

## AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR DE *Aspergillus nidulans* EXPOSTO AO EXTRATO DA PLANTA *Copaifera officinalis* L

Uériton dias de Oliveira<sup>1</sup>; Josy Fraccaro de Marins<sup>1</sup>; Simone Jurema Ruggeri Chiuchetta<sup>1</sup>

### RESUMO

O óleo extraído da planta *Copaifera officinalis* L tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, entre elas o câncer. Em células eucariontes, o processo de proliferação celular obedece a um padrão cíclico, denominado de ciclo celular. A transformação de uma célula normal em uma célula maligna requer inúmeros passos, onde genes que controlam a divisão normal da célula ou a morte celular são alterados. O fungo *Aspergillus nidulans* é um excelente sistema para o estudo da diferenciação celular. Seu ciclo assexual resulta na formação de conídios, os quais são formados em cadeias em uma estrutura denominada conidióforo. O conidióforo se estrutura em: hifa aérea, vesícula multinucleada e células uninucleadas. O presente trabalho avaliou a capacidade do extrato da planta *C. officinalis* L em promover alterações no ciclo celular de linhagens diplóides de *A. nidulans*, através de observação macroscópica e microscópica do crescimento celular desse fungo. Os resultados demonstraram que não houve alterações macroscópicas do crescimento celular da linhagem exposta ao extrato, porém, alterações microscópicas do conidióforo foram observadas nas diferentes concentrações do extrato analisado. Dessa forma, o estudo da ação do extrato da planta *C. officinalis* L torna-se importante, uma vez que essa substância é capaz de promover alterações no ciclo celular de células eucariontes.

**Palavras-chave:** *ciclo celular, Copaifera officinalis* L, *Aspergillus nidulans*.

### EVALUATION OF CELL CYCLE OF *Aspergillus nidulans* EXPOSED TO THE EXTRACT OF *Copaifera officinalis* L PLANT

### ABSTRACT

The oil extracted from the *Copaifera officinalis* L plant has been used in popular medicine to the treatment of several diseases, like cancer. In eukaryotic cells, the process of cellular proliferation follows a standard cycle, named cellular cycle. The transformation of a normal cell in a malignant one requires several steps, in which genes that control normal cellular division or cellular death are modified. *Aspergillus nidulans* fungus is an excellent system for the study of the cellular differentiation. Its asexual cycle results in the formation of conidia, which are disposed like chains, constituting a structure named conidiophore. This structure consists in an aerial hifae, multinucleate vesicle and uninucleate cells. Current research evaluated the capacity of the *C. officinalis* L plant extract in promoting alterations in the cellular cycle of *A. nidulans* diploid strains, by observing macroscopic and microscopic alterations in cellular growth of this fungus. Results shown that no macroscopic alterations were observed in cellular growth of strains exposed to the extract, however, microscopic alterations of conidiophore have been observed in the different extract concentrations analyzed. In this way, the study of the action of *C. officinalis* L plant extract becomes important considering the fact that this substance is capable to promote alterations in cellular cycle of eukaryotic cells.

**Key words:** *cell cycle, Copaifera officinalis* L, *Aspergillus nidulans*.

<sup>1</sup> Faculdade Integrado de Campo Mourão.

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (1). Diversos são os compostos existentes nas plantas medicinais que lhes conferem atividade terapêutica, entretanto é importante definir a atividade farmacológica desses compostos, a fim de garantir o uso adequado e inócuo a saúde (2).

As copaibeiras são árvores comuns na América Latina, em especial no sudeste brasileiro e na região Amazônica e pertencem ao gênero *Copaifera*, que apresenta mais de 60 espécies catalogadas. Dessas árvores da família das Leguminosas-Caesalpiniaceas, é exudado, através de furo realizado no tronco, um óleo-resina chamado óleo de copaíba (3). O óleo extraído da planta *Copaifera officinalis* L tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades, entre elas o câncer (4).

A capacidade de crescer e se proliferar é atributo fundamental de todas as células. No caso das células eucariontes, o processo de formação de novas células obedece a um padrão cíclico, denominado de ciclo celular, que consiste em duas etapas: crescimento celular e duplicação dos conteúdos citoplasmáticos (interfase) e divisão de núcleo e do citoplasma celular (mitose) (5). O processo de proliferação celular é rigorosamente controlado por produtos gênicos responsáveis pela produção de proteínas celulares envolvidas com a regulação do ciclo celular (6).

A transformação de células normais em cancerosas é um processo extremamente complexo que envolve múltiplas alterações genéticas ou epigenéticas. Dessa forma, a transformação de uma célula normal em uma célula maligna requer inúmeros passos, onde genes que controlam a divisão normal da célula ou a morte celular são alterados (7).

