

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Estudo citogenético em camundongos C57BL/6 selvagens e *knockout* para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4NQO

Mara Ribeiro de Almeida

Uberaba-MG
Maio/2008

Mara Ribeiro de Almeida

Estudo citogenético em camundongos
C57BL/6 selvagens e *knockout* para o gene
da galectina-3 tratados com o carcinógeno
4NQO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Patologia, área de concentração
“Patologia Clínica”, da Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, como requisito parcial
para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Francisca da Luz Dias

Uberaba-MG
Maio/2008

“...o trabalho me assegura o salário do espírito, o aprendizado me abre os melhores caminhos e o amor me eleva...”

(Vitor Ribeiro de Almeida)

Dedicatória

A Deus, que me iluminou guiando todos os meus passos, principalmente nos momentos mais difíceis...

... aos meus pais, Maida e Jânio, pelo imenso amor com que me criaram. Por serem responsáveis pela minha formação, oferecendo todas as condições, seja financeira, moral e intelectual, que me permitiram alcançar esse objetivo. Com todo amor e gratidão...

... aos meus irmãos, Vitor (*in memoriam*) e Flávio, que apenas com suas presenças me deram forças pra continuar a caminhada. Com todo carinho...

... ao meu noivo, Marcos Vinícius, por estar sempre ao meu lado me apoiando e dando forças nos momentos mais difíceis.

Agradecimientos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Mota Loyola, pela atenção e respeito com que sempre me atendeu. Meus agradecimentos....

À minha co-orientadora, Prof^a. D^a. Francisca da Luz Dias, pelo carinho e paciência com que sempre me ajudou e, acima de tudo, pela sua amizade. Essa conquista devo muito a você. Muito obrigada....

Ao Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria, meus agradecimentos pela importante colaboração durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva do Laboratório de Fisiologia do departamento de Ciências Biológicas da UFTM, pela presteza e solicitude.

Aos funcionários do Laboratório de Genética da FMTM, Ricardo, Vera e Elaine, pela dedicação com que sempre me ajudaram.

Aos estagiários do Laboratório de Patologia Bucal da UFU, Débora e Marcos Vinícius, meus agradecimentos pela ajuda no tratamento e manutenção dos animais.

Às minhas amigas, Estela de Oliveira Lima e Polyanna Miranda Alves, pela ajuda no sacrifício dos animais e pelo apoio durante todo o desenvolvimento do projeto.

À professora Dr^a. Beatriz Martins Tavares Murta, professora da disciplina de Farmacologia da UFTM, pelo apoio e fornecimento de alguns materiais necessários para o desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia da UFTM, Januário e Douglas, pela ajuda na manutenção dos animais.

À professora Dr^a. Marly Aparecida Spadotto Balarin, chefe do laboratório de Genética da UFTM, pela disponibilidade do laboratório.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 A genética do câncer.....	16
2.2.Micronúcleo	20
2.3.Galectina-3	24
2.4. Carcinogênese experimental e 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO)	29
3. HIPÓTESE	34
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS	38
5.1 Animais	38
5.2 Preparação e aplicação do carcinógeno.....	40
5.3 Carcinogênese lingual: Análise microscópica das alterações epiteliais.....	41
5.4 Teste do micronúcleo em células da medula óssea de roedores.....	43
5.5 Análise estatística	45
6. RESULTADOS	48
6.1 Carcinogênese lingual: achados microscópicos no epitélio	48
6.2 Frequência de eritrócitos micronucleados da medula óssea.....	52
7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÃO	66
RESUMO	68
ABSTRACT	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO I	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação do micronúcleo em células da linhagem eritrocitária.....	20
Figura 2: Formação dos Eritrócitos Policromáticos (PCE) e Normocromáticos (NCE) na medula óssea.....	21
Figura 3: Fórmula estrutural da 4-Nitroquinolina-1-Oxido	30
Figura 4: Aspecto microscópico do carcinoma epidermóide bem diferenciado observado na língua dos animais WT e KO no período de 32 semanas. Observar a presença de invasão (*) e de pérolas córneas (<i>seta</i>) no tecido neoplásico. (100X, HE)	51
Figura 5: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado da medula óssea de camundongos <i>knockout</i> para o gene da galectina-3 (objetiva de 125X, aumento final de 1250X)	52
Figura 6: Fotomicrografia de eritrócitos normocromáticos (A) e policromático (B) - contendo 1 micronúcleo- da medula óssea de camundongos C57Bl/6 selvagens (objetiva de 100X)	53
Figura 7: Média do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) da medula óssea de camundongos selvagens (WT) e <i>knockout</i> (KO) para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4-nitroquinolina (4 NQO)	55
Figura 8: Média do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) da medula óssea de camundongos selvagens (WT) e <i>knockout</i> (KO) para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4-nitroquinolina (4 NQO)	57
Figura 9: Média do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) da medula óssea de camundongos selvagens (WT) e <i>knockout</i> (KO) para o gene da galectina-3 do grupo controle com água nos dois períodos de observação, 16 e 32 semanas	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação histológica dos CE baseada em critérios de diferenciação tecidual neoplásica recomendados pela Organização Mundial da Saúde, 2005	43
Tabela 2: Distribuição dos tipos de lesões encontradas nos animais selvagens (WT) e <i>knockout</i> (KO) de 16 e 32 semanas após tratamento com 4NQO	50
Tabela 3: Média \pm desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE), eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) e da relação PCE/NCE em células da medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e <i>knockout</i> (KO) para o gene da galectina-3.....	54
Tabela 4: Média \pm desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE), eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) e da relação PCE/NCE em células da medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e <i>knockout</i> (KO) para o gene da galectina-3 agrupados de acordo com o tempo de observação	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4NQO: 4-nitroquinolina

4HAQO: 4-hidroxiaminoquinolina-1-oxido

CDK: Cinasas dependentes de ciclinas

CDR: Domínios de reconhecimento de carboidrato

CE: Carcinoma epidermóide

CP-KO₁₆: Animais *knockout* tratados com propilenoglicol por um período de observação de 16 semanas

CP-KO₃₂: Animais *knockout* tratados com propilenoglicol durante 32 semanas de observação

CP-WT₁₆: Animais selvagens tratados com propilenoglicol durante 16 semanas de observação

CP-WT₃₂: Animais selvagens tratados com propilenoglicol durante 32 semanas de observação

g: grama

h: hora

H₂O-KO₁₆: Animais *knockout* do grupo controle, os quais receberam apenas água durante 16 semanas

H₂O-KO₃₂: Animais *knockout* do grupo controle, os quais receberam apenas água durante 32 semanas

H₂O-WT₁₆: Animais selvagens do grupo controle, os quais receberam apenas água durante 16 semanas

H₂O-WT₃₂: Animais selvagens do grupo controle, os quais receberam apenas água durante 32 semanas

KO: Animais *knockout* para o gene da galectina-3

KO₁₆: Animais *knockout* tratados com 4NQO durante 16 semanas, sem tempo de espera

KO₃₂: Animais *knockout* tratados com 4NQO durante 16 semanas mais 16 semanas de espera

LGALS3: Gene humano da galectina-3

ml: mililitro

MN: Micronúcleo

MN PCE: Eritrócito policromático micronucleado

MN NCE: Eritrócito normocromático micronucleado

NCE: Eritrócitos Normocromáticos

ORF: Fase de leitura aberta

PCE: Eritrócitos Policromáticos

PCE/NCE: Relação de eritrócitos policromáticos sobre normocromáticos

rpm: rotações por minuto

T_{máx}: Tempo máximo

WT: Animais selvagens

WT₁₆: Animais selvagens tratados com 4NQO durante 16 semanas de observação

WT₃₂: Animais selvagens tratados com 4NQO durante 32 semanas de observação

µg: micro-grama

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A correta duplicação do genoma, seguida da segregação dos cromossomos livres de danos para as células filhas garante a integridade do DNA e é crucial para a saúde e longevidade de todos os organismos. Para assegurar a fidelidade desses processos, as células respondem aos danos genéticos pela parada do ciclo celular e induz o reparo do DNA (Levitt *et al.*, 2007). Para tanto, a progressão do ciclo celular está associada a ação regulatória periódica traduzida pelos chamados pontos de controle ou *checkpoints*. Este mecanismo garante proteção e integralidade estrutural a todos os componentes celulares antes que a célula passe para o estágio seguinte (Pierce 2004). Outro mecanismo celular que monitora os danos genéticos é a morte celular programada – apoptose. Quando as células apresentam mutações cromossômicas, danos no DNA e outras anomalias celulares normalmente elas sofrem apoptose impedindo sua proliferação (Pierce, 2004). Defeitos nesses mecanismos levam à perda da estabilidade genômica das células, ou seja, levam à instabilidade genética, a qual está relacionada com diversos processos patológicos, principalmente à carcinogênese (Klein *et al.*, 2006).

A principal causa da transformação maligna das células é a instabilidade genômica, a qual leva a uma série de eventos mutacionais (Lou *et al.*, 2007). As células cancerosas são geneticamente instáveis e a taxa elevada do crescimento celular é uma consequência dessa instabilidade. Uma vasta gama de anomalias citogenéticas é vista em todos os tipos de cânceres (Nussbaum, McInnes, Willard, 2002). O micronúcleo (MN) é o resultado de quebras cromossômicas ou uma consequência de cromossomos inteiros que não se prenderam às fibras do fuso mitótico. Estes fragmentos ou cromossomos inteiros não são incorporados ao núcleo celular e são encapsulados em um pequeno núcleo, daí o termo MN. Assim, o MN representa

tanto uma alteração cromossômica estrutural como uma alteração numérica (Salvadori, Ribeiro, Fenech, 2003). Aumento da frequência de MN é indicativo de elevação das taxas de mutações, ou seja, é um parâmetro que representa o aumento da instabilidade genética nas células, o que está relacionado ao desenvolvimento de carcinomas (Carvalho *et al.*, 2002).

A galectina-3 é uma proteína da família das lectinas que possuem em comum afinidade de ligação por β -galactosídeos através de Domínios de Reconhecimento de Carboidratos (CDR) (Krzeslak, Lipinska, 2004). Dependendo de sua localização celular, a galectina-3 possui funções biológicas pleiotrópicas. No meio intracelular ela atua como uma molécula anti-apoptótica, regula o ciclo celular e está superexpressada durante a progressão do tumor e formação de metástases em diversas malignidades humanas. No núcleo celular está envolvida com o *splicing* do RNAm e altera a expressão de diversos tipos de genes, como aqueles envolvidos na regulação do ciclo celular (ciclina D1 e B), nos *checkpoints* (retinoblastoma 1) e no processo de apoptose (genes da família das catepsinas) (Yang, Hsu, Liu, 1996; Matarrese *et al.*, 2000; Takenaka, Fukumori, 2004).

Tendo em vista que a galectina-3 exerce funções regulatórias no ciclo celular atuando na sua progressão, seu papel na carcinogênese tem sido discutido, tornando possível admitir que ela, direta ou indiretamente poderia estar comprometida com a integridade cromossômica e, portanto, com a estabilidade do DNA. Esta suposição estaria vinculada a sua associação com proliferação celular quanto na função antiapoptótica. Ambos os eventos poderiam predispor a célula a maior probabilidade de assimilar danos ao DNA. Dessa forma, a proposta deste trabalho é investigar a existência de uma possível relação entre a galectina-3 e a instabilidade genética das células quando expostas a agentes genotóxicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A genética do câncer

As células normais de um organismo crescem, se dividem, amadurecem e morrem em resposta a um conjunto complexo de sinais internos e externos. Uma célula normal recebe tantos sinais estimulatórios quanto inibitórios, e seu crescimento e divisão são regulados por um equilíbrio delicado entre essas forças. Em uma célula cancerosa, os sinais estimulatórios e inibitórios que controlam sua divisão estão perturbados fazendo com que a célula prolifere a uma taxa anormalmente alta. À medida que perdem sua resposta aos controles normais de proliferação, as células cancerosas gradualmente perdem sua forma e limites regulares, formando por fim uma massa distinta de células anormais – o tumor (Pierce, 2004).

A principal causa do câncer é a alta mudança genética, ou seja, a alta taxa de mutações no DNA celular ou também chamada de instabilidade genética, a qual é um estado transitório ou persistente que leva a uma série de eventos mutacionais (Lou *et al.*, 2007). Cada célula do organismo possui diversos genes que controlam o crescimento celular. Muitos desses genes defeituosos podem ser transmitidos para gerações futuras, enquanto outros se acumulam em forma de mutações resultantes de erros durante a replicação celular, muitas dessas mutações podem resultar em neoplasias. As mutações relacionadas aos cânceres afetam diversos tipos de genes: (1) mutações que promovem o crescimento celular pela ativação de oncogenes; (2) mutações que diminuem a supressão do crescimento celular pela inativação dos genes supressores tumorais; (3) mutações que resultam na deficiência ou inativação dos genes do sistema de reparo do DNA, acumulando danos no DNA e levando à instabilidade genética da

célula, (4) e também pelas alterações nos genes controladores do ciclo celular (*checkpoints*) e genes relacionados à apoptose (Pierce, 2004; Breivik, 2005).

A instabilidade genética parece ter duas origens distintas. A primeira é aquela que acontece no nucleotídeo, como a substituição de pares de bases, deleções e inserções de poucos nucleotídeos, resultando em mudanças das funções de genes únicos. A outra é aquela na qual a instabilidade é observada no cromossomo, resultante da perda ou ganho de cromossomos inteiros ou parte deles. Ambos os efeitos da instabilidade genética ocorrem no fenótipo da célula tumoral aumentando a dosagem de genes que promovem o crescimento e/ou diminuindo a dosagem de genes reguladores negativos (Klein *et al.*, 2006).

