre eles ocorre na interação com o DNA da célula alvo, onde apenas os carcinógenos genotóxicos interagem com o DNA. A carcinogênese química é um processo de múltiplos passos, que envolve o acúmulo progressivo de alterações genéticas. A maioria dos elementos carcinogênicos é, em si, não-reativa, mas converte-se em carcinógenos primários ou definitivos no organismo. As enzimas citocromo p450 monoxigenases dependentes do retículo endoplasmático, com frequência, convertem os carcinógenos imediatos em intermediários reativos com deficiência de elétrons (eletrófilos). Estes intermediários reativos podem interagir com centros ricos em elétrons (nucleófilos) do DNA para produzir uma mutação, resultando em dano no DNA e finalmente causando alterações genéticas que são consideradas irreversíveis. Tal interação do carcinógeno definitivo com o DNA da célula é considerada o passo inicial da carcinogênese química (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Os carcinógenos não-genotóxicos, também chamados promotores, não podem causar tumores, mas potencializam e facilitam o crescimento e desenvolvimento das chamadas células tumorais latentes ou adormecidas. Assim, o tempo decorrido desde o início da exposição a esses compostos até o desenvolvimento de um tumor em seres humanos pode ter um período de latência entre 15 a 45 anos (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Pesquisadores demonstraram que células embrionárias de hamster podiam ser transformadas por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e que tal sistema poderia ser quantificado. Tal modelo de investigação estimulou um campo de estudo extraordinário, onde a utilização dos carcinógenos químicos, associados à cultura celular, representa uma ferramenta valiosa, pois permite o estudo qualitativo e quantitativo dos mecanismos envolvidos no processo carcinogênico. Este campo de estudo refere-se à *transformação celular*, muitas vezes também chamada por alguns autores de carcinogênese *in vitro*. Assim, uma grande variedade de modelos experimentais, que possibilitam ensaios quantitativos para se referir ao potencial carcinogênico de determinados agentes químicos, vem sendo continuamente desenvolvidos e implementados, com o objetivo de se conhecer o processo carcinogênico e identificar os possíveis agentes indutores, assim como os agentes quimioterápicos (HEIDELBERGER, 1983).

2 – Transformação Celular *in vitro*

A transformação celular envolve mudanças num grande conjunto de propriedades, podendo causar alterações nas interações célula-célula (LOEWENSTEIN, 1979; KLAUNIG & RUCH, 1990; REN et al., 1990; YAMASAKI, 1990), célula-substrato (MURRAY et al., 1980; KESKI-OJA et al., 1985; NERMUT, 1991) e célula-meio (HOLZER et al., 1986; CROSS & DEXTER, 1991), induzindo a mudanças no comportamento e padrão de crescimento em cultura. Como a transformação celular *in vitro* apresenta relações com o processo de carcinogênese *in vivo* e pode ser induzida por

diferentes agentes (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985), ela tem sido grandemente estudada como um processo análogo ao desenvolvimento neoplásico *in vivo*.

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

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

Entre as alterações comportamentais mais freqüentemente observadas depois da transformação, está o crescimento celular em múltiplas camadas, indicando a perda de inibição por contato (ABERCROMBIE, 1979; GENARI & WADA, 1996, 1998, 2000). A transformação celular *in vitro* está geralmente associada a alterações no complemento cromossômico, podendo apresentar mudanças no grau de ploidia celular ou aberrações cromossômicas individuais (BIANCHI & AYRES, 1971; BIEDLER, 1976; GILVARRY et al., 1990; MATSUOKA et al., 1998; GENARI & WADA, 1995; 2000).

Algumas modificações nas propriedades celulares decorrentes da transformação envolvem alterações dos componentes e/ou funções da superfície celular. Várias proteínas e glicoproteínas de superfície estão presentes em concentrações reduzidas, ou mesmo ausentes nas células transformadas (HYNES, 1990). Entre estas se encontra a fibronectina, uma proteína da matriz extracelular que desempenha várias funções, relacionadas com a migração, adesão e espalhamento celular à superfície, a qual freqüentemente está presente em quantidades reduzidas ou com função e localização diferentes de uma célula normal, após a transformação induzida por diferentes agentes (HAYMAN et al., 1981; ALITALO et al., 1982; SANTI & ZARDI, 1985; NERMUT et al., 1991) e em culturas celulares provenientes de certos tipos tumorais (MURRAY, 1980; HYNES, 1990). Alguns estudos indicam ainda que o decréscimo dessa proteína pode ser consequência da diminuição de sua síntese ou à inabilidade da célula transformada em reter a fibronectina na sua superfície (CHEN et al., 1984; 1987; HYNES, 1990). Essas modificações acabam interferindo no processo de adesão, levando alguns tipos celulares transformados a crescer em suspensão, em independência total ou parcial do substrato, contribuindo de forma significativa para o fenótipo celular tumoral (HAYMAN et al., 1981; COOK & CHEN, 1988; PERSKY et al., 1989; GENARI & WADA, 1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI & SCHWARZBAUER, 2003).

As alterações morfológicas e de adesão induzidas pela transformação celular, podem estar relacionadas ainda ao citoesqueleto, uma vez que este se encontra associado à manutenção da forma celular, assim como aos elementos de matriz extracelular

(CASELITZ et al., 1981; BEN-ZE'EV, 1985; FOWLER & VALE, 1996; BUTTON et al., 1995).

Assim, atualmente o objetivo do estudo da transformação *in vitro* é entender a tumorigênese em organismos vivos, assim como os eventos moleculares envolvidos nesse processo, identificando possíveis marcadores tumorais que possam ajudar no diagnóstico precoce de neoplasias, possibilitando melhor prognóstico ao paciente (SMETS, 1980; BISHOP, 1991).

3 – Características Biológicas dos Carcinógenos Químicos

Quando células normais são tratadas com determinado agente químico, pode ocorrer um longo período de latência até serem observadas células com padrão anormal, que levam à formação de tumores, quando inoculadas em animais susceptíveis. Durante esse período de latência, que geralmente depende das dosagens e da frequência do tratamento, estágios pré-cancerosos mais ou menos discretos podem ocorrer, onde as células apresentam alterações morfológicas características, mas não são ainda capazes de formar tumores em animais (WIGLEY, 1990).

O tempo entre o início do tratamento com um carcinógeno até o aparecimento de massas tumorais pode ser dividido em períodos distintos. O primeiro estágio é resultado direto da administração do carcinógeno químico e é chamado de *iniciação*. A iniciação é irreversível e geralmente consiste de um processo rápido, no qual os agentes químicos levam a mudanças permanentes no DNA das células alvo, em um ou mais sítios do genoma. Porém, o ciclo celular possui um sistema de controle com pontos de checagem

específicos, permitindo que a célula verifique seu estado interno e o ambiente, antes de prosseguir no ciclo, entre estes pontos de controle os mais importantes são: a proteína do retinoblastoma (Rb), a p53 e a p21. Se o gene da p53 estiver intacto e exercer sua função normal de ponto de controle, as células que contêm DNA danificado quando atravessarem a fronteira G1/S, sofrerão apoptose. Porém, se o gene para p53 estiver mutado e o desvio para a via apoptótica não ocorrer, as células danificadas e potencialmente mutadas prosseguirão através da fase S e emergirão como uma população de células malignas (GOODMAN & GILMAN, 1996).

O segundo estágio do processo de carcinogênese é chamado *promoção* e ocorre quando os tecidos alvos, já expostos ao agente de iniciação, são estimulados e levados à formação do tumor. Diferentemente do estágio de iniciação, a promoção geralmente envolve uma série de alterações celulares e teciduais que podem ser reversíveis durante o período de latência, mas com o aparecimento da primeira célula tumoral autônoma o processo torna-se irreversível dando origem a populações celulares que originarão os neoplasmas (HEIDELBERGER et al., 1983). Estes são derivados da célula inicial fundadora aberrante. Promotores incluem agentes como drogas, produtos vegetais e hormônios que não interagem diretamente com o DNA da célula do hospedeiro, mas de algum modo influenciam a expressão da informação genética codificada no DNA celular.

Os hormônios são mensageiros químicos que se ligam a receptores celulares específicos e formam um complexo hormônio-receptor que desencadeia uma resposta celular específica, tanto para o hormônio quanto para a célula alvo. O alvo da resposta celular ao estímulo hormonal é tipicamente um aumento ou decréscimo da divisão celular

ou uma aceleração ou desaceleração da diferenciação celular, de modo que os hormônios representam a principal classe de agentes promotores (HASCHEK & ROUSSEAUX, 1998). A promoção tumoral pode ser modulada por alguns fatores como: idade, sexo, dieta e balanço hormonal. O aumento da razão de câncer de mama em mulheres com estilo de vida ocidental, foi relacionado a um maior consumo de proteína e gordura. Pesquisas recentes comprovaram o importante papel da dieta rica em gordura na promoção do câncer de mama, em ratas expostas ao carcinógeno dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) (HASCHEK & ROUSSEAUX, 1998).

O terceiro estágio, a *progressão*, refere-se à evolução das células tumorais tornando-se progressivamente mais “agressivas” e nesta fase, adquirem a habilidade de emitir metástases e promover alterações nas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas. Essas células malignas freqüentemente exibem proteínas da região organizadora do nucléolo, que se coram pela prata (AgNOR), bastante aumentadas (TRERÈ, 2000; VALENÇA et al., 2001). Essa observação demonstra que a quantidade de AgNOR representa um bom parâmetro da cinética celular, sendo associada a rapidez da duplicação celular (DERENZINI, 2000).

Alguns carcinógenos químicos como o DMBA, são identificados pela sua capacidade de induzir as etapas da carcinogênese química até a formação de tumores malignos, após a sua administração, sendo considerados carcinógenos completos (HUANG et al., 1998).

4 - Morte Celular

A morte celular é uma consequência de um processo irreversível causado por uma injúria celular letal. Esta pode ocorrer através de dois mecanismos principais, necrose ou apoptose, os quais diferem pelas suas vias bioquímicas e expressão morfológica, promovendo modificações características nas células afetadas.

A apoptose desempenha um importante papel no desenvolvimento dos tecidos e órgãos durante a embriogênese, bem como no processo de renovação celular dos tecidos adultos, sendo caracterizado pela: ativação inicial de proteases endógenas (caspases) que é estimulada pelo aumento do cálcio intracelular, diminuição do volume celular ("cell shrinkage"), formação de corpos apoptóticos, vacuolação do citoplasma, formação de protrusões na superfície celular "blebs", clivagem e fragmentação do DNA que pode ser visualizado como um padrão de "escada" no gel de eletroforese, além da condensação e marginalização da cromatina. Todas essas modificações são provavelmente decorrentes de uma reorganização das estruturas do citoesqueleto.

Agentes tóxicos podem induzir ou alterar a taxa de apoptose, ou inibir a apoptose fisiológica, que ocorre normalmente para a renovação de células com danos no DNA, de modo a aumentar as chances de ocorrência de uma transformação maligna. Se a apoptose das células com danos genômicos é inibida ou suprimida, as mutações são "fixadas" e podem resultar em descontrole do crescimento celular e câncer. Essas modificações são comumente observadas após tratamento com vários agentes anticâncer, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (ZHANG et al., 1999; TAKEMURA et al., 2001; SAAFI et al., 2001).

Pesquisas recentes sobre o processo de formação das "blebbing", que são protrusões nos pontos focais de fraqueza dos anéis contráteis de actina (MILLS et al., 1999), demonstraram que células de linhagem de câncer de mama que possuem uma deficiência em caspase-3 não foram encontradas "blebbing" durante a morte celular, levando a concluir que os eventos estruturais são decorrentes da ativação de caspases (HÄCKER, 2000).

O termo necrose foi usado no passado por muitos autores para descrever todas as formas de morte celular, porém atualmente é usado para a morte celular que ocorre de forma passiva, sendo caracterizado pela desintegração gradual da célula, causando uma perda da regulação do volume celular e a cessação das funções de síntese da célula (HÄCKER, 2000).

O citoplasma de células em necrose torna-se fortemente eosinofílico, devido a ligação da eosina a proteínas desnaturadas, a diminuição da basofilia ocorre através da perda dos ribossomos. As células passam a ter uma aparência homogênea hialinizada depois da perda de partículas de glicogênio, que são responsáveis pelo aspecto granular de uma célula normal. O citoplasma pode estar vacuolado como resultado do aumento do volume das organelas citoplasmáticas e pode conter glóbulos eosinofílicos correspondentes a mitocôndrias inchadas (HASCHEK & ROUSSEAUX, 1998).

Nas células em necrose, o núcleo sofre modificações, dependendo do estágio em que o processo de morte celular se encontra. A picnose é reconhecida pela microscopia de luz, como um encolhimento do núcleo e aumento da basofilia, após agrupamento da cromatina, que pode ser visualizada de forma mais acentuada ultra-estruturalmente. A

fragmentação nuclear é referida como cariorrexe, e a cariólise é o estágio final onde ocorre a dissolução e desaparecimento da cromatina (HASCHEK & ROUSSEAUX, 1998).

A seqüência exata dos eventos da necrose que levam a morte celular ainda não é conhecida, porém os agentes químicos indutores de necrose rompem a membrana celular, causando uma perda da habilidade da membrana plasmática em manter um gradiente de íons cálcio dentro da célula, assim essa modificação da homeostase intracelular de cálcio resulta em um acúmulo desses íons no interior das organelas e do citoplasma, fazendo com que ocorra ativação de enzimas dependentes de cálcio como proteases, ribonucleases e lipases, que promovem danos ao DNA, interferem nos processos normais de reparo, e prejudicam as funções mitocondriais. Dessa forma, o processo de morte celular por necrose proporciona a liberação do conteúdo celular dentro de uma área circundada que é quimiotática para as células inflamatórias.

