

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANEUPLOIDOGÊNICO DO ANTINEOPLÁSICO TAXOL EXPOSTO À LINHAGEM DIPLÓIDE DE *Aspergillus nidulans*.

Cynthia Priscilla Do Nascimento Bonato; Cláudia Regina Sharan & Simone Jurema Ruggeri Chiuchetta¹

RESUMO

O taxol é uma droga isolada a partir da casca da planta *Taxus brevifolia* e utilizada como agente quimioterápico. Em células eucariotas, essa droga hiper-sensibiliza os microtúbulos através de sua ligação à proteína β -tubulina, tornando a célula incapaz de usar o citoesqueleto de maneira flexível, consequentemente bloqueando o ciclo celular e alterando a segregação normal dos cromossomos durante a mitose. Nesse trabalho foi avaliado o potencial aneuploidogênico do taxol bem como a toxicidade da droga, utilizando como objeto de estudo uma linhagem diplóide do fungo *Aspergillus nidulans*. Os resultados demonstraram que o taxol nas concentrações de 0,06 e 0,18mM é capaz de induzir aneuploidias.

Palavras-chave: aneuploidia, taxol, *Aspergillus nidulans*.

EVALUATION OF ANEUPLOIDOGENIC POTENTIAL OF ANTINEOPLASIC TAXOL DEMONSTRATED ON DIPLOID STRAINS OF *Aspergillus nidulans*.

ABSTRACT

Taxol is a drug isolated from the rind of *Taxus brevifolia* plant. In eukaryotic cells this drug, used as a chemiotherapeutic agent, hyper stabilizes the microtubules by its association with beta-tubulin protein. Cell becomes incapable to use cytoskeleton in a flexible way. Thus, it blocks the cellular cycle and modifies the normal segregation of chromosomes during mitoses. In this research, a diploid strain of *Aspergillus nidulans* fungus was used to evaluate the aneuploidogenic potential of taxol, as well as the toxicities of this drug. The results have demonstrated that taxol, in concentrations of 0,06mM and 0,18mM, is capable to induce aneuploidy.

Key words: aneuploidy, taxol, *Aspergillus nidulans*

¹ Faculdade Integrado de Campo Mourão.

INTRODUÇÃO

Uma variedade de agentes antimitóticos que interagem com o sistema tubulina/microtúbulo são utilizados para a quimioterapia do câncer (1). Taxol é um agente quimioterápico isolado a partir da casca da planta *Taxus brevifolia* e utilizado principalmente para o tratamento de câncer de ovário, mama e pulmão. Com relação ao mecanismo de ação, o taxol interfere com a função normal dos microtúbulos. Enquanto drogas como vinblastina, colchicina e nocodazole causam a despolimerização dos microtúbulos *in vivo* através da ligação da droga ao dímero de proteína $\alpha\beta$ -tubulina, o taxol hiper-sensibiliza os microtúbulos através de sua ligação à proteína β -tubulina, tornando a célula incapaz de usar o citoesqueleto de maneira flexível. Apesar de possuírem mecanismos de ação opostos, baixas concentrações de ambos, taxol e vinblastina, suprimem o crescimento e encurtam as extremidades dos microtúbulos, bloqueando a mitose (2, 3).

Estudos realizados com células de câncer de pulmão A549 expostas ao taxol, demonstraram que esta droga bloqueou o ciclo celular na fase G2/M (4). Outros estudos realizados em células humanas *preB* de leucemia 697 tratadas com taxol, demonstraram a ligação da droga com a proteína inibidora da apoptose Bcl-2 (B-cell Leukemia 2), determinando que o taxol também é capaz de induzir alterações morfológicas e bioquímicas de apoptose (5).

Em eucariotos, a segregação cromossômica e a determinação do plano de divisão celular dependem do dinamismo dos microtúbulos, sendo esses, essenciais para o funcionamento do fuso mitótico e a movimentação dos cromossomos na divisão celular. Assim, uma falha no funcionamento dos microtúbulos pode ocasionar perdas cromossômicas e defeitos na citocinese resultando em aneuploidias (6).

As aneuploidias promovem alterações no número de cromossomos e ocorrem principalmente através do processo de não-disjunção, onde se tem uma falha na separação de cromossomos pareados ou cromátides irmãs na anáfase, tanto em uma divisão mitótica como na primeira ou na segunda divisão meiótica. As aneuploidias apresentam papel significativo em condições

adversas da saúde humana, incluindo defeitos de nascimento, aborto e câncer (7).

Dessa forma, o estudo do potencial aneuploidogênico de substâncias químicas torna-se importante a fim de detectar compostos que possam induzir neoplasias. Pelo fato do antineoplásico taxol apresentar o seu mecanismo de ação relacionado com a sua ligação à proteína tubulina, pode ocasionar danos ao aparato mitótico, tornando-se potencialmente capaz de induzir o evento de aneuploidia, e consequentemente induzir o processo de transformação maligna. Desta maneira, o nosso trabalho avaliou a capacidade do taxol em promover aneuploidias utilizando como objeto de estudo células diplóides do fungo *Aspergillus nidulans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens: Os genótipos e a origem das linhagens de *A. nidulans* utilizadas estão descritas na tabela 1. A linhagem diplóide UT448//A757 foi preparada de acordo com Roper, 1952 (8).