As causas potenciais da instabilidade genética são os defeitos na maquinaria reguladora do ciclo celular (Klein *et al.*, 2006). Da mesma forma a taxa elevada do crescimento celular é uma consequência da instabilidade genética nas células cancerosas. Muitas mutações aumentam a perda do controle da proliferação e as células aceleram seu crescimento (Breivik, 2005). Distúrbios na mitose e mudanças quantitativas dos cromossomos são os aspectos típicos das neoplasias malignas e são consideradas as principais forças que dirigem os múltiplos passos da carcinogênese (Klein *et al.*, 2006). As mudanças citogenéticas são marcos do câncer, particularmente nos estágios mais avançados do desenvolvimento do tumor. Uma vasta gama de anomalias citogenéticas é vista em todos os tipos de cânceres (Nussbaum, McInnes, Willard, 2002). Aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, estão freqüentemente correlacionadas ao desenvolvimento progressivo do tumor, à agressividade tumoral e ao prognóstico ruim da doença (Borel *et al.*, 2002).

A correta duplicação do genoma, seguida da segregação dos cromossomos livres de danos para as células filhas é crucial para a saúde e longevidade de todos os organismos. Para assegurar a fidelidade desses processos, as células respondem aos danos genéticos pela parada

do ciclo celular, estabilizando as forças de replicação e induzindo o reparo do DNA (Levitt *et al.*, 2007). Para tanto, a progressão do ciclo celular está associada à ação regulatória periódica traduzida pelos chamados pontos de controle ou *checkpoints*. Este mecanismo garante proteção e integralidade estrutural a todos os componentes celulares antes que a célula passe para o estágio seguinte. Os *checkpoints* são necessários para evitar que as células com cromossomos danificados ou ausentes se proliferem e transfiram os erros genéticos para as células descendentes (Pierce, 2004). O controle preciso do ciclo celular em células de mamíferos é regulado pela atividade das cinases dependentes de ciclinas (CDK1, CDK2, CDK4, CDK6) e suas enzimas ativadoras essenciais, as ciclinas (ciclinas A, B, D, E). A atividade das cinases é dependente da abundância das ciclinas. Alterações da expressão das cinases e ciclinas podem levar à proliferação descontrolada e pode contribuir para a transformação maligna da célula (Kim, Zhao, 2005).

Defeitos nos mecanismos de checagem, isto é, danos nos *checkpoints* levam a um aumento da proliferação celular, o que leva a célula a operar abaixo do seu controle homeostático e assim passam através da mitose sem reparo adequado do DNA, resultando em elevado dano genômico (Stopper *et al.*, 2003). Células BG-1 tratadas com estradiol apresentaram aumento significativo da proliferação celular e na formação de micronúcleos (Stopper *et al.*, 2003). A estimulação hormonal elevou a porcentagem de células na fase S, diminuição do número de células na fase G₂/M e uma minoria na fase G₁/G₀ (Stopper *et al.*, 2003). Zhou e colaboradores (2000) demonstraram que a cafeína suprime os *checkpoints* na fase G₂/M em mamíferos, sensibilizando as células para danos genômicos. Células de câncer de mama após estimulação hormonal mostrou uma correlação positiva entre a taxa da proliferação celular e a formação de micronúcleos (Fischer *et al.*, 2001). Esses dados indicam que a elevação da instabilidade genética pode ser causada pelo aumento da taxa de proliferação celular e dos mecanismos

envolvidos no processo de carcinogênese, e dessa forma a estimulação do ciclo celular pode constituir um fator de risco (Stopper *et al.*, 2003).

Outro mecanismo utilizado pelas células na auto-preservação aos danos ao DNA é a apoptose que, levando a célula a morte, impede que danos permanentes ao DNA sejam transmitidos as células descendentes. Durante o processo de carcinogênese, mutações ou deleções podem afetar genes que regulam a apoptose, impedindo que este mecanismo atue na proteção celular (Pierce, 2004). Defeitos na apoptose contribuem para a progressão tumoral e expressão do fenótipo de malignidade por permitir a sobrevivência das células mutadas, levando ao acúmulo de mutações e à instabilidade genética (Ibuki, Goto, 2004).

A ação de um conjunto de proteínas com função anti-apoptótica selecionam as células malignas por conferir-lhes sobrevida, favorecendo sua exposição a agentes genotóxicos e a incorporação de alterações genéticas com reflexos no fenótipo tumoral de crescimento e agressividade (La Thangue, 2005). Muitos mecanismos celulares que monitoram os danos genéticos têm sido identificados, direcionando as células para uma morte celular programada quando esses danos tornam-se demasiadamente grandes. Superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como a bcl-2 e bcl-x, foram encontradas em linhagens celulares de leucemia e aumentaram a instabilidade genética em células de câncer de mama, enquanto que a expressão de proteínas apoptóticas como Bax, Bak e Apaf-1 se encontrava diminuída no câncer de colo e melanoma (Rampino *et al.*, 1997; Adida *et al.*, 2000; Soengas *et al.*, 2001; Cory, Adams, 2002; Mendez *et al.*, 2005).

2.2. Micronúcleo

O micronúcleo (MN) se expressa em células em divisão, como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou como consequência de cromossomos inteiros que não se prenderam ao fuso mitótico e dessa forma não chegam aos pólos das células durante a mitose ou a meiose. Na telófase, estes fragmentos ou cromossomos inteiros são encapsulados em um pequeno núcleo separado, daí o termo MN. Assim, o MN representa tanto uma alteração cromossômica estrutural, como uma alteração numérica (Salvadori, Ribeiro, Fenech, 2003).

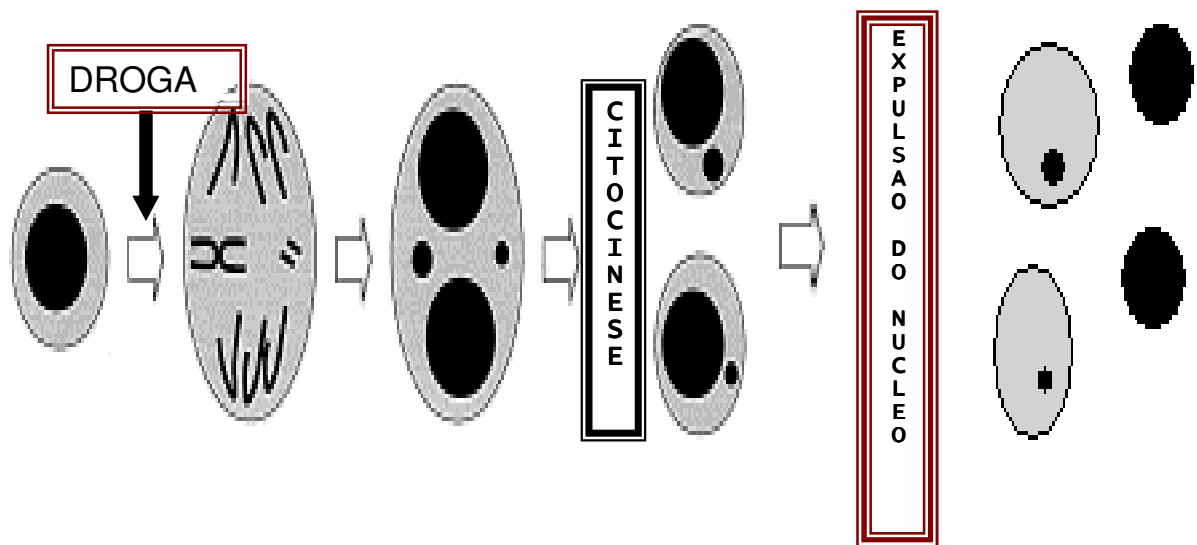


Figura 1: Formação do micronúcleo em células da linhagem eritrocitária. Agentes genotóxicos induzem a formação de quebras ou a não-disjunção dos cromossomos nas células e estes fragmentos, ou cromossomo inteiro, não se prendem ao fuso de divisão e são encapsulados em um pequeno núcleo separado. O núcleo é expulso e o MN permanece no citoplasma da célula (adaptado de Ribeiro, 2006).

Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os MN ficam retidos. Estes pequenos núcleos são analisados principalmente em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens).

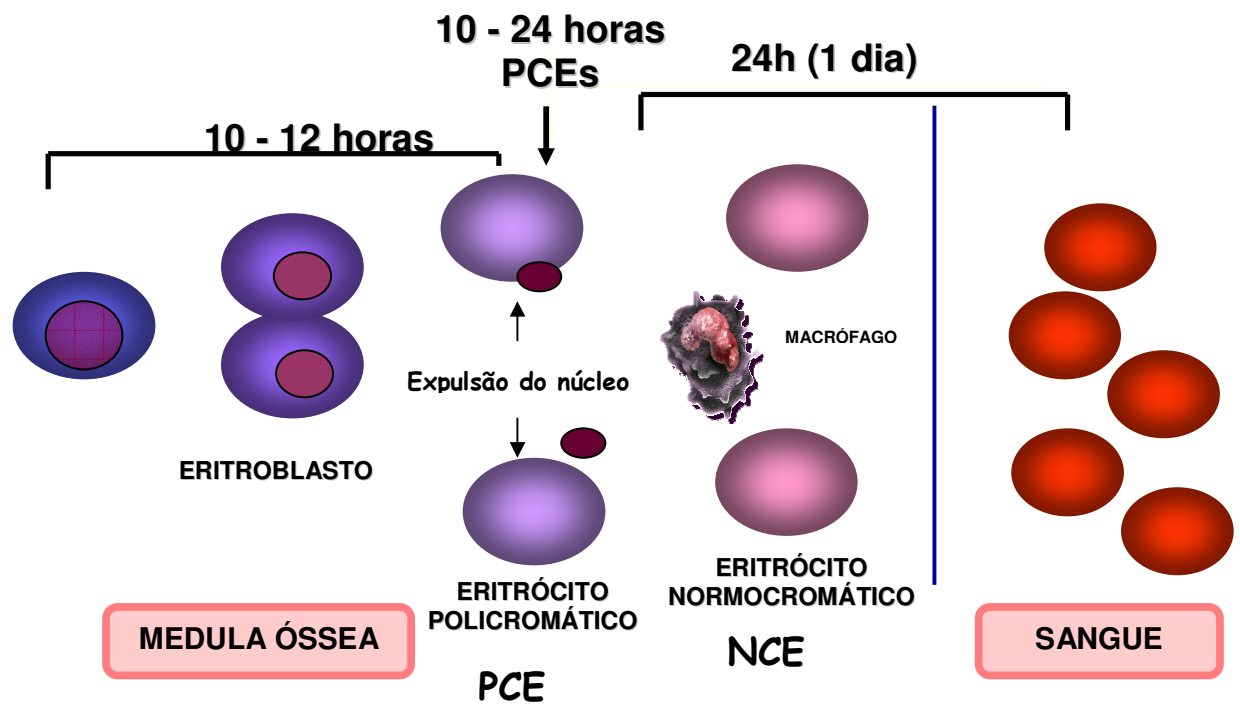


Figura 2: Formação dos Eritrócitos Policromáticos (PCE) e Normocromáticos (NCE) na medula óssea. O eritroblasto, durante seu processo de maturação, dá origem ao eritrócito policromático, eritrócito imaturo no qual o núcleo foi expulso, que sofre maturação transformando-se em eritrócito normocromático (maduro) que atinge a corrente sanguínea (adaptado de Ribeiro, 2006).

Teste do MN:

Na técnica do MN em medula óssea de roedores a avaliação do número de células micronucleadas é obtida através da contagem de 2000 PCE e 2000 NCE. Também é feita a avaliação da relação PCE/NCE num total de 500 eritrócitos (Heddle, Salamone, 1981; Titenko-Holland *et al.*, 1997). Diminuição na proporção de eritrócitos imaturos (PCE) reflete em uma diminuição na relação PCE/NCE, dessa forma essa relação é um parâmetro de citotoxicidade ou depressão celular (Shahrim *et al.*, 2006). Os MNs são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito e correspondem ao que se denomina, em hematologia, de Corpúsculos de Howell-Jolly. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos é baixa e consistente, cerca de 3 micronúcleos por 1000 células analisadas (Rabello-Gay, Rodrigues, Monteleone-Neto, 1991).

O teste do MN em medula óssea de roedores é bastante usado para a detecção de agentes clastogênicos, que quebram cromossomos, e aneugênicos, que interferem nas fibras do fuso. O teste se caracteriza pela observação do efeito do agente testado em PCE anucleados, que têm vida curta, e qualquer MN encontrado representa dano cromossômico recente. Por ser de fácil identificação e ter distribuição bem definida, os resultados obtidos com o teste *in vivo* do MN fornecem fortes evidências da genotoxicidade sistêmica do composto químico avaliado sob condições experimentais apropriadas (Salvadori, Ribeiro, Fenech, 2003).

Diversos estudos comprovaram a eficácia do teste do MN como indicador de danos citogenéticos em células cancerígenas. Aumento da frequência de MN é indicativo de elevação das taxas de mutações, o que está relacionado ao desenvolvimento de carcinomas (Carvalho *et al.*, 2002). A medida da frequência de MN em linfócitos do sangue periférico é extensivamente usada em epidemiologia molecular e em citogenética para avaliar a presença e

a extensão dos danos cromossômicos nas populações humanas expostas a agentes genotóxicos ou com um perfil genético susceptível. A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica contribuem para o sucesso mundial e adoção desse biomarcador para estudos *in vitro* e *in vivo* de danos genéticos (Bonassi *et al.*, 2007).

O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente usado para medir genotoxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O teste *in vivo* é especialmente relevante porque permite obter maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a farmacocinética e os processos de reparo do DNA. É usado primeiro para avaliar a habilidade da substância teste para induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores (Krishna, Hayashi, 2000).

Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos checkpoints do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (Bonassi *et al.*, 2007). No trabalho de Levitt *et al.* (2007), verificaram que a expressão reduzida do gene Hus1, gene essencial para o *checkpoint* do ciclo celular, resultou em aumento da instabilidade genética, evidenciado pelo aumento de Aberrações Cromossômicas em cultura de células de fibroblastos de ratos e também pelo aumento de células micronucleadas do sangue periférico nos mesmos animais. Defeitos nas funções da apoptose também contribuem para a formação de MN, como foi mostrado no trabalho de Decodier, Cundari e Krisch-Volders (2005), onde eles verificaram que a inibição da apoptose, através da inibição da atividade das caspases 8 e 9, aumentaram a frequência de células micronucleadas. Todos esses eventos estão associados com o fenótipo da instabilidade cromossômica vista no câncer.

2.3. Galectina-3

As galectinas são proteínas da família das lectinas animais que possuem em comum a afinidade de ligação por β -galactosídeos, através de domínios de reconhecimento de carboidratos (CDR), os quais são constituídos por aproximadamente 135 aminoácidos (Krzeslak; Lipinska, 2004). Uma outra característica comum a estas proteínas é a localização no citosol celular podendo ser secretadas através de uma via não-clássica, que é independente do sistema do retículo de golgi e dos retículos endoplasmáticos (mecanismo chamado de exocitose) e também podem ser transportadas para o núcleo e outros compartimentos celulares (Krzeslak; Lipinska, 2004). Essas proteínas possuem papéis em diversos eventos biológicos como na embriogênese, adesão, diferenciação e proliferação celulares, apoptose e como moduladoras da resposta imune. Também estão relacionadas com vários processos patológicos tais como doenças autoimunes, inflamações, progressão do tumor e formação de metástases, aterosclerose e complicações diabéticas (Krzeslak; Lipinska, 2004). Em mamíferos já foram relatados 15 membros da família das galectinas, as quais são subdividas de acordo com sua estrutura: galectinas que possuem apenas uma cadeia CDR (galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15); galectinas que contém dois domínios CDR ligados por uma cadeia de 70 aminoácidos (galectinas-4, -6, -8, -9 e -12) e a galectina-3, que possui uma repetição não usual de prolina e glicina ligada à sua única cadeia CDR (Chiariotti *et al.*, 2004).

As galectinas estão distribuídas numa ampla variedade de tecidos do organismo, entretanto algumas são mais específicas e sua expressão é modulada durante a diferenciação celular e o desenvolvimento do organismo e tecidos e, está alterada em diferentes condições patológicas (Liu; Rabinovich, 2005). Essas proteínas no meio extracelular se ligam a glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) da superfície da célula, ou da matriz extracelular, através de

interações lectina-carboidratos e dessa forma promovem o crescimento celular, modulam a adesão célula-célula e célula-matriz, induzem a migração celular e a sinalização celular por ligação cruzada aos glicoconjugados que contém β -galactosídeos e inibem a apoptose; no meio intracelular regulam o crescimento e sobrevivência da célula. Cada membro da família das galectinas possui funções adicionais específicas (Liu, 2005; Chiarriotti, 2004).

A presença da galectina-3 em múltiplos compartimentos celulares sugere um papel multifuncional. Possui um domínio N-terminal, o qual contém sítios para fosforização e outros determinantes importantes para sua secreção e que consiste de 100-150 resíduos de aminoácidos ricos em prolina, glicina, tirosina e glutamina. O CDR está localizado na região C-terminal da proteína e consiste de 135 resíduos de aminoácidos (Krzeslak; Lipinska, 2004). A galectina-3 está implicada em eventos biológicos distintos em vários tipos celulares e possui expressão elevada em células cancerosas e, tem mostrado estar envolvida no crescimento, adesão e diferenciação celulares e também na progressão do tumor e na formação de metástases. Evidências clínicas têm mostrado uma correlação entre a alta expressão de galectina-3 nas células tumorais e a malignidade do câncer (Nakahara; Oka; Raz, 2005).

O gene humano da galectina-3, *LGALS3*, foi mapeado no cromossomo 14 (14q21-q22) e contém seis exons e cinco introns, sendo que o sítio de iniciação da transcrição situa-se no primeiro exon e o codon de iniciação da tradução se encontra no segundo exon (Kadrofske, Openo, Wang, 1998). A estrutura do gene humano da galectina-3, que é similar ao gene do camundongo, possui uma forma genética não usual, a qual possui uma sequência promotora situada dentro do segundo intron e assim produz um outro tipo de RNAm, que não o RNAm que codifica a galectina-3. Dessa forma existe um outro gene situado dentro do gene da galectina-3, chamado de *galig*. No transcrito de *galig* existem duas fases de leitura aberta (ORFs) que codificam duas proteínas diferentes e desconexas da galectina-3, citogaligina e

mitogaligina, que ainda possuem funções desconhecidas (Raimond *et al.*, 1997; Duneau *et al.*, 2005).

O padrão de expressão da galectina-3 é altamente regulado durante os processos de inflamação, proliferação e diferenciação celulares (Sano *et al.*, 2000). Este padrão de expressão é também afetado pela transformação neoplásica das células e tem sido correlacionado ao prognóstico dos pacientes, entretanto, os resultados de diversos estudos são muito contraditórios, inclusive quando se avalia mesmo tipo histológico de tumor em diferentes localizações (Sano *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2005). Em tumores de tireóides, fígado, boca, estômago e sistema nervoso central a expressão da galectina-3 encontra-se aumentada, enquanto que em tumores de ovário, pele, útero e mama a galectina-3 encontra-se diminuída (Sanjuán *et al.*, 1997).

O papel da galectina-3 na transformação neoplásica e o seu potencial como marcador de diagnóstico e prognóstico tem sido claramente demonstrado em tumores de tireóide. A expressão dessa lectina em tumores malignos e benignos de tireóide sugeriu seu envolvimento na transformação maligna e sua utilização como marcador para discriminar lesões benignas de malignas da tireóide (Coli *et al.*, 2002). Na cérvix uterina a expressão de RNAm e de galectina-3 estavam significativamente diminuídas nas amostras de neoplasia cervical invasiva, sugerindo que a redução da expressão dessa lectina nos tumores pode indicar possível transformação neoplásica (Lee *et al.*, 2006).

Dependendo de sua localização celular, a galectina-3 possui funções biológicas pleiotrópicas. A galectina-3 extracelular media a migração, adesão e interações celulares, enquanto que a galectina-3 intracelular inibe a apoptose e está superexpressada durante a progressão do tumor e formação de metástases em diversas malignidades humanas, incluindo cânceres de tireóide, cólon fígado e cérebro. Também é encontrada no núcleo, como uma

proteína da matriz nuclear e está envolvida no splicing do pré-RNA e pode regular a expressão de vários genes através da ativação de fatores específicos de transcrição (Yang, Hsu, Liu, 1996; Bresalier, Mazurek, Sternberg, 1998; Matarrese *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002; Ochieng, 2004; Patterson, Wang, Wang, 2004; Takenaka, Fukumori, Raz, 2004).

Mazurek *et al.* (2005) reportaram que a fosforilação da galectina-3 está associada com alterações na expressão de diversos genes e é um pré-requisito para a transformação maligna de células de mama epiteliais. Nesse estudo, através de análises de microarray, foi demonstrado que a galectina-3 fosforilada está relacionada com a alteração da expressão de uma variedade de genes de diversas categorias funcionais. Muitos dos genes identificados neste estudo têm sido associados com a transformação e proliferação celulares, como exemplo a alteração da expressão de genes relacionados com o ciclo celular e com os *checkpoints* (superexpressão de ciclinas D1 e B e retinoblastoma 1) e também de genes envolvidos com a regulação do processo de apoptose (diminuição da expressão de genes da família das catepsinas). Ciclina D1 regula a progressão do ciclo celular e está fortemente implicada na carcinogênese de mama (Hinds *et al.*, 1994). As catepsinas são da família das cisteínas proteases que são os principais componentes do sistema proteolítico do lisossomo, que foram recentemente identificadas como ativadoras da apoptose (através de um caminho não-caspase) (Cirman, Oresic, Mazovec, 2004).

Diversos estudos mostraram o papel da galectina-3 na regulação do ciclo celular. Células T Jurkat transfectadas com galectina-3 exibiram aumento do crescimento comparado com os transfectantes controles (Yang, Hsu, Liu, 1996). Células de linhagem de câncer de mama que expressam galectina-3 mostraram acúmulo significativo na fase G₂-M e aumento da proliferação do ciclo celular comparado com as células controles. Em muitos casos a regulação do crescimento celular não está conhecida. O possível papel da galectina-3 na

estimulação do ciclo celular e carcinogenicidade é através da alteração da expressão de vários genes, principalmente aqueles envolvidos nos *checkpoints* do ciclo celular, como a superexpressão de ciclina D1, ciclina B1 e retinoblastoma 1 (Mazurek *et al.*, 2005).

Os membros da família das galectinas são os novos reguladores da apoptose e apenas a galectina-3 contém o mesmo motivo de 4 aminoácidos conservado no domínio BH1 do gene bcl-2, o motivo NWGR, o qual é crítico para a atividade anti-apoptótica do bcl-2. Dessa forma a galectina-3 pode interagir com moléculas que regulam a apoptose através do motivo NWGR e substituir a atividade anti-apoptótica do bcl-2 (Kim *et al.*, 1999). A galectina-3 pode também proteger as células contra o processo de apoptose induzido por diversos agentes através de ações moleculares, que ainda permanecem obscuros, na membrana mitocondrial. Ela protege a integridade mitocondrial e regula a cascata de caspases, dessa forma inibe a liberação de citocromo c da mitocôndria e conseqüentemente inibe o processo de apoptose (Yu *et al.*, 2002).

Pouco é conhecido sobre o papel da galectina-3 no desenvolvimento das células mielóides na medula óssea (Marer, 2000). A super-expressão dessa proteína nas células humanas de leucemia levou à resistência da apoptose, indicando seu papel na inibição da morte celular (Akahani *et al.*, 1997). Foi demonstrado que a galectina-3 diminui a regulação de GM-CSF dirigindo a proliferação das células na medula óssea (Krugluger *et al.*, 1997). Marer em 2000 demonstrou que a galectina-3 está presente e altamente regulada nas células humanas mielóides em maturação da medula óssea e também que essa proteína provavelmente pode ser outro componente que contribui para os mecanismos de liberação das células mielóides para o sangue periférico. Durante a diferenciação *in vitro* de células HL-60, modelo de célula precursora da linhagem mielóide, em monócitos a expressão de RNAm da galectina-3

apresentou-se elevada, sugerindo que mudanças no padrão de expressão dessa proteína é potencialmente importante para a diferenciação das células mielóides (Abedin *et al.*, 2003).

Outra função importante da galectina-3 é sua atuação no processo de fagocitose realizado pelos macrófagos, os quais possuem papel relevante nas imunidades inata e adaptativa contribuindo para uma variedade de processos fisiológicos e patológicos através da eliminação das células apoptóticas. Foi demonstrado que a fagocitose de eritrócitos opsonizados foi retardada pelos macrófagos *gal3^{-/-}* comparado com as células *wild-type*. Como a galectina-3 contribui para a fagocitose permanece ser elucidado. Evidências mostraram que a galectina-3 extracelular, que se liga à superfície de diversas células, incluindo eritrócitos, é um potente quimioatrativo para os macrófagos, contribuindo para o recrutamento e ativação dessas células através de mecanismos parácrinos. Enquanto que a galectina-3 intracelular contribui para a fagocitose através do seu importante papel na homeostasia e funções dos macrófagos (Sano *et al.*, 2003).

2.4. Carcinogênese experimental e 4-Nitroquinolina-1-óxido (4NQO)

A 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) é um carcinógeno sintético solúvel em água, derivado da quinolina que possui uma complexa estrutura em anel (figura 1) (Kanojia, Vaidya., 2006; Nakajima *et al.*, 1999).

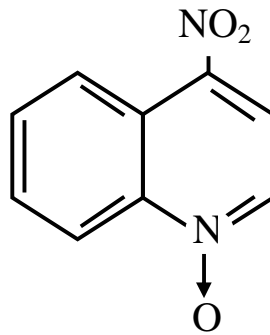


Figura 3: Fórmula estrutural da 4-Nitroquinolina-1-Oxido

A carcinogenicidade da 4NQO foi primeiramente reportada por Nakahara, Fukuoka e Sugimura em 1957 e sua mutagenicidade foi relatada, em 1962, por Okabayashi. Diversos experimentos em roedores foram feitos evidenciando a indução de vários tipos de cânceres pela 4NQO, tais como câncer de estômago, múltiplas lesões papilomatosas, adenocarcinomas, tumores pancreáticos e renais, hepatomas, sarcomas e câncer de pulmão (Baba, Misu, Takayama, 1962; Mori *et al.*, 1969; Sato, Saito, Enomoto, 1970; Hayashi, Hasegawa, 1971). A ação carcinogênica da 4NQO é iniciada pela redução enzimática intracelular de seu grupo nitro, sendo reduzida a 4-hidroxi-aminoquinolina-1-óxido (4HAQO), metabólito carcinogênico (Benson, 1993). A 4-nitroquinolina é um potente indutor de estresse oxidativo intracelular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) como os radicais superóxidos ou peróxidos de oxigênio (Hozumi, 1969).

A 4NQO é muito usada em numerosos estudos como modelo carcinogênico em roedores pela indução de câncer bucal, incluindo o dorso e ventre da língua, palato e esôfago. Os danos causados pela 4NQO nas células da cavidade oral são similares aos danos impostos por outros agentes carcinogênicos presentes no tabaco, o qual é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer bucal. Induz a formação de uma seqüência de estágios da carcinogênese como a hiperplasia, displasia, displasia severa, carcinoma *in situ* e carcinoma de

células escamosas orais, que são alterações histológicas similares às da carcinogênese bucal humana (Kanojia; Vaydia, 2006). Dessa forma o modelo animal de carcinogênese induzida pela 4-NQO, usando a via de administração oral ou por aplicação tópica, produz um espectro de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, sendo considerado como o modelo preferencial para o estudo de carcinoma de células escamosas orais (Vered; Yaron; Dayan, 2005).