5 - Carcinógenos Químicos

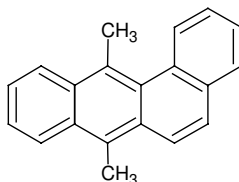
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) pertencem a uma classe de contaminantes químicos ambientais derivados dos produtos de combustão, já bastante estudados, e que são sabidamente indutores de câncer no homem (MILLER, 1970; HARVEY, 1989). A partir de estudos utilizando inicialmente células de roedores *in vitro*, constatou-se que atividade carcinogênica dos HPA é mediada pela conversão metabólica dos hidrocarbonetos para reativos eletrolíticos. Tais compostos policíclicos são ativados inicialmente por um complexo de enzimas associadas às membranas intracelulares, as

oxidases de função mista associadas ao citocromo P450, vários produtos são derivados deste metabolismo, principalmente a classe dos diol-epóxidos, que são os carcinógenos finais que se ligam ao DNA. A ligação de um HPA ao DNA, geralmente ocorre através destes epóxidos aos grupos amino da guanina e adenina, levando à formação de *aductos* no DNA (WIGLEY, 1990; SUTTER, 1998). Os *aductos* são definidos como a ligação de um grupo funcional de uma substância química em uma base nitrogenada do DNA, ocorrendo uma intercalação desse composto na molécula do DNA, o que gera danos no DNA que se não forem restaurados podem levar a célula a originar um câncer (UMEMOTO et al., 2001).

A exposição humana aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como o DMBA, pode ocorrer em ambientes de trabalho, pela exposição ao ar, pela ingestão de alimentos, e ainda pelo tabagismo. Com exceção dos fumantes e trabalhadores submetidos a ambientes com alta concentração desses compostos, uma alta exposição aos HPA é rara, por isso acredita-se que a exposição humana a tais compostos pode ser múltipla, ocorrendo de forma esporádica ou crônica, em pequenas doses (QING et al., 1997).

7,12-Dimetilbenz(a)antraceno - DMBA

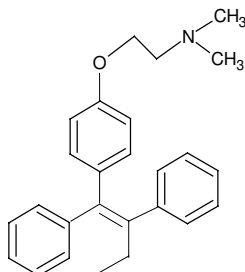


O 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) é um composto de referência, representante da classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, freqüentemente usado na indução da mutagênese e carcinogênese experimental *in vitro* e *in vivo* (CINELLI et al., 1996; HUANG et al., 1998; RUSSO et al., 1990; CALAF & RUSSO, 1993). A sua ativação metabólica também ocorre através de reações oxidativas mediadas pelo citocromo P-450, dando origem a vários grupamentos diol-epóxidos, que reagem com as adeninas e guaninas do DNA, levando à formação de *adductos* (CINELLI et al., 1996).

Alguns estudos recentes associam o DMBA a distúrbios na formação do fuso durante a divisão celular com a indução de aneuploidias, poliploidia e instabilidade cromossômica, em linhagens celulares (WU et al., 1997; MATSUOKA et al., 1998). Tais alterações cromossômicas estão associadas não somente a carcinogênese (RADMAN et al., 1982; OSHIMURA & BARRET, 1986), mas também ao aumento da taxa de esterilidade, abortamentos espontâneos e morte neonatal, assim como de anomalias congênitas, sendo um importante alvo de estudo, já que o DMBA é um carcinógeno químico ambiental (HOOK, 1993; MATSUOKA et al., 1998).

6- Antiestrógeno: ((Z)-1-[4-[2(dimetilaminoeto)oxi]fenil]-1,2-difenil-1-buteno) –

Tamoxifeno (TAM)



Histórico

No final do século XIX, Beatson demonstrou que tumores avançados de mama em mulheres pré-menopausa eram responsivos a ooforectomia (BEATSON, 1896). Isso foi justificado pelo crescimento de tumores dependentes de estrógeno serem controlados pelo bloqueio da ação deste hormônio. Durante o século XX, terapias endócrinas como adrenalectomia e hipofisectomia foram usadas no tratamento do câncer de mama avançado, mas era claramente necessário um procedimento não-cirúrgico para o controle dessa doença. Estratégias iniciais utilizando estrógenos e andrógenos, foram eficazes, mas limitadas pela toxicidade (CLEMONS et al., 2002).

O composto ICI 46474 (posteriormente conhecido como tamoxifeno) um antiestrogênio, foi primeiramente sintetizado em 1963 e possuía atividade de estimular a ovulação (KLOPPER & HALL, 1971). Quando iniciaram as investigações sobre a síntese e purificação do ICI 46474, foi encontrado que o isômero-trans era predominantemente anti-estrogênico, enquanto o isômero-cis era um estrógeno puro (HARPER & WALPONE, 1966). Essa foi a primeira demonstração do contraste farmacológico entre as formas isoméricas de um agente farmacêutico.

Anos mais tarde, foi descoberto que o TAM suprimia tumores mamários induzidos por carcinógenos em ratos, esse modelo experimental foi transferido com sucesso para triagens clínicas e o TAM foi aprovado, em 1977, pela FDA-USA para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático, além de suprimir câncer de mama receptor de estrogênio positivo em mulheres pós-menopausa (MOURITS et al., 2001).

Mecanismo de ação

O câncer endometrial e o câncer de mama são tumores dependentes de hormônios e seu crescimento é estimulado pelo estrogênio. Nas células alvo, o estrogênio (E) liga-se ao receptor de estrogênio (ER), um membro da superfamília dos receptores nucleares de hormônio, sendo encontrado em diversos tipos celulares e expressados em diferentes níveis (HOLINKA et al., 1986, NISHIDA et al., 1996). O complexo estrogênio-ER liga-se a seqüências específicas de DNA, conhecidas como elemento responsivo ao estrogênio (ERE), em regiões regulatórias de genes sensíveis ao estrogênio. As duas regiões funcionais de ativação transcricional do complexo estrogênio-ER são: AF₁, que está localizada na região N-terminal do ER no domínio A/B e é ativado constitutivamente de modo ligante-independente e célula-específica (MORAS & GRONEMEYER, 1998), e AF₂, que está localizado na região C-terminal do ER no domínio de ligação ao hormônio e exerce atividade transcricional ligante-dependente (MORAS & GRONEMEYER, 1998). AF₁ e AF₂ tem ativação transcricional independente, porém de forma sinérgica, interagindo com outras proteínas (coativadores transcricionais) para estimular a atividade da RNA

polimerase II (RNA Pol II), portanto regulando a atividade do gene (HOWELL et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2002).

O tamoxifeno inibe competitivamente a ligação do estrógeno ao ER. O complexo tamoxifeno-ER liga-se ao ERE de genes sensíveis ao estrógeno. Contudo, apenas AF₁ é ativado. A inativação do AF₂ resulta em uma atenuação da transcrição de genes responsivos ao estrógeno e da ligação de coativadores; essa ativação de AF₁ é responsável pela atividade agonista parcial do tamoxifeno (HOWELL et al., 2000; McINERNEY & KATZENELLENBOGEN, 1996). Como resultado, o tamoxifeno bloqueia o ciclo celular na fase G₁, diminuindo a proliferação celular (CLEMONS et al., 2002).

Estudos sugerem que o ER tem funções diferentes no câncer endometrial e no câncer de mama, especialmente na presença do tamoxifeno (FORNANDER et al., 1989). O tamoxifeno estimula o crescimento de células do câncer endometrial, mas tem ação antiproliferativa em células do câncer de mama em cultura (JAMIL et al., 1991) bem como em células tumorais de mama transplantadas em camundongo atímico (GOTTARDIS et al., 1988). Uma possível explicação para os diferentes efeitos do tamoxifeno no câncer endometrial e câncer de mama pode envolver a ativação de diferentes níveis de AF₁ e AF₂ nessas células (SAKAMOTO et al., 2002).

Evidências mais recentes sugerem que o tamoxifeno e seus metabólitos também apresentam como mecanismo de ação, a capacidade de induzir apoptose em células de câncer de mama humano tanto ER-positivo quanto ER-negativo, pela ativação da via das caspases, principalmente caspases 3, 8 e 9, que são proteases intracelulares e são ativadas em cascata e promovem proteólise, culminando na desestruturação celular e morte por

apoptose. Isso pode ser um fator determinante da citotoxicidade desse agente anti-neoplásico *in vitro* e *in vivo* (MOURITS et al., 2002; MANDLEKAR et al., 2000; CHRISTOV et al., 2003). Esse mecanismo de ação alternativo do tamoxifeno pode ocorrer resultando em inibição do crescimento independente do receptor de estrógeno, o que tem sido mostrado em tumores de pulmão, estômago, próstata, bexiga e câncer de mama ER-negativo. O TAM induz nessas células o aumento dos níveis do TGF- β_1 (fator β_1 de transformação do crescimento), uma citocina pleiotrópica que regula a proliferação e a atividade funcional de uma grande variedade de tipos celulares (HOSOYA et al., 1999; TAVASSOLI et al., 2002; KNABBE et al., 1987). O TGF- β_1 induz o arresto do ciclo celular em G₁ devido a ativação transcricional de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKI's), além de aumentar os níveis da proteína Retinoblastoma (pRB) hipofosforilada (TAVASSOLI et al., 2002).

Os (CDKI's) regulam negativamente a progressão do ciclo celular e são divididos em duas classes: a família dos inibidores de cdk4 (INK4), que são: a p16/INK4a, p15/INK4b, p18 e a p19 e a família das proteínas inibidoras de quinases (KIP), que são: a p21/WAF1/CIP-1, p27/KIP1 e a p57/KIP2 (HARTWELL & KASTAN, 1994).

Metabolismo

Em humanos e roedores, o tamoxifeno é extensivamente metabolizado pelo citocromo P-450, especificamente pelas subunidades CYP 3A4 e CYP 2D6, levando à formação de seus principais metabólitos: o 4-hidroxitamoxifeno (OHT) e o N-desmetiltamoxifeno (DMT) (MANDLEKAR et al., 2000). Esses metabólitos possuem igual

ou maior afinidade ao receptor de estrógeno se comparados ao tamoxifeno, o que confere aos mesmos uma maior atividade antiproliferativa em tumores mamários ER-positivos.

Duração do tratamento

O tamoxifeno é uma terapia de escolha para todos os estágios do câncer de mama receptor de estrógeno positivo e atualmente é prescrito para a prevenção do câncer de mama em mulheres com alto risco (SCHAFER et al., 2003; CLEMONS et al., 2002).

A duração ótima de terapia com o tamoxifeno, em câncer de mama inicial, permanece sob investigação, mas recomendações atuais sugerem que a terapia seja mantida por pelo menos 5 anos. Estudos em câncer de mama inicial, envolvendo o tratamento com tamoxifeno (10 ou 30 mg diários) por 1 ano, não demonstraram vantagem significativa sobre os pacientes não tratados. Estudos envolvendo 2 anos de terapia com tamoxifeno (20 ou 40mg diários) demonstraram uma redução significativa na recorrência do câncer de mama e um decréscimo significativo de mortalidade. Cinco anos de terapia com o tamoxifeno produziu um benefício significativo tanto na sobrevida livre de doença quanto na sobrevida geral (SWEDISH BREAST CANCER COOPERATIVE GROUP, 1996). Assim há evidências de que o tratamento com o tamoxifeno por 5 anos traz maiores benefícios, quando comparado com períodos mais curtos de tratamento.

Resistência ao Tamoxifeno

O tamoxifeno tem-se mostrado eficaz no tratamento do câncer de mama, porém alguns tumores não respondem e eventualmente adquirem resistência ao tamoxifeno, ou

ainda, o crescimento torna-se estimulado pelo seu uso, como evidenciado pela diminuição do crescimento de tumores após a interrupção da terapia com o tamoxifeno (HOWELL et al., 1992). Terapias com o tamoxifeno superiores a 5 anos podem levar a uma seleção clonal do câncer de mama metastático resistente ao TAM (SCHAFER et al., 2003). Além disso, muitos desses tumores estimulados pelo tamoxifeno mantêm a função e expressão de receptores de estrógeno; apenas 10% dos tumores de mama resistentes ao tamoxifeno possuem mutações ER(- α) e por essa razão esses tumores continuam tendo a habilidade de responder a terapias endócrinas de segunda linha, como um anti-estrógeno puro ou um inibidor de aromatase (BUZDAR et al., 1997, ACHUTHAN et al., 2001).

A superexpressão do gene HER-2/neu (também conhecido como ERBB2 ou c-erbB2), que codifica uma glicoproteína transmembrana p185 com atividade intrínseca para a tirosina quinase, é encontrado em 15 a 25% dos pacientes com câncer de mama e está associado com um prognóstico ruim, sendo considerado um marcador para a agressividade tumoral (BIÈCHE et al., 2001). A supressão do HER-2/neu aumenta a atividade antiproliferativa do tamoxifeno (CHUNG et al., 2002). Uma vez que pacientes que possuem HER-2/neu negativo respondem de forma mais eficaz ao tratamento com o TAM se comparados aos pacientes HER-2/neu positivo, uma explicação para esse fato é que a superexpressão de HER-2/neu promove a ativação de moléculas de sinalização que alteram a expressão do receptor de estrógeno, levando à aquisição de resistência ao tamoxifeno como demonstrado em células do câncer de mama em cultura que superexpressam o HER-2/neu (SCHAFER et al., 2003).

Um outro fator, a ser considerado é o "escape" imunológico que contribui para o efetivo crescimento tumoral e para o processo de metástase. Isso pode ocorrer devido a uma inabilidade do sistema imune em reagir normalmente para a rejeição tumoral o que pode ocorrer pelo não reconhecimento ou não reatividade a antígenos tumorais, essa resposta pode ser induzida por anergia, tolerância ou imunossupressão. Esse "escape" imunológico é um processo ativo e mediado pelo sistema Fas-Fas L (MOR et al., 2000). O estrógeno regula muitos aspectos da resposta imune, incluindo a produção e secreção de citocinas e do sistema Fas-Fas L. O tamoxifeno inibe a expressão do Fas-Fas L em células do câncer de mama em cultura, assim o bloqueio dessa via pode ser um importante mecanismo para o efeito anti-tumoral do tamoxifeno (MOR et al., 2000).