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

Desta forma o estudo de substâncias químicas assume grande importância no sentido de se detectar substâncias que possam interferir no ciclo celular de células eucariontes.

Há muito tempo, fungos vêm sendo utilizados como ferramentas de pesquisa para a genética clássica e mais recentemente para estudos moleculares (8). Entre os fungos filamentosos, o ascomiceto *Aspergillus nidulans* constitui um excelente sistema para o estudo da diferenciação celular, seu ciclo assexuado resulta na formação de esporos assexuais, também denominados de conídios, os quais são formados em cadeias, em estruturas especializadas denominadas de conidióforo. Após dispersarem em contato com uma superfície adequada, os conídios germinam e inicia-se o crescimento das hifas. Estas se desenvolvem até a formação do micélio multinucleado, que posteriormente, desenvolverá hifas aéreas especializadas que formarão os conidióforos. Os conidióforos por sua vez, são formados por uma hifa aérea, uma vesícula multinucleada e duas camadas de célula uninucleadas denominadas de métulas e fiálides (9,10).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade do extrato da planta *C. officinalis* L em promover alterações do ciclo celular, utilizando como objeto de estudo uma linhagem diplóide de *A. nidulans*.

## MATERIAL E MÉTODO

**Obtenção da linhagem diplóide:** Duas linhagens haplóides (UT448 e A757) de *A. nidulans*, complementares com relação aos seus requerimentos nutricionais (tabela 1) foram mantidas em meio mínimo (MM) + 2% de meio completo (MC) a fim de obter-se um heterocáριο. Este foi incubado à 37°C por quatro dias para obtenção da linhagem diplóide UT448//A757 (11).



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

Os alelos mutantes apresentam os seguintes genótipos: *riboA1*, *pabaA124*, *biA1*, *methA17*, *piroA4*: requerimento para riboflavina, ácido p-aminobenzoico, 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).

**Meio de cultura:** MC e MM foram preparados como descrito por Van de Vate e Jansen (1978) (12). O meio sólido foi preparado com 1,5% de agar e a incubação para o crescimento das linhagens foi realizada à 37°C.

**Doses do extrato:** O extrato da planta *Copaifera officinalis* L foi adicionado ao MC a fim de obter-se as concentrações finais de 0,2 e 0,4mM.

**Observação macroscópica do crescimento celular:** O extrato foi adicionado ao MC fundido, em seguida conídios do diplóide UT448//A757 foram inoculados no centro de placas contendo MC (controle) e MC + extrato (tratamento). Tanto para o controle quanto para o tratamento foram inoculados um total de dez placas, as quais foram incubadas à 37°C. Os diâmetros das colônias foram medidos com o auxílio de uma régua nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Os valores encontrados para o diâmetro das colônias em presença e em ausência da droga foram comparados estatisticamente utilizando-se o test *t* de Student.

**Observação microscópica do crescimento celular:** Colônias do diplóide UT448//A757 foram cultivadas em membrana de diálise assepticamente colocadas na superfície de placas de Petri contendo MC (controle) e MC + extrato (tratamento). Amostras foram coletadas após 24 horas de incubação à 37°C. As membranas foram coradas com azul de metileno e observadas ao microscópio óptico. Análises da conidiogênese foram realizadas a partir destas preparações.

Primeiramente foi analisado o efeito no crescimento micelial (análise macroscópica) da linhagem diplóide UT448//A757 exposta ao extrato de *C. officinalis* L nas concentrações de 0,2 e 0,4mM. Colônias da linhagem diplóide, obtidas no meio contendo o extrato, não apresentaram alterações morfológicas macroscópicas quando comparados com o controle (cultura não tratada) (figura 1).