De um modo geral os carcinógenos químicos são agentes mutagênicos, assim como as substâncias mutagênicas são também carcinogênicas, e a 4NQO é um exemplo de uma substância com ambas as ações. Em muitos estudos tem sido usada como uma substância para controle positivo em experimentos de mutagenicidade e de carcinogenicidade. As ações mutagênicas da 4NQO incluem diversos danos no DNA tais como mutações de mudança de pares de base, deleções, conversões de genes mitóticos, quebras cromossômicas e trocas cromatídicas (Nagao, Sugimura, 1976). Matsushima, Kobuna e Sugimura em 1967 verificaram que a 4NQO e seus metabólitos se ligam covalentemente à molécula de DNA formando adutos em várias posições. Experimentos *in vivo* sugeriram que a 4NQO reage preferencialmente com os resíduos de guanina (Stephan; Winkle; Tinoco, 1978).

Diversos estudos foram feitos evidenciando a ação mutagênica da 4-NQO. Nakajima e colaboradores (1999) demonstraram que a 4NQO administrada em camundongos por via intraperitoneal ou por via oral produziu danos genéticos a nível molecular em diversos tecidos, pela formação de bases covalentes ligadas ao DNA e a nível celular induziu o aumento da formação de micronúcleos nas células do sangue periférico. Camundongos da linhagem ICR receberam 4NQO por via peritoneal, o qual induziu a formação de ligações covalentes no DNA no fígado, pulmão, trato gastrointestinal, pâncreas, rins e medula óssea e também induziu a formação de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos da medula óssea (Lu *et al.*, 1990). Em camundongos da linhagem C57BL/6 após a administração peritoneal do

carcinógeno 4NQO a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea apresentou-se significativamente elevada (Sato, Takizawa, Inui, 1990).

3. *HIPÓTESE*

3. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a galectina-3 possa estar envolvida com o aumento da instabilidade genética nas células após exposição ao carcinógeno 4NQO. Desta forma, acreditamos que os animais selvagens apresentarão um número significativamente maior de micronúcleos comparado aos camundongos *knockout* para o gene da galectina-3.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

O objetivo desta investigação é identificar e avaliar o efeito genotóxico do carcinógeno 4NQO em células da medula óssea de camundongos C57BL/6 por meio da técnica de detecção de micronúcleos (MN), bem como identificar a possível diferença neste efeito pela ausência constitutiva do gene da galectina-3.

Os objetivos específicos são:

1. Identificar e avaliar a frequência de MN em células de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens tratados cronicamente por via oral com o carcinógeno 4NQO, comparativamente aos animais controles.
2. Identificar e avaliar a frequência de MN em células de medula óssea de camundongos C57BL/6 *knockouts* para o gene da galectina-3 tratados cronicamente por via oral com o carcinógeno 4NQO, comparativamente aos animais controles.
3. Comparar a frequência de MN entre os camundongos *knockouts* para o gene da galectina-3 e selvagens da linhagem C57BL/6 submetidos aos tratamentos mencionados nos itens 2 e 3.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais:

Os animais foram mantidos durante todo o experimento no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Este experimento seguiu todas as normas de manejo e experimentação animal preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram formados dois grandes grupos constituídos por camundongos da linhagem C57BL/6, assim distribuídos:

- **Grupo KO** (*knockout* para o gene da galectina-3) composto por 47 camundongos *knockout* para o gene da galectina-3 (linhagem C57BL/6-Sv-129 cedidos gentilmente pelo Prof. Fu-Tong Liu do Departamento de Dermatologia da Universidade da Califórnia - USA);
- **Grupo WT** (*wild-type*, selvagens para o gene da galectina-3) composto por 51 camundongos selvagens da linhagem C57BL/6.

Em cada um dos grupos constituídos os animais eram machos, com quatro semanas de idade, pesando entre 21-24g, mantidos em ambiente a temperatura constante de 22°C e ciclo claro-escuro de 12h/12h. Todos os animais incluídos no estudo receberam água e ração (Nutrilab, Mercavet, Belo Horizonte, MG, Brasil) *ad libitum*.

Posteriormente, os camundongos de cada um dos grupos especificados acima foram divididos aleatoriamente em seis subgrupos identificados de acordo com o tempo de tratamento e observação pré-determinados para o experimento. Foi definido como tempo de tratamento o tempo em que o animal foi exposto a ingestão de solução carcinogênica de 4NQO; como tempo de observação foi considerado aquele transcorrido entre o início do tratamento e a eutanásia. Desta forma, identificamos como tempo de observação de 16 semanas aquele correspondente ao término do tratamento; como tempo de observação de 32 semanas consideramos aquele correspondente a 16 semanas após o término do tratamento. Baseado nisto, os grupos foram assim constituídos e designados:

- WT_{16}/KO_{16} : respectivamente grupos de camundongos *wild-type* (WT) e *knockouts* (KO) tratados com solução de 4NQO por via oral durante 16 semanas, eutanasiados imediatamente após o término do tratamento;
- $CP-WT_{16}/CP-KO_{16}$: respectivamente grupos de camundongos *wild-type* (WT) e *knockouts* (KO) tratados com propilenoglicol durante 16 semanas, eutanasiados imediatamente após o término do tratamento;
- $H_2O-WT_{16}/H_2O-KO_{16}$: respectivamente grupos de camundongos *wild-type* (WT) e *knockouts* (KO) controles que receberam apenas água durante 16 semanas, eutanasiados imediatamente após o término do tratamento;
- WT_{32}/KO_{32} : respectivamente grupos de camundongos *wild-type* (WT) e *knockouts* (KO) tratados com solução de 4NQO por via oral durante 16 semanas, eutanasiados 16 semanas após o término do tratamento;

- *CP-WT₃₂/CP-KO₃₂*: respectivamente grupos de camundongos *wild-type* (WT) e *knockouts* (KO) tratados com propilenoglicol durante 16 semanas, eutanasiados 16 semanas após o término do tratamento;
- *H₂O-WT₃₂/ H₂O-KO₃₂*: respectivamente grupos de camundongos *wild-type*(WT) e *knockouts* (KO) controles que receberam apenas água durante 32 semanas;

Após o término do tratamento de cada subgrupo, obedecendo à cronologia de observação do experimento estabelecida previamente, os animais sofreram eutanásia em câmara rígida hermeticamente fechada saturada com vapor de éter. Em seguida as línguas dos animais foram retiradas e utilizadas para análises microscópicas e as medulas ósseas foram coletadas dos fêmures e utilizadas para a técnica do MN.

5.2. Preparação e aplicação do carcinógeno:

Inicialmente, o carcinógeno 4NQO foi diluído em propilenoglicol na concentração de 5mg/ml e, em seguida, em água filtrada até atingir a concentração final de 100µg/ml. Ambas as soluções foram preparadas semanalmente. Esta solução final (água-propilenoglicol-4NQO), por sua vez, foi ofertada aos camundongos *ad libitum* durante todo o período de tratamento ($T_{máx}$ =16 semanas). Após esse período (tempo de observação), os animais receberam apenas água filtrada *ad libitum* até o tempo da eutanásia.

5.3 Carcinogênese lingual: Análise microscópica das alterações epiteliais

A análise microscópica dos tecidos linguais foi considerada parâmetro para identificarmos a validade do modelo empregado de agressão pelo 4NQO e para a definição dos momentos utilizados para a análise dos micronúcleos, a saber: 16 e 32 semanas. Na 16ª semana, período representativo do término do tratamento espera-se que as alterações epiteliais flagradas sejam não neoplásicas, traduzindo agressões ao DNA que não seriam suficientes para a expressão do câncer; na 32ª semana, teríamos o momento de maior expressão genotípica e fenotípica desta agressão, com o aparecimento de câncer. Para a identificação destas alterações, os seguintes procedimentos foram desenvolvidos: imediatamente após a eutanásia dos animais retirou-se a língua de cada camundongo. Todas as amostras foram colocadas em frascos contendo formol a 4% e fixados por, no mínimo, 24 horas.

Todos os fragmentos de língua foram submetidos ao processamento rotineiro para exame histopatológico, obedecendo ao protocolo sucintamente descrito a seguir: desidratação, diafanização, inclusão em parafina e recorte de secções histológicas de 4 µm de espessura, após o qual, foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina (HE). As observações histológicas foram realizadas seguindo os critérios discriminados abaixo:

1. Hiperplasia epitelial: aumento da população celular acompanhado de aumento da espessura do tecido epitelial lingual, sem evidência da presença de alterações celulares indicativas de distúrbios da diferenciação.
2. Displasia epitelial e carcinoma *in situ*: presença de distúrbios do crescimento e da diferenciação celular em tecido epitelial lingual, a saber: hiperplasia de células basais, perda da estratificação normal, pleomorfismo celular, anisocitose e anisonucleose,

hipercromatismo nuclear, perda da polarização e de adesão de queratinócitos (acantólise), mitoses acima da camada basal, queratinização individual de células, cones epiteliais “em gota”, queratinização de superfície (paraqueratinizado, hiperqueratose, verrucosa e papilar).

3. Carcinomas Epidermóides (CE): presença de distúrbios do crescimento e da diferenciação celular em tecido epitelial lingual acompanhada de invasão no tecido conjuntivo subjacente.

Para o reconhecimento das displasias, foram utilizados os critérios estabelecidos por Lumerman *et al* (1995), com modificação. Todas as alterações histológicas definidas no item dois acima foram registradas e anotadas segundo sua localização na espessura do epitélio: terço basal, médio e superficial. Para que a displasia fosse identificada, foi necessária à observação de, no mínimo, três das alterações descritas, a saber: hiperplasia de camada basal, hipercromatismo e aumento do tamanho nuclear, e projeção epitelial “em gota”. Para classificar as alterações epiteliais como Carcinoma *in situ*, considerou-se a presença dessas mesmas alterações envolvendo toda a espessura do tecido epitelial.

Os carcinomas epidermóides (CEs) foram classificados segundo critérios estabelecidos pela OMS 2005 (Barnes *et al.*, 2005), os quais se fundamentam no grau de diferenciação escamosa freqüentemente identificadas como graus variáveis de formação de pérolas de queratina e, por fim, crescimento invasivo (Tabela 1).

Tabela 1 :Classificação histológica dos CE baseada em critérios de diferenciação tecidual neoplásica recomendados pela Organização Mundial da Saúde, 2005.

Classificação Histológica dos Carcinomas Epidermóides	Descrição
Bem Diferenciado	Neoplasia que apresenta características semelhantes ao tecido epitelial normal, mínima atividade mitótica e grande queratinização.
Moderadamente Diferenciado	Neoplasia que apresenta pleomorfismo nuclear e atividade mitótica e, normalmente, pouca queratinização.
Pobrememente Diferenciado	Neoplasia com predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e reduzida queratinização.

Por fim, para cada grupo de animais, foram registrados os seguintes itens para análise:

1: presença ou não de displasia e Carcinoma *in situ*; 2: presença ou não de CEs e sua gradação histológica. Para análise foram considerados os maiores graus das displasias e a diferenciação predominante dos carcinomas produzidos para cada língua avaliada.

5.4. Teste do micronúcleo em células da medula óssea de roedores:

A técnica utilizada para o estudo de MN em células de medula óssea foi descrita por Schmid (1975), com modificações, descrita a seguir:

Coleta:

- a) Após o tratamento, os animais foram eutanasiados por eterização e as epífises distais dos fêmures foram cortadas;
- b) A medula óssea foi retirada dos fêmures, com o auxílio de uma seringa de vidro contendo 1 ml de soro bovino fetal (temperatura ambiente), e o material foi colocado dentro de um tubo de centrifuga contendo mais 1 ml do soro;
- c) O material foi homogeneizado com o auxílio de pipeta Pasteur;
- d) As células foram centrifugadas por 10 minutos a 900 rpm e uma parte do sobrenadante (aproximadamente 1,7 ml) foi descartada;
- e) O sedimento foi ressuspenso no restante do sobrenadante (em torno de 0,3 ml).

Preparo das lâminas:

- a) Uma gota de suspensão da medula óssea foi colocada em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca fazendo-se um esfregaço com o auxílio de uma lamínula de vidro e a seguir as lâminas foram secas ao ar;
- b) Após 24 horas as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos e secas ao ar;
- c) Após 24 horas da fixação, as lâminas foram coradas com Giemsa* diluído em tampão Sorensen* (Na_2HPO_4 0,06M e KH_2PO_4 0,06M – pH 6,8), na proporção de 1 ml do corante para 20 ml da solução tampão, por 10 minutos;
- d) As lâminas foram lavadas em água destilada, secas ao ar e em seguida acondicionadas na geladeira (4°C) até a análise.

* O preparo das soluções está descrito no Anexo 1.

Análise citológica das lâminas

Para cada animal foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) e 2000 eritrócitos normocromáticos (NCEs) e o resultado foi expresso em total de células contendo micronúcleo. A relação PCE/NCE foi obtida contando-se 500 eritrócitos. As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio de luz visível, em objetiva de imersão de 125X e ocular de 10X, aumento final de 1250X.

A contagem dos MN foi feita seguindo os critérios descritos por Heddle; Salamone (1981) e Titenko-Holland *et al.* (1997), a saber:

- a) Foram consideradas para contagem apenas células íntegras apresentando forma arredondada com citoplasma intacto;
- b) as estruturas intracitoplasmáticas identificáveis como micronúcleos devem apresentar forma arredondada, estarem no mesmo plano do citoplasma, não apresentar refringência e, possuírem tamanho de 1/20 a 1/5 do tamanho do núcleo do leucócito.