Há outros possíveis mecanismos para explicar essa resistência ao tamoxifeno via ER-independente, incluindo inibição da calmodulina, estimulação de TGF- β_1 , inibição da proteína quinase dependente de cálcio, alterações na via de sinalização de proteína quinase A e inibição dos efeitos proliferativos do fator de crescimento ligado a insulina (IGF-1) (ACHUTHAN et al., 2001). Como o tamoxifeno tem diversos efeitos em diferentes tecidos, o desenvolvimento de resistência pode estar envolvido a múltiplos fatores do que a uma simples via.

Efeitos Benéficos

O tamoxifeno vem sendo utilizado extensivamente desde a década de setenta como quimioterápico coadjuvante no tratamento de mulheres com câncer de mama e carcinoma ductal *in situ* (DCIS) (FISHER et al., 1999). Uma pesquisa sobre prevenção do câncer de

mama realizado pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) demonstrou uma redução de 49% da incidência de câncer de mama (FISHER et al., 1998). Assim o TAM foi aprovado pelo FDA para prevenção do câncer de mama, em mulheres com alto risco para o desenvolvimento da doença (OVERMEYER, 1999).

Estudos demonstram que o tamoxifeno reduz a formação de aductos no DNA promovidos pelo DMBA em tecido mamário de ratos, diminuindo a formação de tumores *in vivo* (GALBIATI et al., 2002; WARSHAWSKY et al., 2002; LAMB et al., 2003). Isso ocorre porque o pré-tratamento com o tamoxifeno inibe a fase inicial de carcinogênese pelo DMBA, agindo como um supressor da promoção tumoral tanto *in vivo* quanto *in vitro*, por diminuir a formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que causa a oxidação de macromoléculas biológicas incluindo o DNA, RNA, proteínas e lipídios (THANGARAJU et al., 1992; LIM et al., 1992; BHIMANI et al., 1993; WEI & FRENKEL, 1993; WEI et al., 1998). Esse é um fator positivo para os pacientes que utilizam o tamoxifeno como quimiopreventivo, pois a principal exposição aos carcinógenos policíclicos aromáticos é a ambiental. Assim, o TAM pode modular o impacto dessa exposição, pois impede a formação de tumores mamários em ratos expostos ao DMBA (WARSHAWSKY et al., 2002). Uma possível hipótese para essa observação é que o tamoxifeno inibe a fase inicial da carcinogênese pelo DMBA, impedindo a formação de *aductos* promovidos por esse composto (WARSHAWSKY et al., 2002).

O tamoxifeno previne perdas ósseas em mulheres com risco aumentado de osteoporose, reduzindo a incidência de fraturas (FISHER et al., 1998). Além disso, promove redução do colesterol total e de sua fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL-

colesterol) em torno de 20%, o que leva a uma redução substancial na morbidade cardiovascular, principalmente no infarto do miocárdio em pacientes pós-menopausa (McDONALD et al., 1995).

Atualmente, várias drogas têm sido utilizadas juntamente com o tamoxifeno como a cisplatina, 5-fluorouracil, ácido retinóico, fenilbutirato e isoflavonas, com o objetivo de aumentar o seu efeito antiproliferativo em células tumorais ou para diminuir a resistência de alguns tipos celulares neoplásicos ao tamoxifeno (TANOS et al., 2002; TAVASSOLI et al., 2002; CHUNG et al., 2002). O entendimento das vias de apoptose e de sinalização celular que estão envolvidas no controle da proliferação e da resistência de células tumorais, podem fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de drogas ou terapias gênicas mais efetivas e estrategicamente desenvolvidas para o tratamento do câncer (TAVASSOLI et al., 2002).

Efeitos Adversos

O tamoxifeno é geralmente bem tolerado; num tratamento de curto prazo seus efeitos são similares aos sintomas da menopausa e incluem ondas de calor, irregularidades menstruais, sangramentos vaginais, prurido vulvar e edema. Porém, com um tratamento de longo prazo ocorrem sérios efeitos adversos associado com o uso do tamoxifeno, como o aumento da incidência de câncer endometrial (FISHER et al., 1998; MOURITS et al., 2001; SAKAMOTO et al., 2002; BERGMAN et al., 2000, EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 1998). Estudos indicam um aumento de 6,4 vezes o risco de câncer endometrial para pacientes que utilizaram o tamoxifeno em relação

ao grupo controle não tratado (FORNANDER et al., 1993). Isso se deve ao receptor de estrógeno ser um complexo relativamente "promíscuo", permitindo a ligação não apenas do estrógeno, mas também de estilbenos como o tamoxifeno, clomifeno, raloxifeno e outros. Ainda, foi descoberto o receptor de estrógeno β , uma segunda isoforma com expressão, distribuição e propriedades de ligação diferentes do receptor de estrógeno α (MOSELMAN et al., 1996). Isto faz com que o tamoxifeno tenha atividade de estimular ou inibir os receptores de estrógeno em diferentes sítios e tecidos dependentes da concentração de estrógeno, o que pode contribuir para um aumento do volume uterino, aparecimento de miomas, endometriose, pólipos e carcinoma endometrial. Além disso, o tamoxifeno pode ter atividade estrogênica ou anti-estrogênica num mesmo tecido, por exemplo: induzindo os receptores de progesterona no tecido mamário (efeito agonista) ou inibindo o crescimento do câncer de mama (efeito antagonista) (MOURITS et al., 2001).

Outros efeitos adversos observados com o uso do tamoxifeno são: distúrbios oculares incluindo neuritis ópticas, distúrbios na córnea, retinopatias e catarata (FISHER et al., 1998); efeitos adversos hepáticos como a alteração das enzimas hepáticas, hepatites, colestase e até o aparecimento de tumores hepáticos (WILKING et al., 1997); e ainda efeitos adversos do sistema circulatório como anemia, leucopenia, trombocitopenia, neutropenia e elevação dos níveis de triglicérides no soro (CLEMONS et al., 2002).

O tamoxifeno também tem sido indicado como agente indutor de aneuploidias e câncer hepático em animais de experimentação e como causador da formação de aductos no DNA de células hepáticas de rato (UMEMOTO et al., 2001). A ativação metabólica do tamoxifeno é um pré-requisito importante para a formação desses aductos, pois gera como

metabólitos ativos, carbocátions eletrofilicos que se ligam irreversivelmente ao DNA, sendo de 200-1600 vezes mais reativos que o próprio tamoxifeno (BOOCOCK et al., 2002).

7 - Células V-79

O estudo do processo de carcinogênese foi grandemente facilitado pela descoberta da transformação morfológica *in vitro*, utilizando-se cultura de células de mamíferos para o acompanhamento dos efeitos tóxicos de possíveis agentes carcinogênicos ou mutagênicos (COMBES et al., 1999; BRONZETTI et al., 2003).

A linhagem V-79, constituída por células semelhantes a fibroblastos, obtidas a partir de pulmão de hamster chinês (*Cricetulus barabensis griseus*), apresenta número de cromossomos pseudodiplóide, com número modal igual a 22 podendo variar entre 20 a 23 cromossomos, a razão de poliploidia é de 4%. Além disso, suas características morfológicas e de comportamento em cultura são bem definidas com crescimento em monocamadas, inibição por contato e dependência de ancoragem, características estas observadas em linhagens não tumorais. As células V-79 já vêm sendo utilizadas para estudos de transformação celular, mutação, aberrações cromossômicas e danos no DNA, induzidos por tratamento com agentes químicos (CARVALHO *et al.*, 1999; BRONZETTI et al., 2003; CINELLI et al., 1996), constituindo um ótimo modelo de estudo para a carcinogênese experimental (KIEFER & WEIBEL, 1998; BEZ et al., 2001; MATSUOKA et al., 1998) devido às suas propriedades de crescimento e comportamento em cultura, possuindo o

cariótipo estável, um curto tempo de geração e uma fácil manutenção (BEHRENS et al., 1989; BIRCHMEIER et al., 1993; PEREZ et al., 2002).

Como as células V-79 apresentam características de crescimento em cultura bem definidas, pequenas alterações após tratamentos por carcinógenos químicos podem facilmente ser observadas e detectadas através de modificações no fenótipo celular e também no complemento cromossômico, devido a alterações numéricas e estruturais (SCIANDRELLO et al., 1996).

8- OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho é investigar o potencial carcinogênico e/ou quimioterápico do tamoxifeno em cultura de células normais (V79, 3T3, MDCK, VERO) e tumorais (MCF-7, NCI-ADR, HT-29, PC-03, OVCAR-3, 786-0, K-562, UACC-62, NCI-460). Além disso, analisar as alterações morfológicas e estruturais induzidas pelo tamoxifeno em células V79, escolhidas como modelo experimental pela sua maior sensibilidade, em comparação com o DMBA, um composto comprovadamente carcinogênico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos citotóxicos do tamoxifeno de forma comparativa em células normais e tumorais.
- Avaliar os índices de apoptose e necrose nas células V79 submetidas ao tratamento com tamoxifeno, analisando-se o efeito da concentração do mesmo sobre a morte celular.
- Analisar as possíveis alterações morfológicas e estruturais em microscopia óptica e eletrônica de varredura, ocorridas nas células V79 controle e submetidas aos diferentes tratamentos.

9- Referências Bibliográficas (de acordo com ABNT 6023, ago. 2000)

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

ACHUTHAN, R., BELL, S.M., ROBERTS, P., LEEK, J.P., HORGAN, K., MARKHAM, A.F., MacLENNAN, K.A. and SPEIRS, V. Genetic events during the transformation of a tamoxifen-sensitive human breast cancer cell line into a drug-resistant clone. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 130, 166-172, 2001.

ALITALO, K., KESKI-OJA, J., HEDMAN, K. and VAHERI, A. Loss of different pericellular matrix components of rat cells transformed with a T-class ts mutant of Rous Sarcoma Virus. *Virology*, 119, 347-357, 1982.

ARCHER, M. Chemical Carcinogenesis, In: TANNOCK, I.F. & HILL, R.P. *The Basic Science of Oncology*. 2^a ed. McGraw-Hill Inc, 1992.

BATSON, G.T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the suggestions for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*, 2, 104-107, 1896.

BEHRENS, J., MAREEL, M.M., VAN ROY, F. M. and BIRCHMEIER, W. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 108, 2435-2447, 1989.

BEN-ZE'EV, A. The cytoskeleton in cancer cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 780, 197-212 1985.

BERGMAN, L., BEELEN, M.L.R., GALLEE, M.P.W., HOLLEMA, H., BENRAADT, J. and vanLEEuwEN, F.E. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. *Lancet*, 356, 881-887, 2000.

BEZ, G.C., JORDÃO, B.Q., VICENTINI, V.E.P., MANTOVANI, M.S. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of chlorophylls and chlorophyllin in cultured V79 cells. *Mutation Research*, 497, 139-145, 2001.

BHIMANI, R., TROLL, W., GRUMBERGER, D. AND FRENKEL, K. Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 53, 4528-4533, 1993.

BIANCHI, N.O. and AYRES, J. Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Exp. Cell Res.*, 68, 253-258, 1971.

BIÈCHE, I., ONODY, P., LEREBOURS, F., TOZLU, S., HACENE, K., ANDRIEU, C., VIDAUD, M., TUBIANA-HULIN, M., SPYRATOS, F., LIDEREAU, R. ERBB2 status and benefit from adjuvant tamoxifen in ER α -positive postmenopausal breast carcinoma. *Cancer Letters*, 174, 173-178, 2001.

BIEDLER, J.L. Chromosome abnormalities in human tumor cells in culture. In Fogh, J. ed. "Human tumor cells *in vitro*". New York, Academic Press, 1976.

BIRCHMEIER, W., WEIDNER, K.M. and BEHRENS, J. Molecular mechanisms leading to loss of differentiation and gain of invasiveness in epithelial cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 17, 159-164, 1993.

BISHOP, J. M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64, 235-248, 1991.

BOOCOCK, D.J., BROWN, K., GIBBS, A.H., SANCHEZ, E., TURTELTAUB, K.W. and WHITE, N.H. Identification of human CYP forms involved in the activation of tamoxifen and irreversible binding to DNA. *Carcinogenesis*, 23(11), 1897-1901, 2002.

BRONZETTI, G., CINI, M., CALTAVUTURO, L., FIORIO, R., CROCE, C.D. Antimutagenicity of sodium selenite in Chinese hamster V79 cells exposed to azoxymethane, methylmethansulphonate and hydrogen peroxide. *Mutation Research*, 523 524, 21-31, 2003.

BUTTON, E., SHAPLAND, C. and LAWSON, D. Actin, its associated proteins and metastasis. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 30, 247-251, 1995.

BUZDAR, A.U., JONAT, W., HOWELL, A., PLOURDE, P.V. ARIMIDEX: a potent and selective aromatase inhibitor for the treatment of advanced breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 61, 145-149, 1997.

CALAF, G. and RUSSO, J. Transformation of human breast epithelial cells by chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 14, 483-492, 1993.

CARVALHO, C.E., SANTOS JR, A.R. and WADA, M.L.F. Dexamethasone-induced chromosome number alterations in cell culture. *Med. Sci. Res.*, 27, 219-221, 1999.

CASELITZ, J., OSBORN, M. and WEBER, K. Intermediate-sized filament protein (prekeratin, vimentin, desmin) in the normal parotid and parotid gland tumors. *Cancer*, 54, 2959-2967, 1981.

CHEN, J.M., OLDEN, K., BERNARD, B.A. and FONG-FONG, C. Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J. Cell Biol.* 98, 1546-1555, 1984.

CHEN, J.M. and CHEN, W.T. Fibronectin-degrading proteases from the membranes of transformed cells. *Cell*, 48, 193-203, 1987.