Tabela 1 Genótipo e origem das linhagens de *A. nidulans*².

| Linhagens | Genótipo | Origem |
|-----------|---|-------------------|
| UT448 | <i>riboA1, pabaA124, biA1, AcrA1, wA2</i> | Utrecht (Holanda) |
| A757 | <i>yA2, methA17, piroA4</i> | FGSC |

Meio de Cultura: Meio Completo (MC) e meio mínimo (MM) foram preparados como descrito por Van der Vate e Jansen, 1978 (9). O meio sólido foi preparado com 1,5% de agar e a incubação para o crescimento das linhagens foi realizado à 37°C.

Avaliação da toxicidade da droga: Taxol (Sigma) foi adicionado ao MC fundido, a fim de obter-se as concentrações finais de 0,06 e 0,18mM. Conídios da linhagem diplóide UT448//A757, foram inoculados no centro de placas contendo MC (controle) e MC + taxol

² Os alelos mutantes apresentam os seguintes genótipos: *riboA1, pabaA124, biA1, methA17, piroA4*: requerimento para riboflavina, ácido ρ -aminobenzóico, biotina, metionina e piridoxina, respectivamente. *Y* e *w*: coloração de conídios amarelo e branco, respectivamente. *AcrA1* determina resistência a Acriflavina. FGSC: Fungal Stock Center (University of Kansas Medical Center, Kansas).

(tratamento). Para cada dose utilizada, bem como para o controle, foram inoculados um total de dez placas, as quais foram incubadas à 37°C. Os diâmetros das colônias foram medidos após 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo que os valores dos diâmetros obtidos na presença e na ausência da droga foram comparados estatisticamente utilizando-se o teste t de Student's.

Cálculo da frequência de segregantes aneuplóides: Conídios do diplóide UT448//A757 foram inoculados em MC (controle) e em MC contendo 0,06 e 0,18mM de taxol. As placas foram incubadas por cinco dias à 37° C. Os setores obtidos foram purificados em MC e a estabilidade mitótica dos mesmos foi então avaliada. Foram considerados aneuplóides, os segregantes mitóticos no qual o fenótipo mutante para um dos marcadores recessivos de coloração de conídio (*y* e *w*) produziram setores mitóticos instáveis em alta frequência.

A frequência de aneuplóide foi calculada pela razão entre o número de segregantes aneuplóides e o número total de segregantes mitóticos derivado do diplóide UT448//A757 na presença e ausência da droga. Os resultados obtidos foram comparados utilizando o teste Yates correct Chi-square.

RESULTADOS

No primeiro passo desse estudo foi examinado o efeito antineoplásico do taxol nas concentrações de 0,06 e 0,18mM sob o crescimento micelial do fungo *A. nidulans*. Colônias da linhagem diplóide UT448//A757 obtidas no meio com a droga não apresentaram alterações morfológicas macroscópica do crescimento micelial quando comparado com o controle. A droga também não interferiu com a razão de crescimento da linhagem diplóide nas concentrações acima mencionadas (Figura 1).

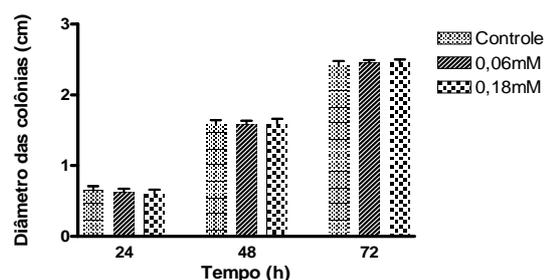


Figura 1 Crescimento do diplóide UT448//A757 em MC (controle) e MC + 0,06 e 0,18mM de taxol.

Posteriormente, foi analisada a indução de aneuploidias pelo agente antineoplásico taxol através do cultivo da linhagem diplóide UT448//A757 em MC contendo a droga. Os segregantes aneuplóides obtidos após o tratamento foram identificados pelo fenótipo e pela acentuada instabilidade mitótica dos mesmos através da produção de setores mitóticos instáveis.

Os setores obtidos na ausência da droga, foram na sua maioria segregantes haplóides, por outro lado, um maior número de segregantes aneuplóides foram obtidos entre os setores induzidos pelo taxol (Tabela 2).

Tabela 2 Frequência de segregantes aneuplóides formados pela linhagem diplóide UT448//A757 após tratamento com 0,06 e 0,18mM de taxol.

| Concentração de taxol (mM) | Número de segregantes | Segregantes | | Frequência de aneuplóides (%) |
|----------------------------|-----------------------|-------------|------------|-------------------------------|
| | | Haplóide | Aneuplóide | |
| Controle | 39 | 28 | 11 | 28,2 |
| 0,06 | 44 | 28 | 16 | *36,3 |
| 0,18 | 58 | 35 | 23 | *39,6 |

DISCUSSÃO

Os dados da tabela 2 demonstram que o taxol nas doses de 0,06 e 0,18mM produziu alta frequência de segregantes aneuplóides quando comparado com o controle.