5.5 Análise estatística:

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad InStat3 (Versão 3.0, GraphPad Software, Inc, Califórnia-Estados Unidos). Os dados foram previamente testados para verificar se possuem distribuição normal, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste do Qui-Quadrado foi utilizado para identificar diferenças entre proporções de carcinomas epidermóides desenvolvidos nos grupos WT e KO nos dois períodos de observação do experimento. Para a análise dos dados referentes aos micronúcleos, utilizamos o teste

paramétrico "t" de Student, para a comparação entre dois grupos, em função da normalidade dos dados. Nos casos onde a distribuição foi não normal utilizamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para a comparação entre dois grupos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de rejeição de nulidade foi menor que 0,05 ($P < 0,05$).

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Carcinogênese lingual: achados microscópicos no epitélio

O processo de carcinogênese ocorreu nos dois grupos estudados. Além disso, foi possível identificar múltiplas áreas no tecido epitelial lingual com alterações displásicas nos dois períodos de observação em ambos os grupos testados, indicando que o processo de carcinogênese foi multifocal.

Ao final do experimento, 100% dos camundongos dos grupos WT e KO de 16 e 32 semanas de observação apresentaram alterações no tecido epitelial lingual que puderam ser reconhecidas como displasia, carcinoma *in situ* ou carcinoma epidermóide (CE). Na maior parte dos casos, pode-se observar a presença de mais de um foco de alteração epitelial. Estes dados não foram registrados já que não era objetivo do presente trabalho. Para caracterização do diagnóstico do caso (animal), considerou-se o achado que traduzisse o estágio mais avançado da carcinogênese.

Para os grupos WT e KO observados no período de 16 semanas, o estágio mais avançado da carcinogênese foi representado pela presença de displasia, sendo que o grupo WT apresentou um número discretamente maior comparativamente aquele observado no grupo KO (18 lesões vs 16 lesões). A porcentagem total de camundongos que desenvolveram displasia em relação ao total de animais estudados em cada grupo foi maior no Grupo WT do que no Grupo KO (63,33% vs 51,61%, respectivamente). Carcinoma *in situ* foi encontrado em ambos os Grupos, sendo 1 animal no Grupo KO de 16 semanas e 1 animal em cada um dos Grupos KO e WT de 32 semanas (Tabela 2).

Em relação aos CEs, evidenciou-se que o número total desses tumores foi igual em ambos os grupos estudados (nove lesões cada) com a maioria dos casos ocorrendo nos Grupos WT e KO de 32 semanas (Figura 4). Contudo, a porcentagem total de animais que desenvolveram CEs em relação ao total de animais estudados em cada grupo foi discretamente maior nos animais do Grupo WT do que naqueles do Grupo KO (30,00% vs 29,03%, respectivamente) (Tabela 2). Além disso, a frequência de CEs considerando o mesmo período de 32 semanas de observação foi maior no Grupo WT (81,81%; 9 animais) do que no Grupo KO (70,00%; 7 animais), embora esta diferença não fosse estatisticamente significativa (Teste do *Qui Quadrado*, $P > 0,05$) (Tabela 2). Neste caso, todos os casos de CEs foram classificados histologicamente como bem diferenciado.

Vale ressaltar ainda que no Grupo KO de 32 semanas foram observados dois casos de papiloma de células escamosas (neoplasia epitelial benigna), enquanto que no Grupo WT de mesma semana de observação essa lesão foi não observada. Por outro lado, os papilomas de células escamosas foram observados em dois camundongos do Grupo KO de 16 semanas e em apenas um animal do Grupo WT de mesma semana (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos tipos de lesões encontradas nos animais selvagens (WT) e *knockout* (KO) de 16 e 32 semanas após tratamento com 4NQO

Tipos de lesões	Grupo WT			Grupo KO		
	Subgrupos		Total (%)	Subgrupos		Total (%)
	WT16 (%)	WT32 (%)		KO16 (%)	KO32 (%)	
n° de animais	19	11	30	21	10	31
Displasia	18 (94,73%)	1 (9,09%)	19 (63,33%)	16 (76,19%)	0 (0,00%)	16 (51,61%)
Carcinoma <i>in situ</i>	0 (0,00%)	1 (9,09%)	1 (3,33%)	1 (4,76%)	1 (10,00%)	2 (6,45%)
Carcinoma epidermóide	0 (0,00%)	9 (81,81%)	9 (30,00%)	2 (9,52%)	7 (70,00%)	9 (29,03%)
Papiloma	1 (5,26%)	0 (0,00%)	1 (3,33%)	2 (9,52%)	2 (20,00%)	4 (12,90%)

WT: animais selvagens

KO: animais *knockout* para o gene da galectina-3

WT16/KO16: grupos de animais WT e KO, respectivamente, com 16 semanas de observação; WT32/KO32: grupos de animais WT e KO, respectivamente, com 32 semanas de observação.

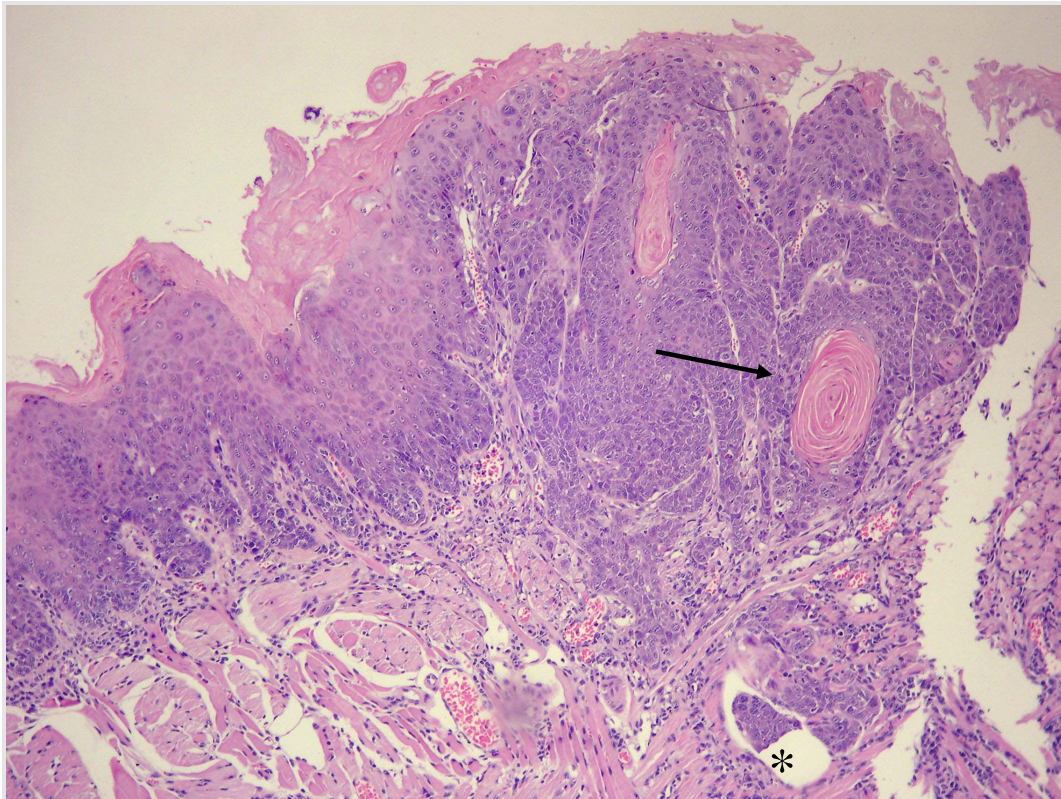


Figura 4: Aspecto microscópico do carcinoma epidermóide bem diferenciado observado na língua dos animais WT e KO no período de 32 semanas. Observar a presença de invasão (*) e de pérolas córneas (*seta*) no tecido neoplásico. (100X, HE).

6.2 Frequência de eritrócitos micronucleados da medula óssea

Para a avaliação da frequência de células micronucleadas foram considerados apenas eritrócitos íntegros com forma arredondada e citoplasma intacto. Foram considerados como MNs as estruturas intracitoplasmáticas com forma arredondada que se apresentaram no mesmo plano da célula, sem refringência e com tamanho de 1/20 a 1/5 do tamanho do núcleo do leucócito (Figura 5). A identificação entre PCE e NCE se baseia na diferença da coloração de cada um, sendo que os PCEs são células com coloração roxa e os NCE com coloração rosa (Figura 6). Essa diferença nas colorações dos eritrócitos é devido à quantidade de RNAs presentes em seu citoplasma.

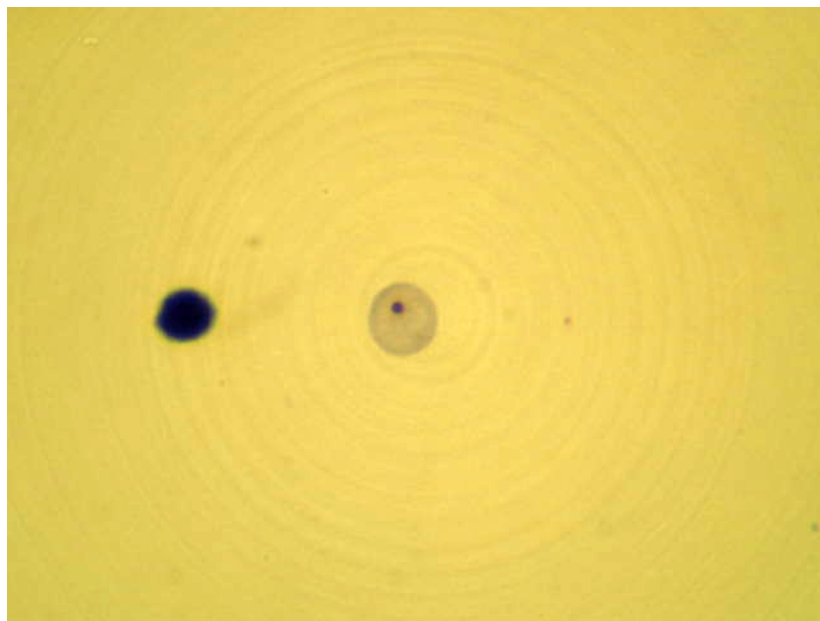


Figura 5: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado da medula óssea de camundongos *knockout* para o gene da galectina-3 (objetiva de 125X, aumento final de 1250X).

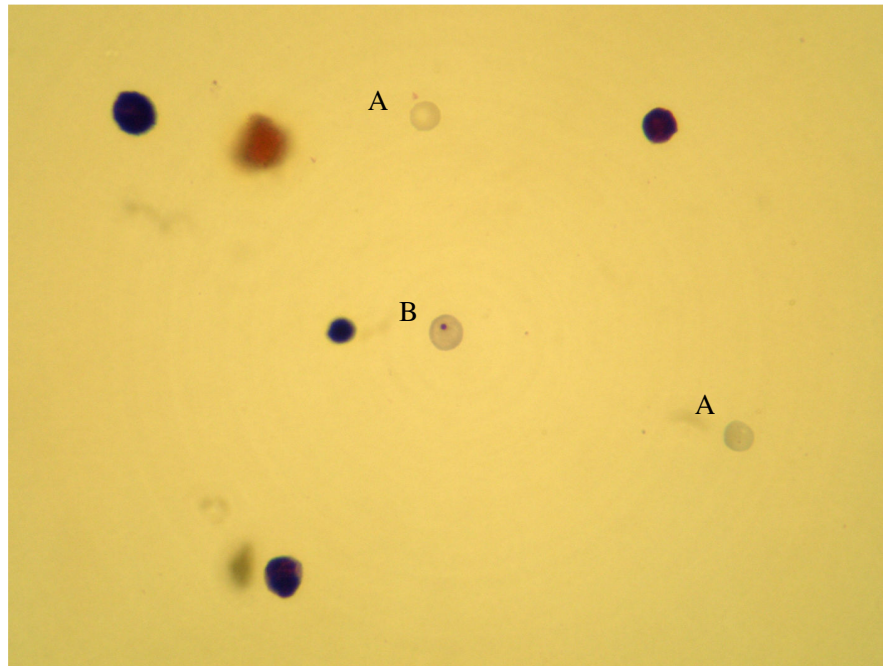


Figura 6: Fotomicrografia de eritrócitos normocromáticos (A) e policromático (B) - contendo 1 micronúcleo- da medula óssea de camundongos C57Bl/6 selvagens (objetiva de 100X)

Como mostrado na Tabela 3 e na Figura 7, tanto os animais WT quanto os KO para o gene da galectina-3 apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) do número de PCE e NCE micronucleados da medula óssea após a aplicação do carcinógeno 4-nitroquinolina. Os animais WT do grupo controle com água apresentaram uma média de $8,88 \pm 2,26$ PCE micronucleados, a qual elevou para $19,89 \pm 5,19$ após o tratamento com a 4NQO (Tabela 3 e Figura 7). Nos animais KO a média do número de PCE micronucleado aumentou de $7,33 \pm 2,42$, no grupo controle com água, para $14,96 \pm 4,31$ no grupo tratado com a 4NQO (Tabela 3 e Figura 7). Em todos os grupos, exceto no grupo controle com água composto por animais KO, o número e a frequência de NCE com micronúcleo foi estatisticamente inferior comparado com a frequência de PCE micronucleado (Tabela 3 e Figura 7).

No grupo composto por animais WT tratados com a 4NQO foi encontrado maior quantidade de PCEs micronucleados ($19,89 \pm 5,19$) comparado com o mesmo grupo constituído por animais KO ($14,96 \pm 4,31$), essa diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 7). O tratamento com o carcinógeno não alterou de forma significativa o valor da relação PCE/NCE no grupo de animais WT, mas a mesma mostrou-se significativamente inferior nos animais KO após tratamento com a 4NQO (Tabela 3). Nos animais KO do grupo controle com água a relação PCE/NCE ($1,01 \pm 0,33$) mostrou-se maior comparado aos animais WT ($0,72 \pm 0,18$) (Tabela 3).