CHRISTOV, K., IKUI, A., SHILKAITIS, A., GREEN, A., YAO, R., YOU, M., GRUBBS, C., STEELE, V., LUBET, R., WEINSTEIN, I.B. Cell proliferation, apoptosis, and expression of cyclin D1 and cyclin E as potential biomarkers in tamoxifen-treated mammary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 77(3), 253-264, 2003.

CHUNG, Y.L., SHEU, M.L., YANG, S.C., LIN, C.H., YEN, S.H. Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 97, 306-312, 2002.

CINELLI, S., FALEZZA, A., CILIUTTI, P., MARIANI, M.F. and VERICAT, J. A. Light-dependent activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene to a potent genotoxicant. *Carcinogenesis*, 17, 2529-2533, 1996.

CLEMONS, M., DANSON, S., HOWELL, A. Tamoxifen ('Nolvadex'): a review. *Cancer treatment Review*, 28, 165-180, 2002.

COMBES, R., BALLS, M., CURREN, R. Cell transformation assays as predictor of human carcinogenicity. *Atla*, 27, 745-767, 1999.

COOK, J.R. and CHEN, J. Enhancement of transformed cell growth in agar by serins proteases inhibitors. *J. Cell Physiol.*, 136, 188-193, 1988.

CROSS, M., and DEXTER, T.M. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell*, 64, 271-280, 1991.

DERENZINI, M. The AgNOR. *Micron*, 31, 117-120, 2000.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet*, 351, 1451-1467, 1998.

FISHER, B., CONSTANTINO, J.P., WICKERHAM, C.D.L., REDMOND, C.K., KAVANAH, M., CRONIN, W.M., VOGEL, V., ROBIDOUX, A., DIMITROV, N., ATKINS, J., DALY, M., WIEAND, S., TAN-CHIU, E., FORD, L., WOLMARK, N., and OTHER NATIONAL SURGICAL ADJUVANT BREAST and BOWEN PROJECT INVESTIGATORS. Tamoxifen for prevention of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1371-1388, 1998.

FISHER, B., DIGNAM, J., WOLMAN, N., WICKERHAM, D.L., FISHER, E.R., MAMOUNAS, E., SMITH, R., BEGOVIC, M., DIMITROV, N., MARGOLESE, R.G., KARDINAL, C.G., KAVANAH, M.T., FEHRENBACHER, L., OISHI, R.H. Tamoxifen in

treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant and Bowel Project B-24 randomised controlled trial. *The Lancet*, 353, 1993-2000, 1999.

FORNANDER, T., HELLSTROM, A.C.; MOBERGER, B.; Descriptive clinicopathologic study of 17 patients with endometrial cancer during or after adjuvant tamoxifen en early breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1850-1855, 1993.

FORNANDER, T., RUTQVIST, L.E., CEDERMARK, B., GLAS, U., MATTSON, A., SILFVERSWÄRD, C., SKOOG, L., SOMELL, A., THEVE, T., WILKING, N., ASKERGREN, J., HJALMAR, M.L. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet*, 1, 117-120, 1989.

FOWLER, V.M. and VALE, R. Cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 1-3, 1996.

GALBIATI, E.; CARUSO, P.L.; AMARI, G.; ARMANI, E.; GHIRARDI, S.; DELCANALE, M.; CIVELLI, M. Pharmacological action of a novel, potent, tissue-selective benzopyran estrogen. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303, 196-203, 2002.

GENARI, S.C. and WADA, M.L.F. Behavioural differences and cytogenetical analysis of a transformed cellular population derived from a Vero cell line. *Cytobios*, 81, 17-25, 1995.

GENARI, S.C.; DOLDER, M.A.D. and WADA, M.L.F. Scanning and transmittion electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 28(4), 565-572, 1996.

GENARI, S.C.; GOMES, L. and WADA, M.L.F. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell Biol. Int.* 22 (4), 285-294, 1998.

GENARI, S.C. and WADA, M.L.F. Effects of nutritional stress conditions on the ploidy and growth of human amniotic cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 36, 147-150, 2000.

GILVARRY, U., FARREL, D., LYNCH, V., MORIARTY, M., DOOLEY, M., LAW, E., and CLYNES, M. Cytological differences between normal and malignant human cell populations in culture. *Cancer Res.* 50, 3390-3393, 1990.

GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 132-158, 1996.

GOTTARDIS, M.M., ROBINSON, S.P., SATYASWAROOP, P.G., JORDAN, V.C. Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Research*, 48, 812-815, 1988.

- HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Research*, 301, 5-17, 2000.
- HARPER, M.J.K. and WALPONE, A.L. Contrasting endocrine activities of *cis* and *trans* isomers in a series of substituted triphenylethylenes. *Nature*, 212, 87, 1966.
- HARTWELL, I.H. and KASTAN, M.B. Cell-cycle control and cancer. *Science*, 266, 1821-1828, 1994.
- HARVEY, R.G. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Chemistry and Carcinogenicity. New York, Cambridge University Press, 155-186, 1989.
- HASCHEK, W.M. and ROUSSEAU, C.G. *Fundamentals of toxicologic pathology*. San Diego, Academic Press, 12-43, 1998.
- HAYMAN, E., ENGVALL, E. and RUOSLAHTI, E. Concomitant loss of cell surface fibronectin and laminin from transformed rat kidney cells. *J. Cell Biol.* 88, 352-357, 1981.
- HEIDELBERGER, C., FREEMAN, A., PIENTA, R.J., SIVAK, A., BERTRAM, J.S., CASTRO, B.C., DUNKEL, V.C., FRANCIS, M.W., KAKUNAGA, T., LITTLE, J.B and SCHECHTMAN, L.M. Cell transformation by chemical agents - a review and analysis of the literature. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.*, 114, 283-385, 1983.
- HENDERSON, B.E., ROSS, R.K and PIKE, M.C. Hormonal chemoprevention of cancer in women. *Science*, 259, 633-638, 1992.
- HOLZER, C.; MAIER, P. and ZBINDEN, G. Comparison of exogenous growth stimuli for chemically transformed cells: growth factors, serum and cocultures. *Exp. Cell Bio.*, 54, 237-244, 1986.
- HOLINKA, C.F., HATA, H., GRAVANIS, A., KURAMOTO, H., GURPIDE, E. Effects of estradiol on proliferation of endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *J. Steroid Biochem*, 25, 781-786, 1986.
- HOOK, E.B. Perspectives in mutation epidemiology: Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality and some comments upon surveillance of chromosome mutation rates. *Mut. Res.*, 114, 389-423, 1993.
- HOSOYA, Y., KITO, Y., KOBAYASHI, E., OKABE, R., FUJIMURA, A., KANAZAWA, K. Combination effects of tamoxifen plus 5-fluorouracil on gastric cancer cell lines in vitro. *Cancer Letters*, 140, 139-143, 1999.

HOWELL, A., DODWELL, D.J., ANDERSON, H., REDFORD, J. Response after withdrawal of tamoxifen and progestogens in advanced breast cancer. *Ann. Oncol.*, 3, 611-617, 1992.

HOWELL, A., OSBORNE, C.K., MORRIS, C., WAKELING, A.E. ICI 182,780 (FaslodexTM). Development of a novel, "pure" antiestrogen. *Cancer*, 89, 817-825, 2000.

HUANG, M-T., LOU, Y-R., XIE, J. G., MA, W., LU, Y-P., ZHU, B. T., NEWMARK, H. and HO, C-T. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumours and lymphomas/leukemias in Sencar mice. *Carcinogenesis*, 19, 1697-1700, 1998.

HYNES, R.O. Oncogenic Transformation. In *Fibronectins*. New York, ed. Springer-Verlag, 231-248, 1990.

IARC/NCI/EPA WORKING GROUP. Cellular and molecular mechanisms of transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Res.*, 45, 2395-2399, 1985.

JAMIL, A., CROXTALL, J.D., WHITE, J.O. The effect of anti-oestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells (Ishikawa). *J. Mol. Endocrinol.*, 6, 215-221, 1991.

KANEKO, M., MORIMURA, K., NISHIKAWA, T., WANIBUCHI, H., TAKADA, N., OSUGI, H., KINOSHITA, H. and FUKUSHIMA, S. Different genetic alteration in rat forestomach tumors induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis*, 23 (10), 1729-1735, 2002.

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

KIEFER, F. and WIEBEL, F.J. Caffeine potentiates the formation of micronuclei caused by environmental chemical carcinogens in V79 chinese hamster cells. *Toxicology Letters*, 96,97, 131-136, 1998.

KLAUNIG, J. and RUCH, R.J. Biology of disease: role of inhibition of intercellular communication in carcinogenesis. *Lab. Invest.*, 62, 135-146, 1990.

KLOPPER, A., HALL, M. New synthetic agent for the induction of ovulation: preliminary trials in women. *Br. Med. J.*, 1, 152-154, 1971.

KNABE, C., LIPPMAN, M.E., WAKEFIELD, L.M. Evidence that TGF- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell*, 48, 417-428, 1987.

LAMB, C.A., HELGUERO, L.A., FABRIS, V., COLOMBO, L., MOLINOLO, A.A., LANARI, C. Differential effects of raloxifene, tamoxifen and fulvestrant on a murine mammary carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 79(1), 25-35, 2003.

LIM, J.S., FRENKEL, K. and TROLL, W. Tamoxifen suppresses tumor promotor-induced hydrogen peroxyde formation by human neutrophils. *Cancer Res.*, 52, 4969-4972, 1992.

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

MANDLEKAR, S., HEBBAR, V., KONSTANTIN, C. and KONG, A.N.T. Pharmacodynamics of tamoxifen and its 4-hydroxy and N-desmethil metabolites: activation of caspases and induction of apoptosis in rat mammary tumors and in human breast cancer cell line. *Cancer Research*, 60, 6601-6606, 2000.

MATSUOKA, A., MATSUURA, K., SAKAMOTO, H., HAYASHI, M. and SOFUNI, T. Spindle disturbances induced by benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in a chinese hamster cell line (V79-MZ) and the stability of the numerical chromosome aberrations that follow. *Mut. Res.*, 419, 1-12, 1998.

McDONALD, C.C., ALEXANDER, F.E., WHYTE, B.W., FORREST, A.P., STEWART, H.J. Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomized trial. The Scottish Cancer Trials Breast Group. *Br. Med. J.*, 311, 977-980, 1995.

McINERNEY, E.M. and KATZENELLENBOGEN, B.S. Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J. Biol. Chem.*, 271, 24172-24178, 1996.

MILLER, J.A. Carcinogenesis by chemicals: an overview. *Cancer Res.*, 30, 559-576, 1970.

MILLS, J.C., STONE, N.L., PITTMAN, R.N. Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *J. Cell Biol.*, 146, 703-708, 1999.

MOR, G., KOHEN, F., GARCIA-VELASCO, J., NILSEN, J., BROWN, W., SONG, J., NAFTOLIN, F. Regulation of FAS ligand expression in breast cancer cells by estrogen: functional differences between estradiol and tamoxifen. *J. Steroid Biochem.*, 73, 185-194, 2000.

- MORAS, D. and GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biolo.*, 10, 384-391, 1998.
- MOSSELMAN, S., POLMAN, J. and DIJKEMA, R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*, 392, 49-53, 1996.
- MOURITS, M.J.E., DE VRIES, E.G.E., WILLEMSE, P.H.B., HOOR, K.A.T., HOLLEMA, H. and VAN DER ZEE, G.J. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. *Obstetrics & Gynecology*, 97 (5) part 2, 855-866, 2001.
- MOURITS, M.J.E., HOLLEMA, H., DE VRIES, E.G.E., HOOR, K.A.T., WILLEMSE, P.H.B. Apoptosis and apoptosis-associated parameters in relation to tamoxifen exposure in postmenopausal endometrium. *Human Pathology*, 33(3), 341-346, 2002.
- MURRAY, J.C., LIOTTA, L., RENNARD, S.I. and KELLIE, S. Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 40, 347-351, 1980.
- NERMUT, M.V., EASON, P., HIRST, E.M.A. and KELLIE, S. Cell/substratum adhesion in RSV-transformed rat fibroblast. *Exp. Cell Res.*, 193, 382-397, 1991.
- NISHIDA, M., KASAHARA, K., OKI, A., SATOH, T., ARAI, Y., KUBO, T. Establishment of eighteen clones of Ishikawa cells. *Hum. Cell*, 9, 109-116, 1996.
- OSHIMURA, M. and BARRET, J.C. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ. Mutagen.*, 8, 129-159, 1986.
- OVERMEYER, B.A. The role of tamoxifen in preventing breast cancer. *Cleveland Clinic J. Medicine*, 66, 33-40, 1999.
- PEREZ, C., LOPES DE CERAIN, A. and BELLO, J. Induction of micronuclei in V79 cells after combined treatments with heterocyclic aromatic amines. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1463-1467, 2002.
- PERSKY, B., MEYSKENS, F.L. and HENDRIZ, M.J.C. Immunohistochemical and ultrastructural study of human melanoma colonies grow in soft agar. *Am. J. Anat.*, 184, 212-224, 1989
- QING, W-G., CONTI, C.J., LABATE, M., JOHNSTON, D., SLAGA, T.J. and MACLEOD, M.C. Induction of mammary cancer and lymphoma by multiple, low oral doses of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in SENCAR mice. *Carcinogenesis*, 18, 553-559, 1997.

RADMAN, M., JEGGO, P. and WAGNER, R. Chromosomal rearrangement and carcinogenesis. *Mut. Res.*, 98, 249-264, 1982.

REN, J., HAMADA, J., TAKEICHI, N., FUJIKAWA, S. and KOBAYASHI, H. Ultrastructural differences in junctional intercellular communication between highly and weakly metastatic clones derived from rat mammary carcinoma. *Cancer Res.*, 50, 358-362, 1990.

RUSO, I. H., GUSTERSON, B.A., RODGERS, A.E., RUSSO, J., WELLINGS, S.R., van ZWEITEN, M. J. Biology of disease: comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab. Invest.* 62, 244-248, 1990.