Em ausência da droga (controle), a maioria dos setores resultantes foram haplóides, estes provavelmente provenientes de um evento primário de não-disjunção mitótica, que após algumas divisões mitóticas, resultaram nos segregantes haplóides finais. Já em presença da droga (tratamento) um maior número de setores aneuplóides foram

* Significativamente diferente do controle para $p < 0,05$ teste Yates correct Chi-square

obtidos, estes provavelmente originados a partir da distribuição irregular dos cromossomos diplóides durante a mitose, indicando o envolvimento da droga na segregação anormal dos cromossomos durante a mitose.

O taxol pode promover o evento de aneuploidia, uma vez que hiper-sensibiliza os microtúbulos, podendo danificar a segregação normal dos cromossomos na mitose e produzir segregantes aneuploides que são extremamente instáveis mesmo que possam produzir produtos finais estáveis após um processo secundário de segregação (10).

Dessa maneira, agentes antineoplásicos que interferem com a divisão celular como o taxol, podem induzir malignidades secundárias, uma vez que, alterações no ciclo celular e a parada do ciclo celular nos pontos de checagem estão entre as primeiras modificações nas células cancerígenas após o tratamento quimioterápico (11).

CONCLUSÃO

Considerando que o taxol interfere com a segregação normal dos cromossomos durante a divisão celular, nossos resultados demonstraram o potencial carcinogênico da droga induzido pelo evento de aneuploidia.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Sandra Coutinho Nunes, Ângela Kwiatkowski e Moacir da Silva pelo suporte técnico.

Cynthia Priscilla Do Nascimento Bonato
Cláudia Regina Sharan
Simone Jurema Ruggeri Chiuchetta

Endereço para correspondência: Rodovia BR 158 Km 207 –
CEP 87300-970, Campo Mourão, Paraná.
Telefone: (44) 3518-2200
e-mail: simonej@grupointegrado.br

Recebido em 03/03/06

Revisado em 08/04/06

Aceito em 19/04/06

REFERÊNCIAS

- (1) BOLLAG, D.M.; McQUENEY, P.A.; ZHU, J.; HENSENS, O.; KROUPAL, L.; LIESCH, J.; GOETZ, M.; LAZARIDES, E.; WOODS, C.M. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. **Cancer Res.**, s.L., v.55, n.11, p.2325-2333, 1995.
- (2) JORDAN, M.A.; TOSO, R.J.; THROWER, D. & WILSON, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentration. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, s.L., v.90, n.20, p.9552-9556, 1993.
- (3) JORDAN, M.A.; THROWER, D.; WILSON, L. Effect of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implicates for the role of microtubule dynamics in mitosis. **J. Cell Sci.**, s.L., v.102, n.3, p. 401-416, 1992.
- (4) ROUSSEL, E.; BELANGER, M.M.; COUET, J. G2/M blocked by induces caveolin-1 expression in A549 lung cancer cells: caveolin-1 as a marked of cytotoxicity. **Anticancer Drugs**, s.L., v.15, n.10, p.961-967, 2004.
- (5) TANG, C.; WILLINGHAM, M.C.; REED, J.C.; MIYASHITA, T.; RAY, S.; PONNATHPUR, V.; HUANG, Y.; MAHONEY, M.E.; BULLOCK, G.; BHALLA, K. High level of p26BCL-2 oncoprotein retard taxol-induced apoptosis in human pre-B leukemia cells. **Leukemia**, s.L., v.8, n.11, p. 1960-1969, 2004.
- (6) SILLJE, H.H.; NIGG, E.A. Purification of mitotic spindles from cultured human cells. **Methods**, s.L., v.38, n.1, p.25-28, 2006.
- (7) MUEHLBAUER, P.A.; SCHULER, M.J. Detection of numerical chromosomal aberration by flow cytometry: a novel process for identifying aneugenic agents. **Mutat. Res.**, s.L., v.585, n.1, p.156-159, 2005.
- (8) ROPER, J.A. Production of heterozygous in filamentous fungi. **Experientia**, s.L., v.8, n.1, 1952.
- (9) VAN DER VATE, C.; JANSEN, G.J.O. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genet. Res.**, s.L., v.31, n.1, 1978.
- (10) KAFER, E. High frequency of spontaneous and induced somatic segregation in *Aspergillus nidulans*. **Nature**, s.L., v.186, n.1, 1960.
- (11) MASTBERGEN, S.C.; DUIVENVOORDEN, I.; VERSTEEGH, R.T.; GELDOF, A.A.. Cell cycle arrest and clonogenic tumor cell kill by divergent chemotherapeutic drugs. **Anticancer Res.**, s.L., v.20, n.3A, 2000.