Tabela 3: Média \pm desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE), eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) e da relação PCE/NCE em células da medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene da galectina-3

Grupos	n	Número de células micronucleadas		
		MN PCE	MN NCE	PCE/NCE
WT				
4NQO	29	$19,89 \pm 5,19^a$	$9,65 \pm 3,43^*$	$0,83 \pm 0,21$
Controle H ₂ O	9	$8,88 \pm 2,26^b$	$4,55 \pm 1,13^{*,b}$	$0,72 \pm 0,18$
Controle propilenoglicol	13	$6,07 \pm 2,32^{b,a}$	$2,84 \pm 1,46^{*,b}$	$0,95 \pm 0,29$
KO				
4NQO	31	$14,96 \pm 4,31$	$9,61 \pm 3,80^*$	$0,79 \pm 0,20$
Controle H ₂ O	6	$7,33 \pm 2,42^b$	$5,16 \pm 1,83^b$	$1,01 \pm 0,33^b$
Controle propilenoglicol	10	$9,30 \pm 2,71^b$	$5,00 \pm 1,82^{*,b}$	$0,77 \pm 0,22$

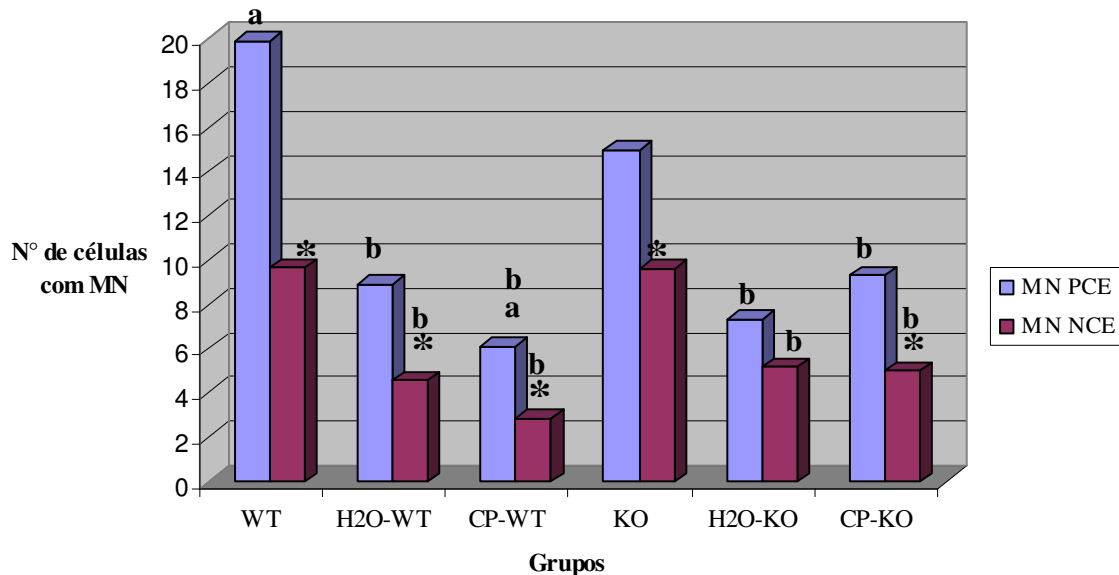
Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) e 2000 eritrócitos normocromáticos (NCE) para cada animal;

* estatisticamente significativa ($P < 0,05$) o número de NCE micronucleado comparado com o número de PCE micronucleado;

^aestatisticamente significativa quando comparado com os animais KO;

^bestatisticamente significativa quando comparado os grupos controles com os grupos tratados com 4NQO;

Figura 7: Média do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) da medula óssea de camundongos selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4-nitroquinolina (4 NQO)



WT: grupo de animais WT tratado com 4NQO; KO: grupo de animais KO tratado com 4NQO; H₂O-WT/ H₂O-KO: grupos controles com água de animais WT e KO, respectivamente, CP-WT/CP-KO: grupos controles de animais WT e KO, respectivamente, tratados com propilenoglicol.

* estatisticamente significante ($P < 0,05$) o número de NCE micronucleado comparado com o número de PCE micronucleado ; ^aestatisticamente significante quando comparado com o respectivo grupo dos animais KO; ^bestatisticamente significante quando comparado os grupos controles com os grupos tratados com 4NQO.

Em relação aos diferentes tempos de observação (16 e 32 semanas), encontramos no subgrupo WT16 uma média do número de PCE micronucleado ($21,68 \pm 4,95$) significativamente ($P < 0,05$) superior comparado ao subgrupo KO16 ($13,85 \pm 3,29$). Após 32 semanas de observação a média do número de PCE micronucleado mostrou-se reduzida no subgrupo WT32 ($16,50 \pm 3,89$) comparado com o subgrupo WT16 ($21,68 \pm 4,95$). Entretanto, foi encontrado um padrão inverso nos subgrupos dos animais KO, de tal forma que no subgrupo KO32 a média do número de PCE micronucleados ($17,30 \pm 5,39$) foi

significativamente maior que no subgrupo KO16 ($13,85 \pm 3,29$). A média de NCE micronucleado apresentou-se significativamente menor, em todos os subgrupos, comparada com a média de PCE micronucleado (Tabela 4 e Figura 8).

Foi encontrada uma redução significativa ($P < 0,05$) da relação PCE/NCE no subgrupo WT32 ($0,68 \pm 0,20$) comparado com o subgrupo WT16 ($0,91 \pm 0,17$). Enquanto que no subgrupo KO32 não houve diferença significativa dessa mesma relação quando comparado com o subgrupo KO16 (Tabela 4). Nos subgrupos controles com água a média de PCE micronucleado foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) nos subgrupos com 32 semanas de observação, tanto nos animais KO quanto nos WT, comparado com os subgrupos com 16 semanas de observação (Figura 9).

Tabela 4: Média \pm desvio padrão do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE), eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) e da relação PCE/NCE em células da medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene da galectina-3 agrupados de acordo com o tempo de observação

Grupos	n	Número de células micronucleadas		PCE/NCE
		MN PCE	MN NCE	
WT				
WT16	19	$21,68 \pm 4,95^a$	$10,05 \pm 3,65^*$	$0,91 \pm 0,17$
WT32	10	$16,50 \pm 3,89^b$	$8,90 \pm 2,99^*$	$0,68 \pm 0,20^b$
KO				
KO16	21	$13,85 \pm 3,29$	$9,23 \pm 3,99^*$	$0,83 \pm 0,20$
KO32	10	$17,30 \pm 5,39^b$	$10,40 \pm 3,40^*$	$0,71 \pm 0,18$

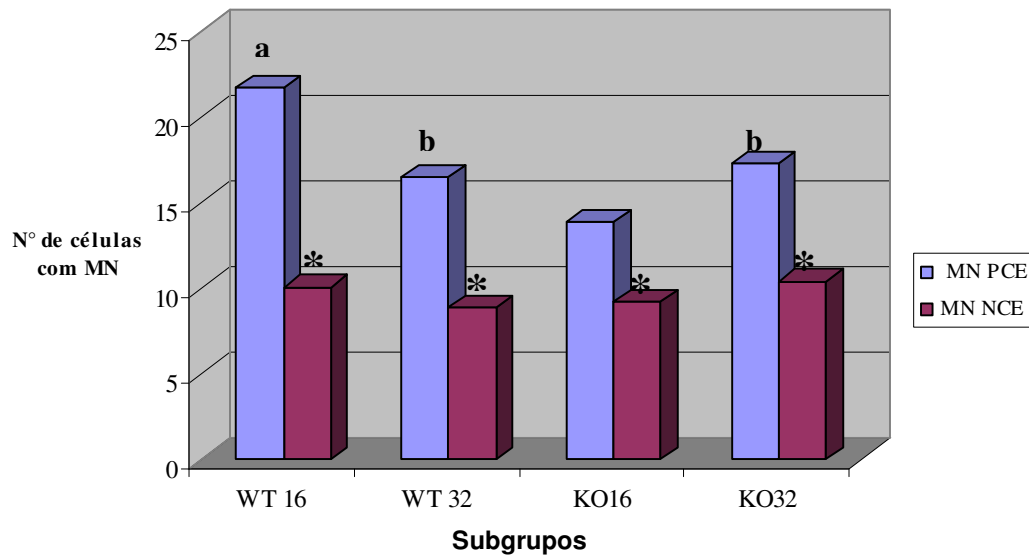
WT16/KO16: animais WT e KO, respectivamente, tratados com a 4NQO com 16 semanas de observação; WT32/KO32: animais WT e KO, respectivamente, tratados com a 4NQO com 32 semanas de observação

*estatisticamente significante ($P < 0,05$) o número de NCE micronucleado comparado com o número de PCE micronucleado;

^aestatisticamente significante quando comparado com os animais KO;

^bestatisticamente significante quando comparado os grupos de 32 semanas de observação com os de 16 semanas de observação;

Figura 8: Média do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) da medula óssea de camundongos selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene da galectina-3 tratados com o carcinógeno 4-nitroquinolina (4 NQO)



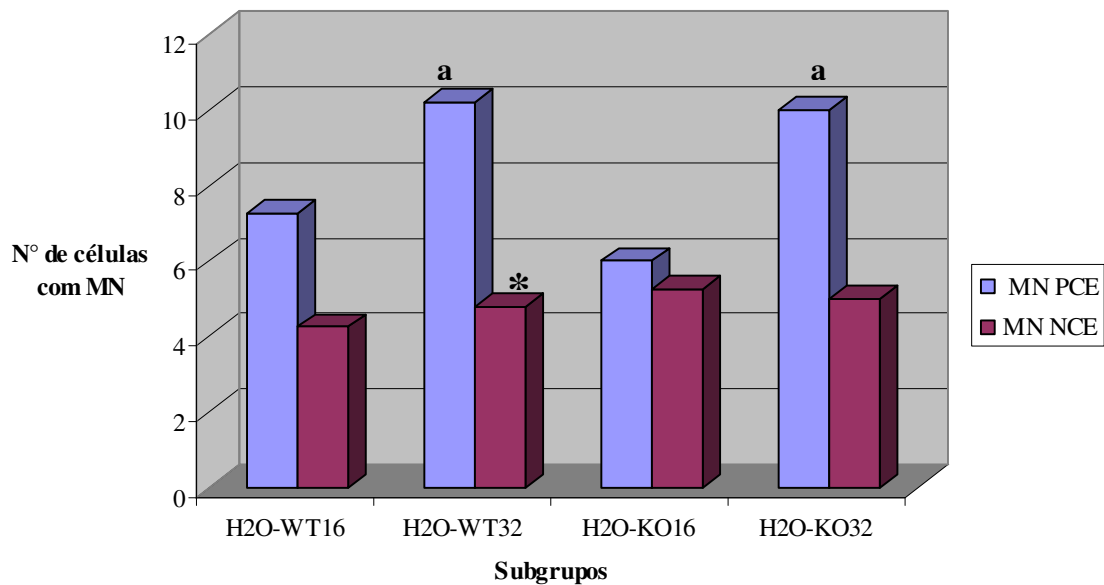
WT: grupo de animais selvagens tratados com 4NQO; KO: grupo de animais *knockout* tratado com 4NQO; WT16/KO16: animais WT e KO, respectivamente, com 16 semanas de observação; WT32/KO32: animais WT e KO, respectivamente, com 32 semanas de observação

* estatisticamente significativo ($P < 0,05$) o número de NCE micronucleado comparado com o número de PCE micronucleado;

^a estatisticamente significativo quando comparado com os animais KO;

^b estatisticamente significativo quando comparado os grupos de 32 semanas de observação com os de 16 semanas de observação;

Figura 9: Média do número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN PCE) e eritrócitos normocromáticos micronucleados (MN NCE) da medula óssea de camundongos selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene da galectina-3 do grupo controle com água nos dois períodos de observação, 16 e 32 semanas



H₂O-WT16/H₂O-KO16: animais WT e KO, respectivamente, controle com água com 16 semanas de observação; H₂O-WT32/ H₂O-KO32: animais WT e KO, respectivamente, controle com água com 32 semanas de observação

* estatisticamente significante ($P < 0,05$) o número de NCE micronucleado comparado com o número de PCE micronucleado;

^aestatisticamente significante quando comparado os grupos de 32 semanas de observação com os de 16 semanas de observação;

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A integridade do DNA é de extrema importância para a manutenção das funções celulares normais e a perda da estabilidade genômica está relacionada com diversos processos patológicos, principalmente relacionada com o processo da carcinogênese (Klein *et al.*, 2006). Existem muitos mecanismos celulares que monitoram os danos genéticos, tais como a maquinaria de reparo do DNA, o controle dos *checkpoints* do ciclo celular e a morte celular programada – apoptose (Mendez *et al.*, 2005). Tendo em vista que a galectina-3 exerce funções no ciclo celular, possui ação antiapoptótica, altera a expressão de diversos genes nas células cancerígenas, interage em eventos associados à progressão e malignidade do tumor e devido à ausência de trabalhos que relaciona o envolvimento dessa proteína com a integridade cromossômica, torna-se relevante compreender sua influência, ou influências, nos danos no DNA induzidos por carcinógenos. O estudo da genotoxicidade a partir de modelos animais manipulados geneticamente permite compreender os efeitos biológicos da participação de moléculas específicas sobre o DNA.

Ademais, é oportuno lembrar que o presente modelo foi proposto como referência para análise, tendo em vista que alterações epiteliais displásicas bem como tumores benignos (papilomas de células escamosas) puderam ser observados na língua destes animais na 16^a semana. Na 32^a semana, período estabelecido para a outra observação, coincide com a prevalência de carcinomas epidermóides. Desta forma, dois períodos se definem para a observação: o primeiro, cujas alterações não se traduzem em câncer e um segundo em que o conjunto das agressões genéticas se expressa como câncer. A propósito, nossos resultados também demonstram que o modelo foi adequado aos objetivos propostos, tendo em vista que na 16^a semana houve predomínio de displasias e na 32^a semana prevaleceram os carcinomas

epidermóides com maior número identificado nos animais WT (Faria, 2006; Farnworth *et al.*, 2008).