SAAFI, E.L., KONARKOWSKA, B., ZHANG, S., KISTLER, J., COOPER, G.J.S. Ultrastructural evidence that apoptosis is the mechanism by which human amylin evokes death in RINm5F pancreatic islet β -cells. *Cell Biology International*, 25(4), 339-350, 2001.

SAKAMOTO, T., EGUCHI, H., OMOTO, Y., AYABE, T., MORI, H., HAYASHI, S. Estrogen receptor-mediated effects of tamoxifen on human endometrial cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 192, 93-104, 2002.

SANTI, L. and ZARDI, L. Theories and Models in Cellular Transformation, 1^a ed. Genoa, Academic Press, 1985.

SCHAFER, J.M., BENTREM, D.J., TAKEI, H., GAJDOS, C., BADVE, V., JORDAN, V.C. A mechanism of drug resistance to tamoxifen in breast cancer. *J. Steroid Biochem.*, 83, 75-83, 2003.

SCIANDRELLO, G., CARADONNA, F., and BARBATA, G. Karyotype abnormalities in a variant chinese hamster cell line resistant to methyl metanesulphonate. *Hereditas*, 124, 39-46, 1996.

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

SUTTER, T.R. Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-diol by human cytochrome P-450 1B1. *Carcinogenesis*, 19, 1847-1853, 1998.

SWEDISH BREAST CANCER COOPERATIVE GROUP. Randomized trial of two versus five years of adjuvant tamoxifen for postmenopausal early stage breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 88, 1543-1549, 1996.

TAKEMURA, G., KATO, S., AOYAMA, T., HAYAKAWA, Y., KANO, M., MURUYAMA, R., ARAI, M., NISHIGAKI, K., MINATOBUCHI, S., FUKUDA, K.,

- FUJIWARA, T. and FUJIWARA, H. Characterization of ultrastructure and its relation with DNA fragmentation in Fas-induced apoptosis of cultured cardiac myocytes. *Journal of Pathology*, 193, 546-556, 2001.
- TANOS, V., BRZEZINSKI, A., DRIZE, O., STRAUSS, N., PERETZ, T. Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial breast cells in vitro. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 102, 188-194, 2002.
- TAVASSOLI, M., SOLTANINIA, J., RUDNICKA, J., MASHANTARE, D., JOHNSON, N. and GÄKEN, J. Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF- β 1. *Carcinogenesis*, 23(10), 1569-1575, 2002.
- THANGARAJU, M., VIJAYALAKSHMI, T. and SACHDANANDAM, P. Effect of tamoxifen on lipid peroxide and antioxidative enzyme in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer*, 74, 4969-4972, 1992.
- TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. *Micron*, 31, 127-131, 2000.
- UMEMOTO, A., KOMAKI, K., MONDEN, Y., SUWA, M., KANNO, Y., KITAGAWA, M., SUZUKI, M., LIN, C.X., UYEYAMA, Y., MOMEN, M.A., RAVINDERNATH, A. and SHIBUTANI, S. Identification and quantification of Tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice. *Chem. Res. Toxicol.*, 14 (8), 1006-1013, July 2001.
- VALENÇA, V.T., ESCANHOELA, C.A.F., METZE, K. AgNOR pattern and PCNA analysis in fine needle biopsies of liver cell carcinoma. *Neoplasma*. 48 (5), 370-373, 2001.
- VON TUNGEN, L.S., XIA, Q., HEFLICK, R.H., and FU, P.P. Tumorigenicity and liver tumor r α s-protoncogene mutation in CD-1 mice treated neonatally with 1- and 3-nitrobenzo(a)pyrene and their trans-7, 8-dihydrodiol and aminobenzo(a)pyrene metabolites. *Cancer Lett.*, 137(2), 137-143, 1999.
- WARSHAWSKY, D., DOWTY, H.V., LADOW, K., SUCCOP, P., TALASKA, G. Reduction of a 7,12-dimethylbenz(a)anthracene DNA adduct in rat mammary tissue in vivo when pretreated with tamoxifen. *Toxicology Letters*, 132, 71-79, 2002.
- WEI, H. and FRENKEL, K. Relationship of oxidative events and DNA oxidation in Sencar mice to *in vivo* promotion activity of phorbol ester type tumor promoters. *Carcinogenesis*, 14, 1195-1201, 1993.

WEI, H., CAI, Q., TIAN, L. and LEBWOHL, M. Tamoxifen reduces endogenous and UV light-induced oxidative damage to DNA, lipid and protein *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis*, 19, 1013-1018, 1998.

WIEBE, V.J., OSBORNE, C.K., FUQUA, S.A., DeGREGORIO, M.W. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 14, 173-188, 1993.

WIGLEY, C. Carcinogênese Química e Lesões Pré-cancerosa. *In*: FRANKS, L.M & TEICH, N. *Introdução a Biologia Celular e Molecular do Câncer*. Editora Roca, 1990.

WILKING, N., ISAKSSON, E., VON SHOULTZ, E. Tamoxifen and secondary tumors. An update. *Drug Saf*, 16, 104-117, 1997.

WU, Y., BARNABAS, N., RUSSO, I.H., YANG, X. and RUSSO, J. Microsatellite instability and loss of the heterozygosity in chromosomes 9 and 16 in human breast epithelial cells transformed by chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 18, 1069-1074, 1997.

YAMASAKI, H. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 1051-1058, 1990.

ZHANG, L., MIZUMOTO, K., SATO, N., OGAWA, T., KUSUMOTO, M., NIIYAMA, H., TANAKA, M. Quantitative determination of apoptosis death in cultured human pancreatic cancer cells by propidium iodide and digitonin. *Cancer Letters*, 142, 129-137, 1999.

**CAPÍTULO 2: ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO A CELL BIOLOGY
INTERNATIONAL, OUTUBRO DE 2003.**

**CYTOTOXICITY OF TAMOXIFEN IN NORMAL AND TUMORAL CELL LINES
AND ITS ABILITY TO INDUCE CELLULAR TRANSFORMATION *IN VITRO*.**

LEANDRO PETINARI¹, LUCIANA KONECNY KOHN², JOÃO ERNESTO DE
CARVALHO², and SELMA CANDELÁRIA GENARI^{1,3}.

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas,
(UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

²Division of Pharmacology and Toxicology, CPQBA, State University of Campinas,
(UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

³Centro Regional Universitário do Espírito Santo do Pinhal (CREUPI), Espírito Santo do
Pinhal, SP, Brazil

Correspondence to: Leandro Petinari, Department of Cell Biology, Institute of Biology,
State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, ZIP Code 13084-971,
Campinas, SP, Brazil. Tel/Fax: (+55) (19) 3788 6111, E-mail: leopet@unicamp.br

ABSTRACT

Tamoxifen (TAM) is a non-steroidal anti-estrogen drug used to treat patients with estrogen receptor-positive breast cancer and as a chemopreventive agent against breast cancer in high risk, pre- and post-menopausal women. However, recent studies have shown that tamoxifen causes endometrial and hepatic cancer. In this study, we examined the effects of tamoxifen (5, 10, 25 and 50 μ M) on the growth and proliferation of nine tumoral cell lines (UACC62, MCF-7, NCI-460, K562, OVCAR-03, PC-03, HT-29, 786-0, NCI-ADR) and four normal cell lines (3T3, V79, MDCK, VERO). Chinese hamster lung fibroblasts (V79) were the most sensitive lineage to tamoxifen, with 21.6% of the cells showing apoptosis at 50 μ M TAM. Microscopic analysis showed that, the cellular transformation caused by TAM in V79 cells was similar to that seen with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, thus indicating the carcinogenicity of TAM.

Key-Words: apoptosis, cellular transformation, cytotoxicity, DMBA, tamoxifen

Abbreviations: TAM - tamoxifen, DMBA - 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMSO - dimethyl sulfoxide, FCS - fetal calf serum, SRB - sulforhodamine B, TCA - trichloroacetic acid, PI - propidium iodide, PBS - phosphate buffer saline, SEM - scanning electron microscopy, DCIS - ductal carcinoma *in situ*, NCI - National Cancer Institute, FITC - fluorescein isothio-cyanate, FACS - fluorescence-activated cell sorting, GI - growth inhibition, ER - estrogen receptor, TGF- β_1 - transforming growth factor- β_1 .

INTRODUCTION

Tamoxifen (TAM) is a non-steroidal of anti-estrogen drug widely used as a coadjutor in the treatment of patients with estrogen receptor (ER)-positive breast cancer and ductal carcinoma *in situ* (DCIS). Tamoxifen is also used as a chemopreventive drug by pre- and post-menopausal women, with a potential risk for breast cancer (Clemons et al., 2002). The Breast Cancer Prevention Trial reported a 49% reduction in the incidence of breast cancer among participants who took tamoxifen for 6 years (Fisher et al., 1998). However, the long-term use of TAM can cause endometrial and hepatic cancer with severe side effects (Hemminki et al., 1997; Mourits et al., 2001), mainly because besides of cytostatic (G0/G1 arrest) and cytotoxic (induction of apoptosis) actions on cells. This dual effect suggests that TAM targets the checkpoint between cell cycle progression and apoptosis (Fattman et al., 1998). TAM is used experimentally to induce aneuploids and hepatic cancer in animals, and to stimulate the formation of DNA adducts in rat hepatic cells (Umemoto et al., 2001).

The cellular transformation caused by TAM *in vitro*, is related to the induction of carcinogenesis by different agents *in vivo* (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985). Cellular transformation involves changes in various cell properties, including cell-cell (Lowenstein, 1979), cell-substrate (Murray et al., 1980) and cell-environment (Cross and Dexter, 1991) interactions that can alter the growth behavior and pattern of cells in culture. Many of these changes are also observed in the development of cancer *in vivo*.

Several substances can promote cellular transformation and carcinogenesis, including 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA), an aromatic polycyclic hydrocarbon often used to induce mutagenesis and carcinogenesis *in vitro* and *in vivo* (Cinelli et al., 1996; Huang et al.,

1998). The metabolic activation of DMBA involves oxidative reactions mediated by cytochrome P450, with the formation of several diol epoxides, that can react with adenine and guanine in DNA, to form DNA adducts (Cinelli et al., 1996).

In this work, we examined the anti-proliferative activity of TAM in several normal and tumoral cell lines growth independently of the species they had been isolated, and then used the most sensitive cell line to assess the ability of TAM to induce cellular transformation *in vitro*. DMBA was used as a positive control.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines: The human tumoral lines K562 (leukemia), MCF-7 (breast), NCI-ADR (multi-resistant breast), 786-0 (renal), HT-29 (colon), NCI-460 (lung), PC-03 (prostate), OVCAR-03 (ovarian), and UACC62 (melanoma) were obtained from the National Cancer Institute (NCI), USA. The normal animal cell lines Vero (monkey kidney), V79 (hamster lung), and 3T3 (mouse lung), which consisted of fibroblast-like cells, and MDCK (dog kidney epithelial cells) were obtained from the Rio de Janeiro Cell Line Bank (Rio de Janeiro, Brazil) and the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil).

Cell Culture: The cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS: Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brazil) at 37°C with 5% CO₂. The medium was changed every two days until the cells reached confluence, at which point they were subcultured.

Antiproliferative Assay: The adherent cell lines were detached from the culture flasks by adding 0.5 mL of trypsin solution 0.025% (Nutricell). The trypsin was inactivated by adding 5 mL of 5% FCS in RPMI 1640 medium. Single-cell suspensions were obtained by a gentle pipetting action. After counting, the cells were diluted to appropriate seeding densities and transferred to 96-well microtiter plates (Nunc Brand Products) in a fixed volume of 100 μ L per well. The seeding densities were as follows: 3×10^4 (UACC62), 4×10^4 (NCI-460, PC-03, Vero, V79), 5×10^4 (NCI-ADR, 786-0, HT-29, MDCK), 6.5×10^4 (K-562, MCF-7) and 7×10^4 (OVCAR – 03, 3T3) cells per mL. This initial cell concentration was determined from individual growth curves, and ensured that the cells would be in the logarithmic growth throughout the experiment. The microtiter plates containing cells were pre-incubated for 24 h at 37°C to allow stabilization prior to the addition (100 μ L) of drug. The plates were incubated with the test substance for 48 h at 37°C and 5% CO₂ (Monks et al., 1991).

Solubilization and Dilution of Test Substance: Tamoxifen was tested at four concentrations (5, 10, 25 and 50 μ M), each in triplicate wells. The drug was initially solubilized in dimethylsulfoxide (Sigma) at 400 times the final maximum test concentration. The stock solution was then diluted with complete medium containing 50 μ g of gentamicin/mL (Schering-Plough).

Sulforhodamine B (SRB) Assay: The SRB is an aminoxanthine with a bright pink color that has two sulfonic groups. Since it is an anionic dye in weak acid solution it is capable of bonding to protein's aminoacids basic terminals cells fixed with trichloroacetic acid. Therefore this non-clonogenic methodology permits a high sensitive protein with a straight

relationship to cell culture. The SRB assay was done as described by Skehan et al. (1990). Briefly, the cells were fixed with 50% TCA (Sigma) at 4°C (50 µL/well, final concentration 10%) for 1 h. The supernatant was then discarded and the plates were washed five times with tap water. The cells were stained for 30 min with 0.4% SRB in 1% acetic acid (50 µL/well) (Sigma) and subsequently washed four times with 1% acetic acid to remove unbound dye. The plates were air dried and protein-bound dye was solubilized with 150 µL of 10 mM Trizma buffer (Sigma). The resulting optical density was read in a multiwell plate reader at 540 nm. For cells grown in suspension (e.g., leukemia), the same method was used, but the TCA concentration was 80%, in order to fix the cells to the plate bottom.

Data Calculations: The absorbances were calculated using the Excel[®] program (Microsoft Office package) and the mean $\pm$ standard error of the mean were calculated for triplicate wells. The background absorbances were subtracted from the appropriate control and drug-blank measurements. To assess the effect of TAM on cell growth, three measurements were obtained a time zero (T₀) values for all cells at the beginning of the incubation, and control (C) and test (T) values at the end of incubation without and with the test substance, respectively. For T value $\geq$ T₀ (cytostatic effect), the calculation was $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. While for T < T₀ (cytotoxic effect), the calculation was $100 \times [(T-T_0)/T_0]$. The IC₅₀ values (drugs concentration eliciting 50% inhibition) were determined by non-linear regression analysis. This results presented here refer to a representative experiment since all assays were run in triplicate and the average standard error was always < 5%.

Detection of Apoptosis by Annexin V-Biotin: Since V79 cells were the most sensitive to the cytotoxic effect of TAM, this cell line was used for the analysis of apoptosis and

morphological alterations. Apoptosis was detected using an annexin V-biotin kit (Oncogene Research Products), which is based on the fact that cells on apoptosis process expose the phosphatidylserine on the outer leaflet. The anticoagulant annexin V has anti-phospholipase activity and preferentially binds to negatively charged phospholipids like phosphatidylserine, being a convenient method for apoptosis detection on cells (Koopman et al., 1994). The propidium iodide (PI) is a marker that differs apoptosis from necrosis, binding itself to necrotic cell nucleus by pores formed in the plasma membrane of these cells. This process does not occur on apoptotic cells, where the integrity of the plasma membrane is kept. The test was performed following the manufacture's recommendation. Approximately 10^5 V79 cells were plated in T-25 flasks in RPMI-1640 medium (Sigma), supplemented with 10% FCS (Nutricell) (Day 0). On Day 1 TAM was added to final concentrations of 5, 10, 25 and 50 μ M. Untreated control cells received an equivalent volume of vehicle solution (0,1% DMSO). The cells were trypsinized and harvested after 24 h (Day 2) when confluence was < 25% cells. After washing in phosphate-buffer saline (PBS), the cells were re-suspended in PBS and the cell density was adjusted to 5×10^5 cells/mL. An aliquot (500 μ L) of this cell suspension was transferred to a micro centrifuge tube and 10 μ L of binding medium plus 1.25 μ L of annexin V-biotin were added followed by mixing and incubation for 15 min at room temperature in the dark. The mixture was then centrifuged (1000 x g, for 5 min) and the medium was removed and the cells re-suspended in 250 μ L of cold binding buffer, supplemented with 15 μ L of anti-biotin conjugated to fluorescein isothio-cyanate (FITC) and 10 μ L of PI. The cells were analyzed by flow cytometry in a fluorescence-activated cell sorter (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Morphological Analysis: Adhered V79 cells, (initial density - 1×10^5 cells/coverslips) were treated with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA, $1 \mu\text{g/mL}$); $10 \mu\text{M}$ TAM or both agents. In the latter case, the cells were initially cultured with DMBA for 24 h and subsequently treated with TAM for 24 h. The components were dissolved with in DMSO (final DMSO concentration in medium 0.1%). The cells were cultured for 48 h at 37°C and 5% CO_2 , and then fixed in ethanol:acetic acid (3:1, v/v) for 10 min followed by staining with 0.25% cresyl violet for 15 min. After a quick wash in distilled water, cells were air dried at room temperature, and then cleared in xylene and mounted in Entellan (Merck Kraal, Darmstadt, Germany).

Scanning Electron Microscopy (SEM): V79 cells (initially 1×10^5 cells/mL), were cultured on coverslips until semi-confluent (48 h), confluent (192 h) and multi-layered (192 h) cultures were obtained. The cells were then fixed with 2.5% paraformaldehyde (Merck Kraal) /glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M phosphate buffer (Merck Kraal), pH 7.4, for 2 h, then washed with phosphate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide (Sigma) and dehydrated in an ethanol series. The material was critical point dried (Balzers CPD030) and sputtered with gold (Balzers SCD 050). The specimens were examined in a JEOL JSM-5800 LV scanning electron microscope.

RESULTS

Anti-proliferative activity: As shown in figure 1 and table 1, tamoxifen was cytostatic for the renal cell lines 786-0 (tumoral) and MDCK (normal) and cytotoxic for the other cell lines, in a concentration-dependent manner. Normal cell lines were more sensitive to TAM than tumoral lines, since a TAM concentration of 10 μ M was cytotoxic to normal cell lines whereas a similar effect was observed in tumoral lines only at 25 μ M tamoxifen.

Induction of apoptosis: Tamoxifen caused a progressive, concentration-dependent increase in apoptosis and necrosis in V79 fibroblasts (Figure 2). These findings agreed with the results obtained in the anti-proliferative activity test at 50 μ M TAM, apoptosis affected 21.6% of the cells whereas 16.2% of the cells showed necrosis or late apoptosis.

Scanning Electron Microscopy: After 48 h control cells were semi-confluent and showed contact inhibition and anchorage-dependence (Fig. 3A, B). In contrast, cells treated with DMBA (Fig. 3C, D), TAM (Fig. 3E, F) and DMBA+TAM (Fig. 3G, H) showed loss of contact inhibition and multi-layered growth. Incubations with TAM (Fig. 1F), resulted in the formation of cellular aggregates, membrane blebbing, and pits on cellular surface. After 192 h, the control cells were confluent and formed a monolayer with further growth being prevented by contact inhibition (Fig. 4A, B). Cells treated with DMBA (Fig. 4C, D), TAM (Fig. 4E, F), and DMBA+TAM (Fig. 4G, H) showed multi-layered growth and cellular aggregates which grew independently in an uncontrolled manner. There was also an increase in the number of microvilli and in the formation of vesicles at the cell surface.

Morphological Analysis: Control cells stained with cresyl violet, had a normal morphology with regular, intact nuclei (Fig. 5A, B). Cells exposed to DMBA (Fig. 5C, D, E), TAM (Fig. 5F, G, H), and DMBA+TAM (Fig. 5I, J, K, L) showed several mitotic aberrations, including multi-nucleation, giant cells, and micronuclei, as well as nuclear fragmentation that was probably associated with death by apoptosis.

DISCUSSION

Anti-estrogenic therapies have been used for the treatment of breast carcinomas, especially when most of the tumoral cells are estrogen receptor-positive (Bursch, 1996). Experimental studies *in vitro* and *in vivo* have shown that mitotic activity decreases whereas apoptotic activity increases in tumoral cell populations after the administration of anti-estrogenic compounds like tamoxifen (Davidson et al., 1999).

The test for anti-proliferative activity showed that tamoxifen had an inhibitory effect on cell growth *in vitro*, with a concentration-dependent cytotoxic action on most of the normal and tumoral cell lines. The normal cell lines Vero, V79 and 3T3 were more sensitive to tamoxifen than the tumoral lines UACC62, MCF-7, NCI-460, K562, OVCAR-03, PC-03, HT-29 and NCI-ADR. The cytotoxicity of tamoxifen probably involves more than one pathway. One pathway may be estrogen receptor-independent, as shown in several ER-negative tumors in lung, stomach, prostate, bladder and breast cancer. In these tumors, TAM increased the levels of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), a pleiotropic cytokine that regulates the proliferation and functional activity of a wide range of cell types

(Hosoya et al., 1999; Tavassoli et al., 2002; Knabbe et al., 1987). This dual action was confirmed here since MCF-7 (tumoral breast cells) is ER-positive and NCI-ADR (drug-multiresistent tumoral breast cells) is ER-negative (Weinstein-Oppenheimer et al., 2002), yet both responded similarly to tamoxifen (Fig. 1).

The ER-dependent pathway involves tamoxifen binding to the ER, to form a TAM-ER complex that competitively inhibits the binding of estrogen to its receptor. The TAM-ER complex binds to an estrogen responsive element (ERE) that contains estrogen-sensitive genes. As a result, the transcription of estrogen responsive genes is attenuated. Thus, tamoxifen blocks the cell cycle in the G₁ phase, thereby decreasing cell proliferation (Clemons et al., 2002). A possible explanation for the finding that normal cell lines were more sensitive to tamoxifen (with lower IC₅₀ among all tested) than tumoral lines could be the higher expression of ER by normal cells. Abundant expression of ER α in V79 cells has been shown by RT-PCR (Kong et al., 2000). This observation could account for the greater inhibition of growth is seen in V79 cells treated with 10 μ M tamoxifen. This difference between normal and tumoral cells was not maintained at 25 μ M and 50 μ M tamoxifen, for which similar growth inhibition was observed in these cell lines. In the pattern cases, growth may have been inhibited by the cytotoxicity of tamoxifen, which could lead to quicker death of both normal and tumoral cells. This conclusion agrees with studies showing that the action of tamoxifen at low concentrations is mediated by the estrogen receptor while an ER-independent mechanism is involved at high concentrations (Tanos et al., 2002).

The two renal cell lines, MDCK (normal) and 786-0 (tumoral), showed only a cytostatic effect. The higher resistance of these cells to tamoxifen may be related to the cell type, a loss or decrease of ER, mutations, and down-regulation (Clemons et al., 2002).

Because of this higher sensitivity to tamoxifen, V79 cells were used to assess the effects of TAM on cell viability, structure and morphology. The annexin V-biotin test showed that there was a progressive increase in the apoptosis and necrosis with increasing tamoxifen concentrations.

Studies with fibroblasts transformed *in vitro* have shown a decrease in fibronectin on the cell surface (Santi and Zardi 1985), that can adversely effects cell-cell and cell-substrate interactions and lead to a loss of growth by contact inhibition and anchorage-dependency. This may eventually trigger uncontrolled cell growth and the formation of multiple-layers (Genari et al., 1996, 1998). Such changes were observed in scanning electron micrographs of V79 cells exposed to TAM, DMBA and DMBA+TAM. The initial signs of cellular transformation included the loss of contact inhibition, membrane blebbing and the appearance of pits. There was also an increase in cell surface microvilli, indicator of cellular stress and of approaching death. Additional morphological alterations included the formation of cellular aggregates, that showed independent and uncontrolled growth. The new, transformed cells differed in their characteristics from the original cells. Similar alterations were also observed in cells exposed to DMBA (positive control).

The morphological analysis (Fig. 5) revealed mitotic aberrations, including multi-nucleation, giant cells and micronuclei, as well as nuclear fragmentation. The latter was associated mainly with apoptosis. These alterations may lead to genetic instability, cellular

transformation, and cell death. These findings agree with previous studies indicating that DMBA and TAM can lead to DNA adduct formation. This injury is responsible for the activation of metabolic pathways that contribute for DNA fragmentation and the induction of cell death by apoptosis or necrosis, depending on the dose and the duration of exposure to the drug (Bursch et al., 1997; Umemoto et al., 2001; Barbisan et al., 1999).

In conclusion tamoxifen was cytotoxic to all of the cell types tested here, but was more aggressive in normal cell lines compared to tumoral cells. In ER-positive V79 cells, TAM induced cytotoxicity and cellular transformation in a manner similar to DMBA, a well-known carcinogenic agent. These actions of TAM in ER-positive V79 cells may be related to its ability to induce tumors in tissues with estrogen receptor-positive cells, such as the uterine endometrium.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks Dr. Claudia Barbosa Ladeira de Campos for helping with the flow cytometry experiments, Sirlene Valério Tinti for help in culturing the cells and Patrícia da Luz Moreira for revising the manuscript. Leandro Petinari was supported by a studentship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- BARBISAN SF, MELLO MLS, RUSSO J, and VIDAL BC, 1999. Apoptosis and catastrophic cell death in benzo(a)pyrene-transformed human breast epithelial cells. *Mutation Research* 431: 133-139.
- BURSCHE W, 1996. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164384 in mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17: 1595-1607.
- BURSCHE W, ELLINGER A, TÖRÖK L, PARZEFALL W, COULIBALY S, HOCHEGGER K, SCHÖRKHUBER M, PARTIK G, MARIAN B, WALKER R, SIKORSKA M, and SCHULTE-HERMANN R, 1997. *In vitro* studies on subtypes and regulation of active cell death. *Toxicology in Vitro* 11: 579-588.
- CINELLI S, FALEZZA A, CILIUTTI P, MARIANI MF and VERICAT JA, 1996. Light-dependent activation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene to a potent genotoxicant. *Carcinogenesis* 17: 2529-2533.
- CLEMONS M, DANSON S, HOWELL A, 2002. Tamoxifen ('Nolvadex'): a review. *Cancer Treatment Review* 28: 165-180.
- CROSS M, and DEXTER TM, 1991. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64: 271-280.
- DAVIDSON NE, HAHM HA, ARMSTRONG DK, 1999. Apoptosis and Breast Cancer, In: Hichman JA, Dive C, editors. *Cancer Drug Discovery and Development: Apoptosis and Cancer Chemotherapy Humana*. Press Totowa, New Jersey, 291-303.
- FATTMAN CL, AN B, SUSSMAN S, and DOU QP, 1998. p53-Independent dephosphorylation and cleavage of retinoblastoma protein during tamoxifen-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer Letters* 130: 103-113.
- FISHER B, CONSTANTINO JP, WICKERHAM CDL, REDMOND CK, KAVANAH M, CRONIN WM, VOGEL V, ROBIDOUX A, DIMITROV N, ATKINS J, DALY M, WIEAND S, TAN-CHIU E, FORD L, WOLMARK N, and OTHER NATIONAL SURGICAL ADJUVANT BREAST and BOWEL PROJECT INVESTIGATORS, 1998. Tamoxifen for prevention of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1371-1388.
- GENARI SC, DOLDER MAD, and WADA MSF, 1996. Scanning and transmission electron microscopy of transformed Vero cells, with altered *in vitro* growth characteristics, *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28(4): 565-572.
- GENARI SC, GOMES L and WADA MSF, 1998. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *Cell Biology International* 22(4): 285-294.
- HEMMINKI K, RAJANIEMI H, KOSKINEN M and HANSSON J, 1997. Tamoxifen-induced DNA adducts in leucocytes of breast cancer patients. *Carcinogenesis* 18: 9-13.
- HOSOYA Y, KITO H, KOBAYASHI E, OKABE R, FUJIMURA A and KANAZAWA K, 1999. Combination effects of tamoxifen plus 5-fluoracil on gastric cancer cell lines *in vitro*. *Cancer Letters* 140: 139-143.
- HUANG MT, LOU Y-R, XIE JG, MA W, LU Y-P, ZHU BT, NEWMARK H, and HO C-T, 1998. Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-