No presente trabalho optou-se por utilizar um modelo de agressão que empregasse um agente comprovadamente genotóxico (4NQO) para o qual há evidências de ser causador de danos cromossômicos, portanto, ao DNA. Vale salientar, contudo, que estas evidências tem sido identificadas em modelos que empregaram o 4NQO por via intraperitoneal. Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, 30 horas após administração peritoneal de soluções de 4NQO em duas diferentes doses de 20 mg/Kg e 40 mg/Kg, apresentaram frequências elevadas de MN (44,3% e 38,1% respectivamente) em células da medula óssea (Sato, Takizawa, Inui, 1990). O aumento da frequência de micronúcleos (MN) nas células é indicativo da elevação das taxas de mutações por quebras e/ou perdas cromossômicas e o teste do MN *in vivo* em célula de medula óssea de roedores fornece fortes evidências da genotoxicidade sistêmica do composto químico avaliado sob condições experimentais apropriadas (Carvalho *et al.*, 2002; Salvadori, Ribeiro, Fenech, 2003). Os resultados deste estudo mostraram que a 4NQO induziu aumento de MN, comparado com os grupos controles. Dessa forma, nosso estudo demonstrou que por via oral já na 16ª semana de aplicação, o carcinógeno pode ser considerado um potente agente genotóxico, com efeito sistêmico. Tanto os animais WT quanto os KO mostraram um número de células micronucleadas maior que aquelas identificadas nos animais controles com água e propilenoglicol.

As células respondem aos danos genéticos pela parada do ciclo celular, estabilizando as forças de replicação e induzindo o reparo do DNA. Como também possuem a capacidade de auto-verificação, na presença de anormalidades no DNA os mecanismos de apoptose podem atuar na proteção tecidual, eliminando as células comprometidas (Pierce, 2004; Levitt *et al.*, 2007). Defeitos nesses mecanismos contribuem para a progressão tumoral e malignidade por

permitir a sobrevivência das células mutadas, levando ao acúmulo de mutações e à instabilidade genética (Ibuki, Goto, 2004). Devido ao fato da galectina-3 possuir funções relacionadas com a progressão tumoral como a alteração da regulação da expressão de diversos genes relacionados com o câncer (principalmente genes relacionados com a regulação do ciclo celular, como genes da ciclina D1, ciclina B e retinoblastoma 1) e também apresentar funções de inibição da apoptose e regulação do ciclo celular (Yang, Hsu, Liu, 1996; Yu *et al.*, 2002; Nakahara, Raz, 2007), torna-se importante a investigação de sua influência na integridade do DNA. No presente trabalho foi demonstrado, através do teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos tratados com o carcinógeno 4NQO, que eritrócitos de animais selvagens apresentaram aumento dos danos no DNA comparado com células de animais *knockout* para o gene da galectina-3. Esses dados sugerem que esta lectina pode estar envolvida em fenômenos biológicos que concorrem para o aumento da instabilidade genética, potencializadas quando da exposição a agentes carcinogênicos.

Eritrócitos policromáticos (PCE) são células que ainda estão em estágio imaturo e quando sofrem maturação se transformam em eritrócitos normocromáticos (NCE), os quais são lançados na corrente sanguínea. O teste do MN se caracteriza pela observação do efeito do agente testado em eritrócitos policromáticos anucleados, que têm vida curta e qualquer micronúcleo encontrado representa dano cromossômico recente (Salvadori, Ribeiro, Fenech, 2003). Citotoxicidade ou depressão celular na medula óssea é indicada pela diminuição na proporção de eritrócitos imaturos (PCE), o que reflete em uma diminuição na relação PCE/NCE (Shahrim *et al.*, 2006). Nossos dados mostraram que o tratamento com a 4NQO diminuiu significativamente a relação PCE/NCE nos animais *knockout* para o gene da galectina-3, enquanto que nos animais selvagens essa relação não mostrou diferença significativa após o tratamento. Esses resultados indicam que o carcinógeno foi citotóxico nos

animais *knockout*, mas não nos selvagens, sugerindo um possível papel da galectina-3 na resistência das células expostas a agentes carcinogênicos.

Estudos demonstraram que a galectina-3 possui funções na maturação das células mielóides da medula óssea (Krugluger *et al.*, 1997; Marer, 2000). Os resultados deste trabalho mostraram que a relação PCE/NCE foi superior nos grupos controles de animais *knockout* para o gene da galectina-3 comparado com animais selvagens, fato que pode estar relacionado não com o aumento da proliferação celular (aumento de eritrócitos imaturos nos *knockout*), mas talvez pelo aumento da quantidade das células maduras nos animais selvagens (aumento de NCE).

Outra função importante da galectina-3 é sua atuação no processo de fagocitose realizado pelos macrófagos, os quais possuem papel relevante na eliminação das células apoptóticas e danificadas. Foi demonstrado que a fagocitose de eritrócitos opsonizados foi retardada pelos macrófagos *gal3^{-/-}* comparado com as células dos animais WT. Evidências mostraram que a galectina-3 extracelular, que se liga à superfície de diversas células, incluindo eritrócitos, é um potente ativador e quimioatrativo para os macrófagos, além de contribuir com a homeostasia e as funções dessas células (Sano *et al.*, 2003). No presente estudo, evidenciou-se que no período de observação de 32 semanas, a frequência de MN foi reduzida nos eritrócitos policromáticos de camundongos selvagens enquanto que a mesma elevou-se nas células de camundongos *knockout* para o gene da galectina-3, comparado com os respectivos grupos de 16 semanas de observação. A relação PCE/NCE, parâmetro que indica o índice de citotoxicidade nas células (Krishma, Hayashi, 2000), mostrou-se significativamente reduzida na 32ª semana de observação nos animais WT comparado com os mesmos animais na 16ª semana. Por outro lado, entre os mesmos grupos de tratamento constituído por animais *knockout* essa relação não apresentou diferença estatística. Tais resultados apontam para uma

possível contribuição da galectina-3 na diminuição da formação de células micronucleadas por meio da eliminação das células danificadas.

A alta frequência de mutações espontâneas em camundongos mais velhos é o resultado de um aumento na carga de danos no DNA acumulados nas células (Dass *et al*, 1997). Esse efeito também foi observado no presente trabalho, onde os animais controle, que receberam apenas água, com 32 semanas de observação apresentaram maior número de células micronucleadas comparado com os animais de 16 semanas, tanto em animais selvagens quanto nos *knockout*. Este dado analisado com os resultados observados para os animais WT mostra que o efeito da idade não interferiu aparentemente nos efeitos genotóxicos do carcinógeno. Esta também parece ser a interpretação mais adequada para o que ocorreu nos animais *knockouts* tratados, cujo número de células micronucleadas excedeu significativamente aquele número encontrado para os animais controles com água e com propilenoglicol.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo concluímos que os animais selvagens e *knockout* apresentam resposta diferenciada na formação de células micronucleadas induzidas pelo carcinógeno 4-NQO. As células da medula óssea de camundongos WT enquanto expostas ao agente carcinogênico apresentaram uma frequência de MN significativamente maior comparado aos animais KO, o que sugere a possível participação da galectina-3 nesse fenômeno. A galectina-3 parece interferir nos fenômenos associados a assimilação dos danos cromossomais e, desta forma, na estabilidade genética.

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

1. A solução de 4NQO apresenta potencial genotóxico sistêmico pela capacidade de induzir aumento na geração de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea tanto em animais wild-type quanto em animais *knockout* para o gene da galectina-3, quando administrada por via oral;

2. O envelhecimento aumenta a susceptibilidade a geração de células micronucleadas;

3. O presente estudo revelou que animais *knockout* para galectina-3 quando submetidos ao tratamento crônico via oral de solução carcinogênica apresenta menor número de micronúcleos, o que pode indicar uma menor susceptibilidade a expressão destes danos.

RESUMO

RESUMO

O objetivo deste trabalho é identificar e avaliar o efeito genotóxico do carcinógeno 4NQO em células da medula óssea de camundongos C57BL/6 por meio da técnica de detecção de micronúcleos, bem como identificar a possível diferença neste efeito pela ausência constitutiva do gene da galectina-3. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e *knockout* (KO) para o gene da galectina-3 foram tratados por via oral durante 16 semanas com a 4NQO e divididos em 2 subgrupos cada um, de acordo com o tempo de observação: WT_{16}/KO_{16} - tratados durante 16 semanas, eutanasiados imediatamente após o término do tratamento e WT_{32}/KO_{32} - tratados com 4NQO durante 16 semanas, eutanasiados 16 semanas após o término do tratamento. Após o término do tratamento de cada subgrupo, obedecendo à cronologia de observação do experimento estabelecida previamente, os animais sofreram eutanásia. Em seguida as línguas foram retiradas e utilizadas para análises microscópicas e a medula óssea foi coletada dos fêmures e submetida à técnica do MN. Ao final do experimento, 100% dos camundongos dos grupos WT e KO de 16 e 32 semanas de observação apresentaram alterações no tecido epitelial lingual que puderam ser reconhecidas como displasia, carcinoma *in situ* ou carcinoma epidermóide. No grupo composto por animais WT tratados com a 4NQO foi encontrado maior quantidade de PCEs micronucleados comparado com o mesmo grupo constituído por animais KO, essa diferença foi estatisticamente significativa. O presente estudo revelou que animais *knockout* para galectina-3 quando submetidos ao tratamento crônico via oral de solução carcinogênica apresenta menor número de micronúcleos, o que pode indicar uma menor susceptibilidade a expressão destes danos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The purpose of the study was to observe the possible difference of the genotoxic effect caused by the chronic treatment with 4-nitroquinoline carcinogen (4NQO) in wild-type and knockout mice for the galectin-3 gene. Wild-type C57BL/6 mice (WT) and knockout mice (KO) for the galectin-3 gene were orally treated with 4NQO and killed at 16^o (WT16/KO16) and 32^o week (WT32/KO32). After the treatment of each sub-group the animals had suffered euthanasia, the tongue had been remove and used for microscopical analyses and the bone marrow was removed of femur and submitted to micronuclei (MN) test. To the end of the experiment, 100% of the groups WT and KO of 16 and 32 weeks had presented alterations in the tongue epithelial tissue that could have been recognized as displasia, carcinoma *in situ* or carcinoma. In the groups treated with 4NQO the number of micronucleated PCE was significantly higher in WT when compared with the animals knockout (KO). The present study revealed that knockout mice for galectin-3 when submitted to the chronic treatment with carcinogen presents minor number of micronuclei, what it can indicate a lesser susceptibility the expression of these damages.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEDIN, M. J.; KASHIO, Y.; SEKI, M.; NAKAMURA, K.; HIRASHIMA, M. Potential roles of galectins in myeloid differentiation into three different lineages. **J Leukoc Biology**. 73: 650-656, 2003.
2. ADIDA, C.; RECHER, C.; RAFFOUX, E.; DANIEL, M. T.; TAKSIN, L.; ROUSSELOT, P.; SIGAUX, F.; DEGOS, L.; ALTIER, D. C.; DOMBRET, H. Expression and prognostic significance of surviving in de novo acute myeloid leukaemia. **Brit J Haematol**. 111: 196-203, 2000.
3. AKAHANI, S.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; KIM, H. R.; RAZ, A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-3 family. **Cancer Res**. 57: 5272-5276, 1997.
4. BABA, T.; MISU, Y.; TAKAYAMA, S. Induction of cancer of the glandular stomach in a rat: a new form of experiment. **Gann**. 53: 381 – 387, 1962.
5. BARNES, L *et al.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press. Lyon, 2005.
6. BENSON, A. M. Conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide by a dicumarol-resistant hepatic 4NQO nitroreductase in rats and mice. **Biochem Pharmacol**. 46(7):1217-1221, 1993.
7. BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; GORDANA, J.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FECECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. 28(3): 625-631, 2007.
8. BOREL, F.; LOHEU, O. D.; LACROIX, F. B.; MARGOLIS, R. L. Multiple centrosomes arise from tetraploidy checkpoint failure and mitotic centrosome clusters in p53 and RB pocket protein-compromised cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 99: 9819-9824, 2002.
9. BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Sem Cancer Biol**. 15: 51-60, 2005.
10. BRESALIER, R. S.; MAZUREK, N.; STERNBERG, L. R. Metastasis of human colon cancer is altered by modifying expression of the β -galactoside-binding protein galectina-3. **Gastroenterology**. 115: 287 – 296, 1998.
11. CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. R. F.; GUEDES, A.L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Correlação entre a evolução clínica e a

- frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev Assoc Méd Brás.** 48(8): 317-322, 2002.
12. CHIARIOTTI, L.; SALVATORE, P.; FRUNZIO, R.; BRUNI, C.B. Galectin genes: Regulation of expression. **Glycoconjugate Journal.** 19:441-449, 2004.
13. CIRMAN, T.; ORESIC, K.; MAZOVEC, C. D. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. **J Biol Chem.** 279: 3578-3587, 2004.
14. COLI, A.; BIGOTTI, G.; ZUCHETTI, F.; NEGRO, F.; MASSI, G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. **Histopathology.** 40: 80-87, 2002.
15. CORY, S.; ADAMS, J.M. The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Rev.** 2: 647-656, 2002.
16. DASS, S. B.; ALI, S. F.; HEFLICH, R. H.; CASCIANO, D. A. Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice. **Mut Res.** 381: 105-110, 1997.
17. DECODIER, I.; CUNDARI, E.; KIRSCH-VOLDERS, M. Influence of caspase activity on micronuclei detection: a possible role for caspase-3 in micronucleation. **Mutagenesis.** 20(3): 173-179, 2005.
18. DUNEAU, M.; BOYER-GUITTAUT, M.; GONZALEZ, P.; CHARPENTIER, S.; NORMAND, T.; DUBOIS, M.; RAIMOND, J.; LEGRAND, A. Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. **Exp Cell Res.** 302: 194 – 205, 2005.
19. FARIA, P. R. Carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO em língua de camundongos *knockout* para o gene da galectina-3. **Tese de doutorado apresentada ao curso de pós-graduação da UFTM.** Uberaba/MG, pp: 11-95, 2006.
20. FARNWORTH, S. L.; HENDERSON, N. C.; MACKINNON, A. C.; ATKINSON, K. M.; WILKINSON, T.; DHALIWAL, K.; HAYASHI K.; SIMPSON, A. J.; ROSSI, A. G.; HASLETT, C.; SETHI, T. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. **Am J Pathol.** 172 (2):395-405, 2008.
21. FISCHER, W. H.; KEIWAN, A.; SCHMITT, E.; STOPPER, H. Increased formation of micronucleus after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. **Mutagenesis.** 16: 209-212, 2001.
22. HAYASHI, Y.; HASEGAWA, T. Experimental pancreatic tumor in rats after intravenous injection of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. **Gann.** 62(4): 329-330, 1971.
23. HEDDLE, J. A.; SALAMONE, M. F. The micronucleus assay *in vivo*. In: **Proceedings of the international workshop on short - term tests for chemical carcinogens.** (STICH, H.;

- SAN, R. H. C., eds). Springer - Verlag, New York, pp. 243 - 249. 1981.
- 24.HINDS, P. W.; DOWDY, S. F.; EATON, E. N.; ARNOLD, A.; WEINBERG, R. A. Functions of a human cyclin gene as an oncogene. **Proc Natl Acad Sci.** 91: 709-713, 1994.
- 25.HOZUMI, M. Production of hydrogen peroxide by 4-hydroxylaminoquinoline-1-oxide. **Gann.** 60:83-90, 1969.
- 26.IBUKI, Y.; GOTO, R. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta.** 1690: 11-21, 2004.
- 27.KADROFSKE, M. M.; OPENO, K. P.; WANG, J. L. The human LGALS3 (galectina-3) gene: Determination of the gene structure and functional characterization of the promoter. **Arch Biochem Biophysical.** 349 (1):7-20, 1998.
- 28.KANOJIA, D.; VAIDYA, M. M. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol.** 42:655-667, 2006.
- 29.KIM, H. C.; LIN, H.; BILIRAN, H.; RAZ, A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectina-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Res.** 59: 4148-4154, 1999.
- 30.KIM, Y. T., ZHAO, M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. **Yonsei Medical J.** 46(5): 597-613, 2005.
- 31.KLEIN, A.; ZANG, K. D.; STEUDEL, W.; URBSCHAT, S. Different mechanisms of mitotic instability in cancer cell lines. **Int J Oncol.** 29: 1389-1396, 2006.
- 32.KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat Res.** 455: 155-166, 2000.
- 33.KRUGLUGER, W.; FRIGERI, L. G.; LUCAS, T.; SCHMER, M.; FORSTER, O.; LIU, F. T.; BOLTZ NITULESCU, G. Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cells proliferation and GM-CSF-induced gene transcription. **Immunology.** 197: 97-109, 1997.
- 34.KRZESLAK, A.; LIPINSKA, A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cel Cel Mol Biol Letters.** 9: 305-328, 2004.
35. LA THANGUE, N. B. A mismatched role for Bcl-2. **Nat Cell Biol.** 7: 101-102, 2005.
- 36.LEE, J. W.; SONG, S.Y.; CHOL, J. J.; CHOI, C. H.; KIM, T. J.; KIM, J.; LEE, J. H.; KIM, B. G.; BAE, D. S. Decreased galectina-3 expression during the progression of cervical neoplásica. **J Cancer Res Clin Oncology.** 132: 241-247, 2006.
- 37.LEVITT, P. S.; ZHU, M.; CASSANO, A.; YAZINSKI, S. A.; LIU, H.; DARFLER, J.; PETERS, R. M.; WEISS, R. S. Genome maintenance defects in cultured cells and mice following

- partial inactivation of the essential cell cycle checkpoint gene Hus1. **Mol Cell Biol.** 27 (6): 2189 – 2201, 2007.
- 38.LIN, H. M.; PESTELL, R.; RAZ, A.; KIM, H. R. Galectin-3 enhances cyclin D1 promoter activity through SP1 and cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene.** 21: 8001 – 8010, 2002.
- 39.LIU, F. Regulatory roles of galectins in the immune response. **Allergy and Immunology.** 136:385-400, 2005.
- 40.LIU, F.; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Cancer.** 5: 29-41, 2005.
- 41.LOU, J.; HE, J.; SHENG, W.; JIN, L.; CHEN, Z.; CHEN, S.; LIN, Y.; XU, S. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. **Mut Res.** 617: 104-110, 2007.
- 42.LU, L. W.; BAXTER, J. R.; WANG, M.; HARPER, B. L.; TASAKA, F.; KOHDA, K. Induction of covalent DNA modifications and micronucleated erythrocytes by 4-nitroquinoline-1-oxide in adult and fetal mice. **Cancer Res.** 50:6192-6298, 1990.
- 43.LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics.** 79 (3): 321-329, 1995.
- 44.MARER, N. L. Galectin-3 expression in differentiating human myeloid cells. **Cell Biol Int.** 24 (4): 245-251, 2000.
- 45.MATARRESE, P.; TINARI, N.; SEMERARO, M. L.; NATOLI, C.; IACOBELLI, S.; MALORNI, W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. **FEBS Letters.** 473: 311 – 315, 2000.
- 46.MATSUSHIMA, T.; KOBUNA, I.; SUGIMURA, T. In vivo interaction of 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivatives with DNA. **Nature.** 216:508, 1967.
- 47.MAZUREK, N.; SUN, Y. J.; PRICE, J. E.; RAMDAS, L.; SCHOBBER, W.; NANGIA-MAKKER, P.; BYRD, J. C.; RAZ, A.; BRESALIER, R. S. Phosphorylation of galectin-3 contributes to malignant transformation of human epithelial cells via modulation of unique sets of genes. **Cancer Res.** 65: 10767-10775, 2005.
- 48.MENDEZ, O., FERNANDEZ, Y., PEINADO, M. A., MORENO, V., SIERRA, A. Anti-apoptotic proteins induce non-random genetic alterations that result in selecting breast cancer metastatic cells. **Clin Exp Metastasis.** 22: 297-307, 2005.
- 49.MORI, K.; KONDO, M.; TAMURA, M.; ICHIMURA, H.; OHTA, A. A new carcinogen, 2-nitroquinoline: induction of lung cancer in mice. **Gann.** 60(5): 609-610, 1969.

50. NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. **Adv Cancer Res.** 23: 131-169, 1976.
51. NAKAHARA, W.; FUKUOKA, F.; SUGIMURA, T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. **Gan.** 48: 129-137, 1957.
52. NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis.** 10: 267-275, 2005.
53. NAKAHARA, S.; RAZ, A. Regulation of cancer-related gene expression by galectina-3 and eh molecular mechanism of its nuclear import pathway. **Cancer Metastasis Rev.** 26: 605-610, 2007.
54. NAKAJIMA, M.; KIKUCHI, M.; SAEKI, K.; MIYATA, Y.; TERADA, M.; KISHIDA, F.; YAMAMOTO, R.; FURIHATA, C.; DEAN, S. W. Mutagenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide in the Muta Mouse. **Muta Res.** 444: 321-336, 1999.
55. NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Genética e cancer. **Genética Médica.** Guanabara-Koogan, 6° ed: 274-293, 2002.
56. OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectina-3. **Glycoconj J.** 19: 527 – 535, 2004.
57. OKABAYASHI, T. Mutagenic activity of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. **Chem Pharm Bull.** 10: 1127-1128, 1962.
58. PATTERSON, R. J.; WANG, W.; WANG, J. L. Understanding the biochemical activities of galectina-1 and galectina-3 in the nucleus. **Glycoconj J.** 19: 499 – 506, 2004.
59. PIERCE, B.A. Cromossomos e reprodução celular. **Genética: Um enfoque conceitual.** Guanabara-Koogan, 1° ed: 16-43, 2004.
60. RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – Métodos e critérios de avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética**, pp.83-85, 1991.
61. RAIMOND, J.; ZIMONJIC, D. B.; MIGNON, C.; MATTEI, M. G.; POPESCU, N. C.; MONSIGNY, M.; LEGRAND, A. Mapping of the galectina-3 gene (LGALS3) to human chromosome 14 at region 14q21-q22. **Mammalian Genome.** 8: 706 – 707, 1997.
62. RAMPINO, N.; YAMAMOTO, H.; IONOV, Y.; LI, Y.; SAWAI, H.; REED, J. C.; PERUCHO, M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the micosatellite mutator phenotype. **Science.** 275: 967-969, 1997.
63. RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental.** Editora da Ulbra: 173-199, 2006.

- 64.SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, 1º ed:201-219, 2003.
- 65.SANJUÁN, X.; FERNANDEZ, P. L.; CASTELLS, A.; CASTRONOVO, V.; VAN, DEN, BRULE, F.; LIU, F. T.; CARDESA, A.; CAMPO, E. Differential expression of galectin-3 and galectin-1 in colorectal cancer progression. **Gastroenterology**. 113: 1906-1915, 1997.
- 66.SANO, H.; HSU, D. K.; APGAR, J. R.; YU, L.; SHARMA, B. B.; KUWABARA, I.; IZUI, S.; LIU, F. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J Clin Invest**. 112: 389-397, 2003.
- 67.SANO, H.; HSU, D. K.; YU, L.; APGAR, J. R.; KUWABARA, I.; YAMANAKA, T.; HIRASHIMA, M.; LIU, F. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunology**. 165: 2156-2164, 2000.
- 68.SATO, K.; SAITO, T.; ENOMOTO, M. Development of sarcomas in mice at site of injection with a new carcinogen, monoacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline. **Jap J Exp Med**. 40(6): 475-478, 1970.
- 69.SATO, S.; TAKIZAWA, H.; INUI, N. A comparison of micronucleus induction in 3 mouse strains with representative clastogens. **Toxicol Letters**. 52: 215-220, 1990.
- 70.SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat Res.**, 31:9 – 15, 1975.
- 71.SHAHRIM, Z.; BAHARUDDIN, P. J. N. M.; YAHYA, A.; MUHAMMAD, H.; BAKAR, R. A.; ISMAIL, Z. The *in vivo* rodent micronucleus assay of kacip fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Trop Biomed**. 23: 214-219, 2006.
- 72.SHIBATA, T.; NOGUCHI, T.; TAKENO, S.; TAKAHASHI, Y.; FUMOTO, S.; KAWAHARA, K. Impact of nuclear galectin-3 expression on histological differentiation and vascular invasion in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology Reports**. 13: 235-239, 2005.
- 73.SOENGAS, M. S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D.; MORA, J.; ESTELLER, M.; OPITZ-ARAYA, X.; McMCOMBIE, R.; HERMAN, J.G.; GERALD, W. L.; LAZEBNIK, Y. A.; CORDON-CARDO, C.; LOWE, S. W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**. 409: 207-211, 2001.
- 74.STEPHAN, A.; WINKLE, S.; TINOCO, I. Interactions of 4-nitroquinoline-1-oxide with four deoxyribonucleotides. **Biochemistry**. 17(7):1352-6, 1978.
- 75.STOPPER, H.; SCHMITT, E.; GREGOR, C.; MUELLER, S. O.; FISCHER, W. H. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. **Mutagenesis**. 18(3): 243-247, 2003.
- 76.SUZUKI, T., ITOH, S., NAKAJIMA, M., HACHIYA, N., HARA, T. Target organ and time-course in the mutagenicity of five carcinogens in Muta Mouse: a summary report of the

- second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS. **Mutation Res.** 444: 259-268, 1999.
- 77.TAKENAKA, Y.; FUKUMORI, T.; RAZ, A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconj J.** 19: 543 – 549, 2004.
- 78.TITENKO - HOLLAND, N. *et al.* Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion - exposed workers. **Mutat Res.** 338:85 – 95, 1997.
- 79.VERED, M.; YARON, N.; DAYAN, D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. **Oral Oncology.** 41: 337-339, 2005.
- 80.YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectina-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 93: 6737 – 6742, 1996.
- 81.YU, F.; FINLEY Jr, L. R.; RAZ, A.; KIM, H. C. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. **J Biol Chem.** 277 (18): 15819-15827, 2002.
- 82.ZHOU, B. B. S.; CHATURVEDI, P.; SPRING, K.; SCOTT, S. P.; JOHANSON, R. A.; MISHRA, R.; MATTERN, M. R.; WINKLER, J .D.; DHANNA, K. K. Caffeine abolishes the mammalian G2/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. **J Biol Chem.** 275:10342-10348, 2000.

ANEXO I

PREPARO DAS SOLUÇÕES:**Tampão Sorensen:**

Fosfato de sódio: 4,732g Na_2HPO_4 em 500 ml de água deionizada.

Fosfato de potássio: 4,536 de K_2HPO_4 em 500 ml de água deionizada.

- Tampão sorensen: 1 parte da solução de fosfato de sódio: 1 parte do fosfato de potássio.

Corante Giemsa:

1. Dissolver 2 g de Giemsa em 120 ml de glicerina PA a 60°C;
2. Deixar a 60°C por duas horas, agitando;
3. Deixar esfriar e adicionar 120ml de metanol PA;
4. Misturar bem;
5. Deixar saturar por pelo menos 30 dias, em local longe da luz;
6. Filtrar;
7. Armazenar em frascos escuros.