- dimethylbenz(a)anthracene induced mammary tumours and lymphomas/leukemias in Sencar mice. *Carcinogenesis* 19: 1697-1700.
- IARC/NCI/EPA WORKING GROUP, 1985. Cellular and molecular mechanisms of transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Research*. 45: 2395-2399.
- KNABBE C, LIPPMAN ME, WAKEFIELD LM, 1987. Evidence that TGF- β is a hormonally regulated negative growth factor in human breast cancer cells. *Cell* 48: 417-428.
- KONG LY, SZANISZLO P, ALBRECHT T, LIEHR JG, 2000. Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *International Journal of Oncology*. 17 (6): 1141-1149.
- KOOPMAN G, REUTELINSPERGER CPM, KUIJTEN GAM, KEEHNEN RMJ, PALS ST and van OERS MHJ, 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84 (5): 1415-1420.
- LOEWENSTEIN WR, 1979. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. et Biophys. Acta*. 560: 1-65.
- MONKS A, SCUDIERO D, SKEHAN P, SHOEMAKER R, PAULL K, VISTICA D, HOSE C, LANGLEY J, CRONISE P, VAIGRO-WOLFF A, GRAY-GOODRICH M, CAMPBELL H, MAYO J, and BOYD MR, 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 757-766.
- MOURITS MJE, De VRIES EGE, WILLEMSE PHB, TEN HOOR KA, HOLLEMA H, Van Der ZEE GJ, 2001. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. *Am J Obstet Gynecol* 97 (5): 855-865.
- MURRAY JC, LIOTTA L, RENNARD SI and KELLIE S, 1980. Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cells *in vitro*. *Cancer Res*. 40: 347-351.
- SANTI L and ZARDI L, 1985. Theories and Models in Cellular Transformation, 1^a ed. Genoa, Academic Press.
- SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, MONKS A, McMAHON J, VISTICA D, WARREN JT, BOKESCH H, KENNEY S, BOYD MR, 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*. 82: 1107-1118.
- TANOS V, BRZEZINSKI A, DRIZE O, STRAUSS N and PERETZ T, 2002. Synergistic inhibitory effects of genistein and tamoxifen on human dysplastic and malignant epithelial breast cells *in vitro*. *European J. of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 102: 188-194.
- TAVASSOLI M, SOLTANINIA J, RUDNICKA J, MASHANYARE D, JOHNSON N and GÄKEN J, 2002. Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF- β 1. *Carcinogenesis* 23 (10): 1569-1575.

- UMEMOTO A, KOMAKI K, MONDEN Y, SUWA M, KANNO Y, KITAGAWA M, SUZUKI M, LIN CX, UHEYAMA Y, MOMEN MA, RAVINDERNATH A and SHIBUTANI S, 2001. Identification and quantification of Tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (8): 1006-1013.
- WEINSTEIN-OPPENHEIMER CR, BURROWS A, STEELMAN LS, Mc CUBREY JA, 2002. The effects of beta-estradiol on Raf activity, cell cycle progression and growth factor synthesis in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Biology & Therapy* 1(3): 256-262.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Antiproliferative effect of tamoxifen on normal and tumoral cell lines. Tamoxifen concentration: 5, 10, 25, 50 μM ; absorbance reading: $\lambda = 560 \text{ nm}$. Growth between 0% and 50% indicated a cytostatic effect while growth $< 0\%$ indicated a cytotoxic effect. The experiments were done in triplicate as described in the Methods section using a panel of NCI tumoral cells.

Figure 2: Apoptosis detected in V79 cells by flow cytometry (annexin-V -biotin-FITC), Quadrants: lower-left - negative immunofluorescence; lower-right - annexin-V positive (AV+) (apoptosis); upper-left - propidium iodide positive (IP +); upper-right - IP+, AV+ (necrosis). A total of 3000 cells was counted. Control cells were used to localize the cells by their size and granularity. The experiment was done in triplicate. Note the migration of cells from the region of negative fluorescence to that of positive fluorescence, and finally to AV, indicating apoptosis. Similar to the quadrant with double labeling (AV+, IP+), indicating necrosis.

Figure 3: Representative scanning electron micrographs of V79 cells after 48 h of treatment: A, B - untreated cells, C, D – DMBA, E, F - TAM - treated cells with blebs (arrows) and pits (p), G, H – treatment with DMBA and TAM. Scale bars: A,C,E,G 20 μm and B,D,F,H 8 μm .

Figure 4: Representative scanning electron micrographs of V79 cells after 192 h of treatment: A, B - untreated cells, C, D - DMBA - treated cells with cell aggregates (ca) and vesicles

(arrow), E, F - TAM - treated cells with cell aggregates (ca) and vesicles (arrow), G, H - DMBA and TAM treated cells with cell aggregates (ca) and vesicles (arrow). Scale bars: A 20µm, C, E,G 50µm, B,D,F,H 8µm.

Figure 5: Light micrographs of by cresyl violet - stained V79 cells after treatment: A, B - untreated cells, C, D, E – DMBA - treated cells with multi-nucleation (arrow) and nuclear fragmentation (arrow head), F, G, H - TAM - treated cells with giant cells (asterisk) and nuclear fragmentation (arrow head), I, J, K, L – DMBA and TAM treated cells with giant cells (asterisk), nuclear fragmentation (arrow head) and micronucleus (double arrow). Scale bars A,D,F,I 40µm and B,C,E,G,H,J,K,L 16µm.

Table 1. IC₅₀ values (concentration eliciting 50% inhibition) for TAM in various cell lines as determined by non-linear regression analysis of the results obtained in the SRB assay; ND – not determined; concentration range of TAM tested:

Cell line	IC ₅₀ (µM)
UACC62	12.66
MCF-7	12.59
NCI-ADR	15.83
786-0	20.59
NCI-460	6.07
K-562	ND
PC03	4.70
OVCAR03	14.52
HT-29	9.30
3T3	7.58
V79	2.08
MDCK	15.98
VERO	ND

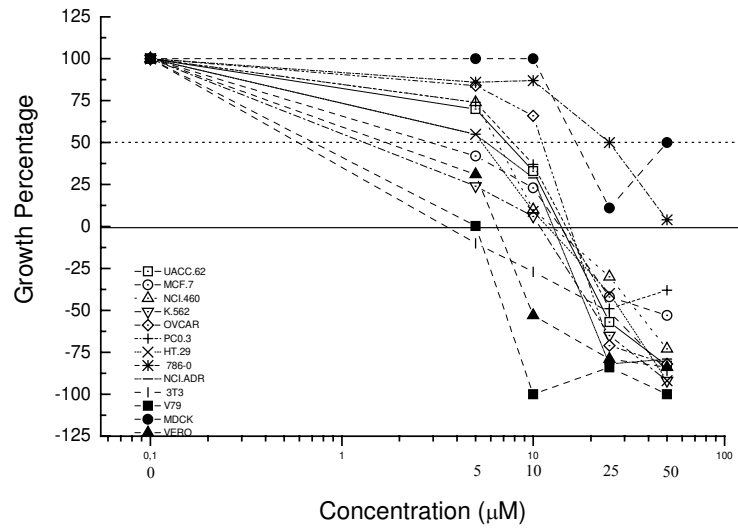


FIGURE 1

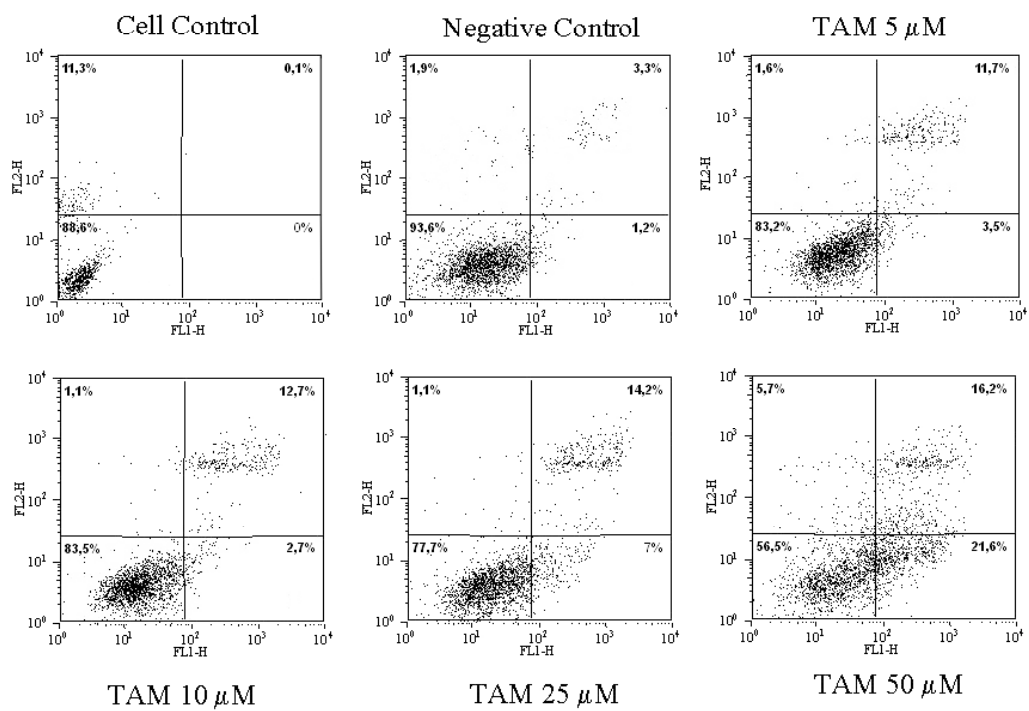


FIGURE 2

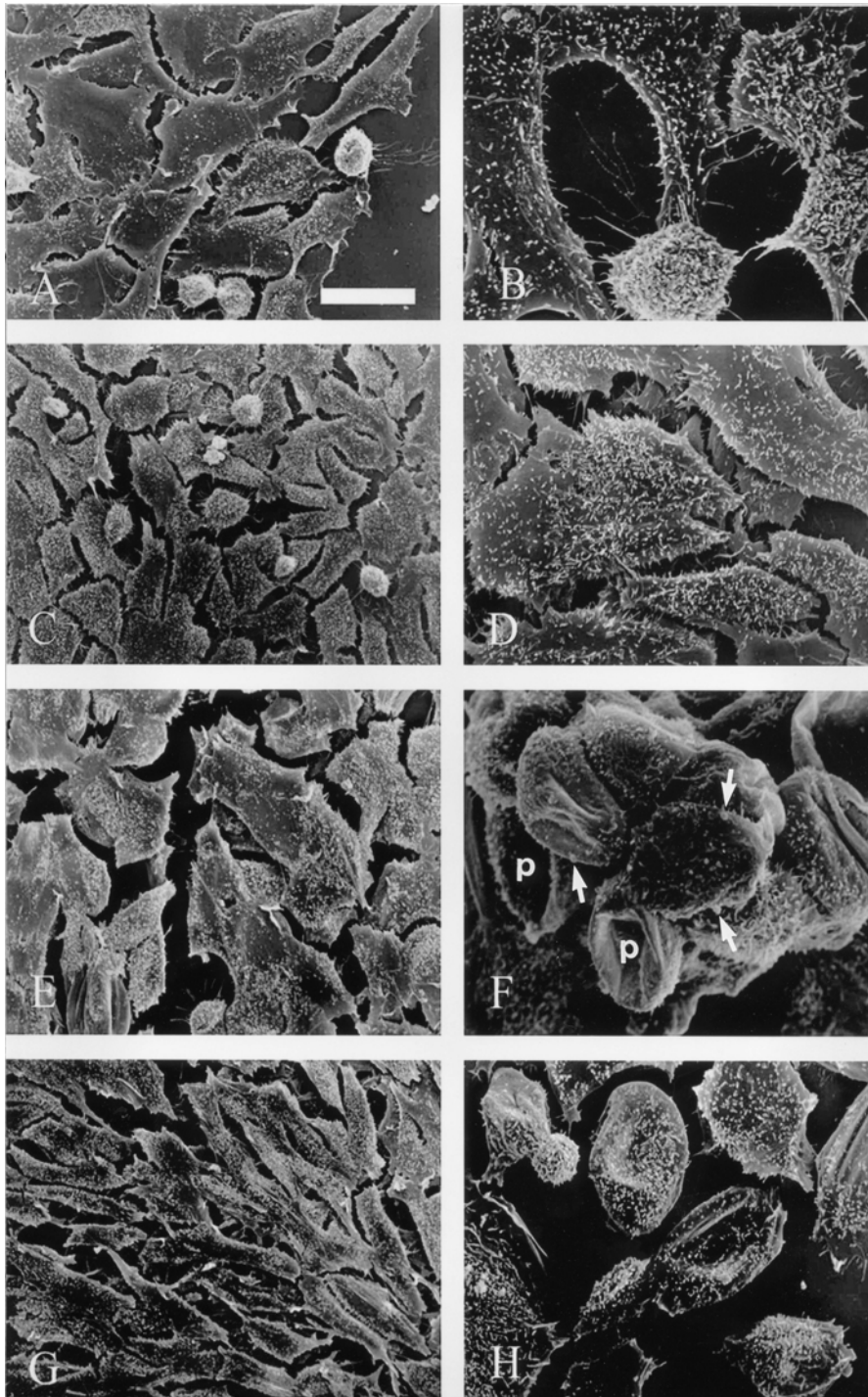


FIGURE 3

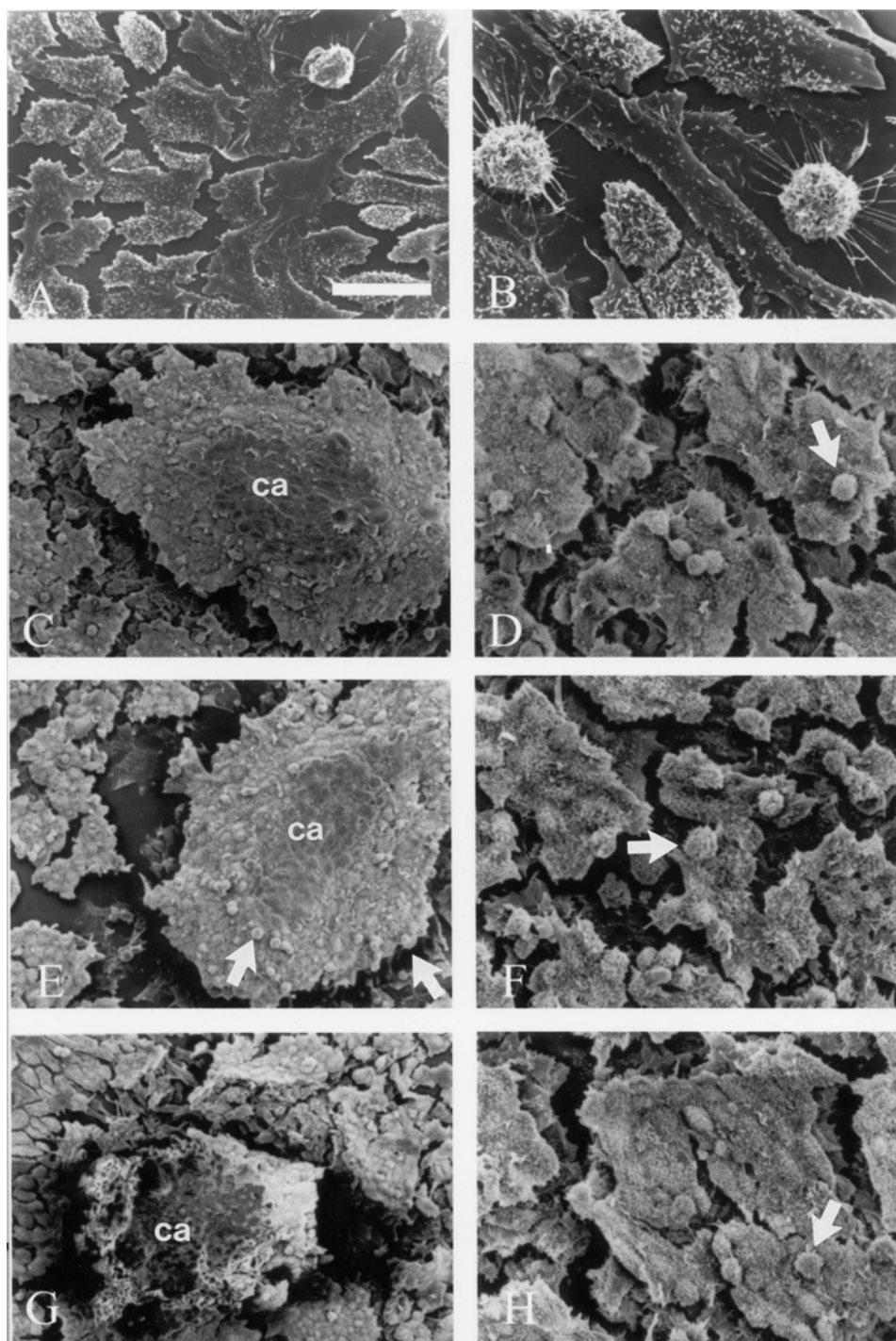


FIGURE 4

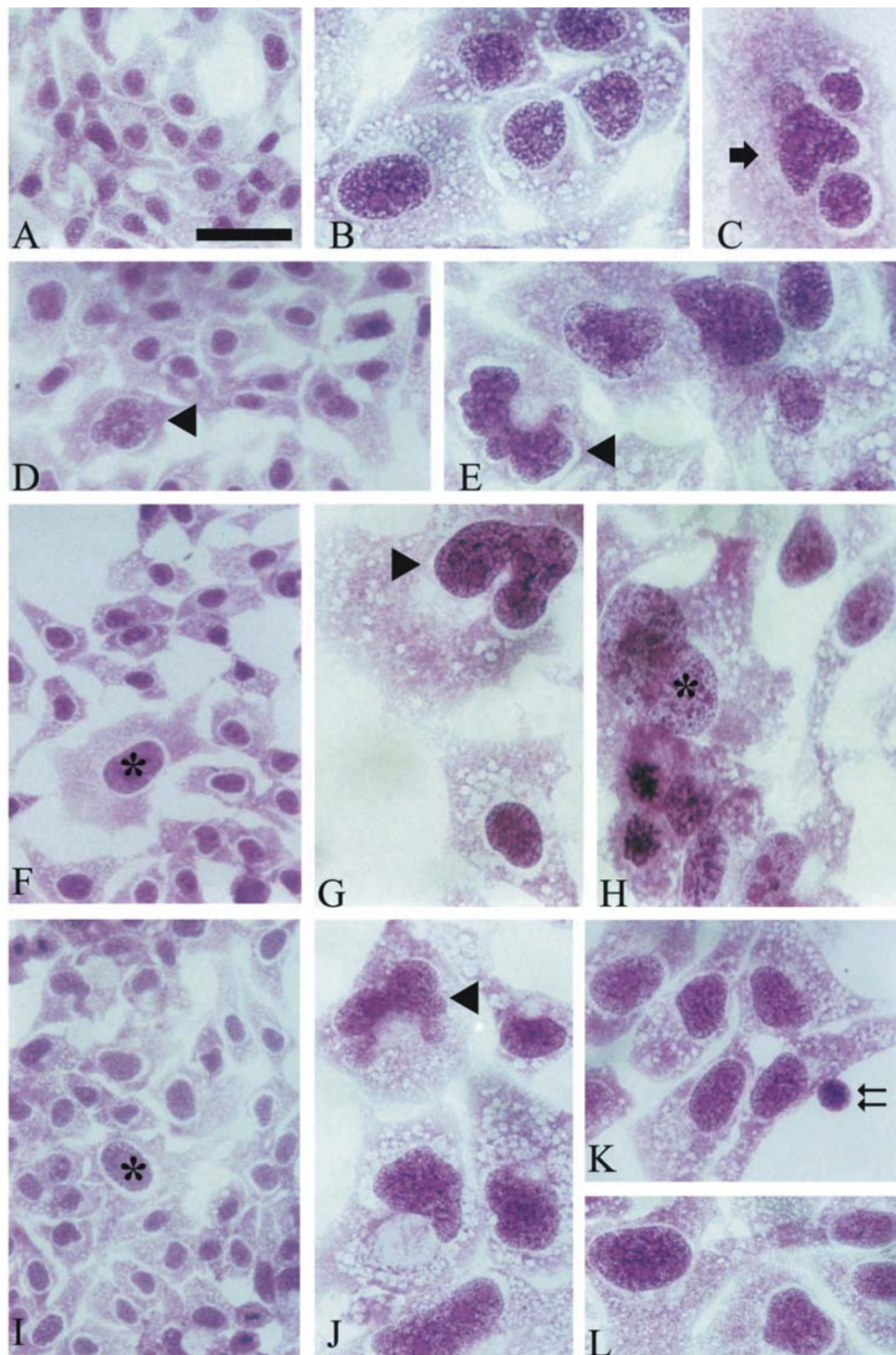


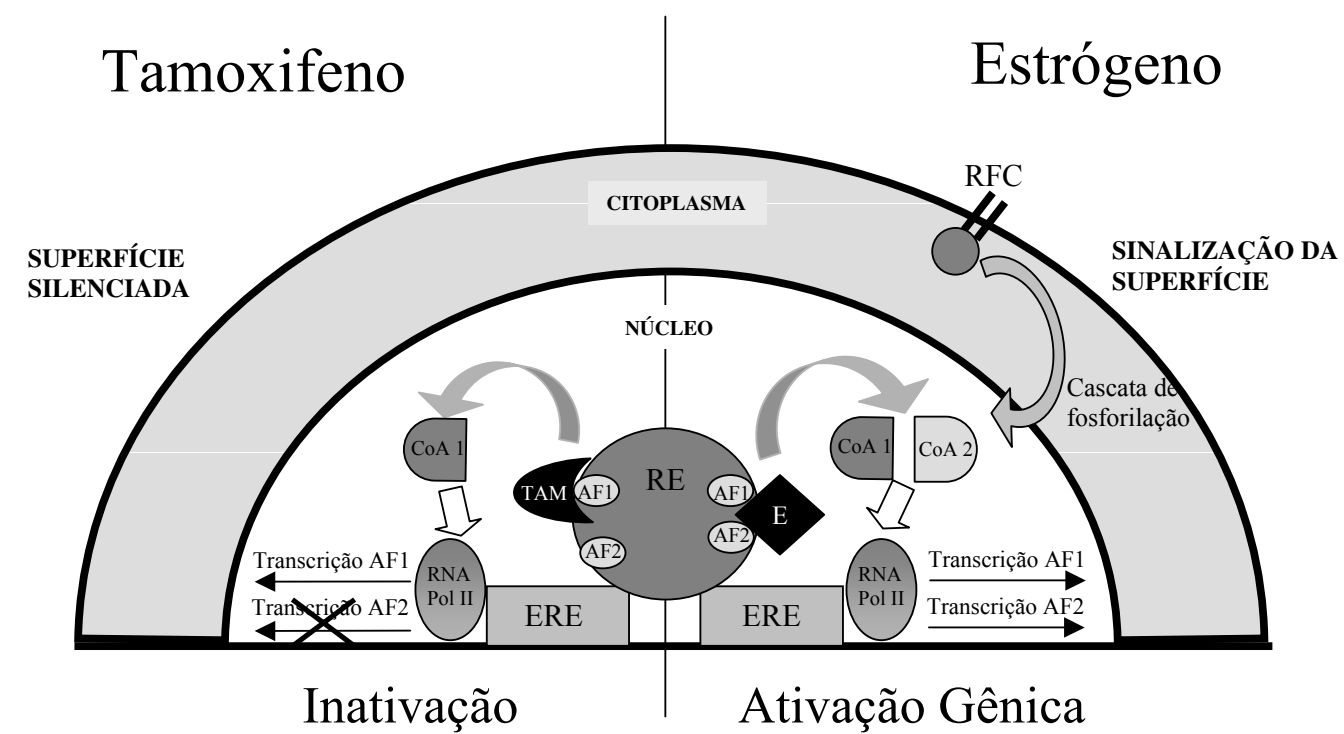
FIGURE 5

CAPÍTULO 3: CONCLUSÕES

- As células normais apresentaram maior sensibilidade a ação do tamoxifeno do que as linhagens tumorais na concentração de 10 μ M, evidenciando uma ação seletiva nesta dosagem. A linhagem V79 foi a mais susceptível a atividade citotóxica do tamoxifeno, possivelmente devido a abundante expressão de receptores de estrógeno presentes nessas células.
- Com o aumento da concentração de tamoxifeno para 25 e 50 μ M, houve uma ação citotóxica tanto para as células tumorais quanto para as normais, evidenciando a potencialização dos efeitos tóxicos dependentes da dose, levando a morte celular sem seletividade nestas concentrações.
- Nas linhagens renais 786-0 (tumoral) e MDCK (normal), o tamoxifeno teve efeito citostático apenas, esse resultado pode estar relacionado a diversos fatores como: baixa ou nenhuma expressão de receptores de estrógeno, origem epitelial dessas linhagens ou até mutações que levaram a maior resistência ao tamoxifeno.
- As células V79 sob ação do tamoxifeno tiveram uma resposta dose dependente, demonstrando um aumento progressivo da apoptose e da necrose com o aumento dose. Esse resultado concorda com os dados obtidos no teste de atividade antiproliferativa, onde o efeito observado foi dependente da concentração.
- Em microscopia eletrônica de varredura observamos que o tamoxifeno promoveu várias alterações no padrão de crescimento e na morfologia celular como: crescimento em múltiplas camadas com formação de agregados celulares, evidenciando a perda da inibição por contato.

- Pelos estudos morfológicos em microscopia óptica e eletrônica de varredura o tamoxifeno causou fragmentação nuclear, formação de micronúcleos além de núcleos gigantes, aparecimento de "blebbing" e "pits" na superfície das células, características estas associadas ao perfil apoptótico e que demonstram o efeito citotóxico do tamoxifeno nessas células.

- A partir dessas características apresentadas conclui-se que o tamoxifeno causou transformação das células V79, de forma semelhante a ocorrida nas células expostas ao DMBA, o que representa um efeito negativo do tamoxifeno em nível celular.



Anexo 1: Modelo comparativo do mecanismo de ação específico do estrógeno e do tamoxifeno. O estrógeno (E), liga-se ao receptor de estrógeno (RE) através de regiões funcionais de ativação transcricional (AF1, AF2), essas regiões quando ativadas interagem com coativadores transcricionais (CoA1 e CoA2), para estimular a atividade da RNA polimerase II (RNA Pol II) esta age em genes responsivos ao estrógeno conhecidos como elementos responsivos ao estrógeno (ERE), regulando a atividade gênica. Além disso, permitem que receptores para fatores de crescimento (RFC) sejam expressados na superfície celular, o que permite uma ativação de CoA1 e CoA2 a partir da ligação de fatores de crescimento. O tamoxifeno (TAM) liga-se ao RE e inibe competitivamente a ligação do estrógeno ao RE, contudo apenas AF1 é ativado e conseqüentemente apenas genes ativados por AF1 serão transcritos. A inativação de AF2 resulta em uma atenuação da transcrição levando ao bloqueio do ciclo celular em G1, e diminuindo a proliferação celular, além disso, a superfície celular ficará silenciada, não expressando RFC, impedindo a ligação de fatores de crescimento.