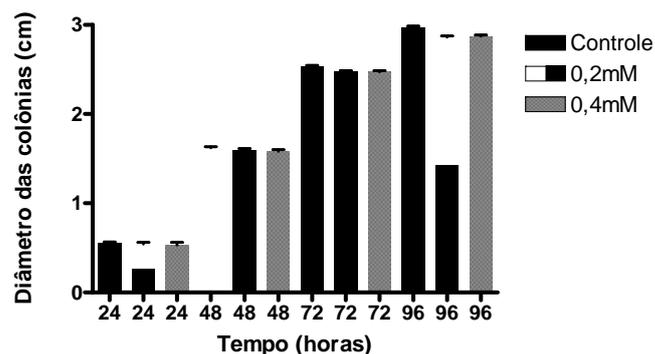
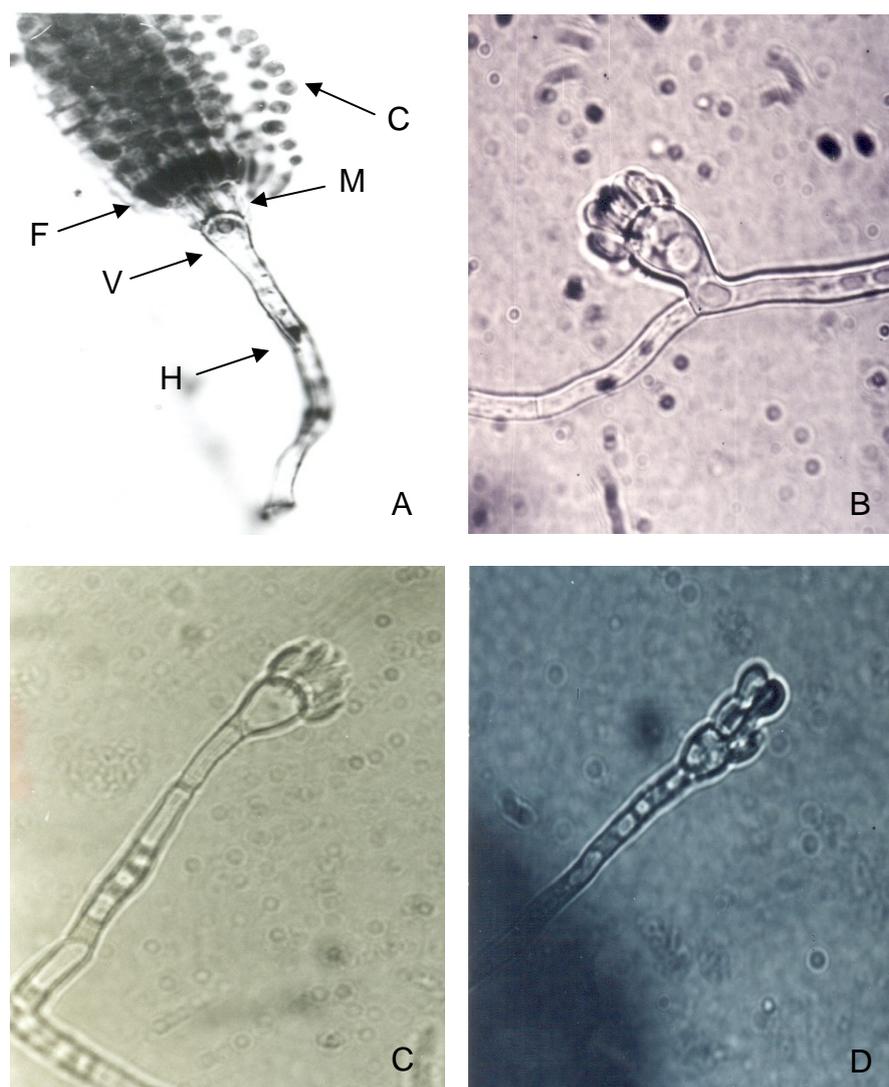


Figura 1 – Crescimento do diplóide Ut448//A757 em MC (controle) e em MC + 0,2 e 0,4mM do extrato da planta *C. officinalis* L.

Por outro lado, alterações morfológicas microscópicas (análise microscópica) do conidióforo foram observadas a partir das colônias da linhagem diplóide UT448//A757 crescidas em presença de 0,2 e 0,4mM do extrato.

O conidióforo é formado por uma hifa aérea, uma vesícula multinucleada e duas cadeias de células uninucleadas (métulas e fiálides). Entre as alterações do conidióforo observadas encontram-se vacúolos na haste e vesícula do conidióforo, alterações em métulas e fiálides e haste do conidióforo encurtada e mal formada (figura 2).

## RESULTADOS



**Figura 2** – Crescimento do conidióforo UT448//A757 em MC e MC + extrato da planta *C. officinalis* L. A) conidióforo normal; B) haste do conidióforo encurtada (0,4mM do extrato); C) presença de vacúolo na vesícula e haste do conidióforo (0,2mM do extrato); D) alteração em métulas e fiáldes (0,4mM do extrato). V: vesícula; M: métula; F: fiálide; C: conídios; H: haste. O diâmetro da vesícula do conidióforo corresponde a 10µm.

## DISCUSSÃO

A análise macroscópica do crescimento micelial da linhagem diplóide UT448//A757 demonstrou que o extrato da planta *C. officinalis* L não interferiu com a razão de crescimento micelial. Dessa forma, as concentrações do extrato analisadas foram consideradas não tóxicas para o organismo em estudo e ideais para realização de testes biológicos.

Para a análise microscópica, alterações morfológicas do conidióforo foram observadas em preparações citológicas do diplóide Ut448//A757 cultivadas em presença do extrato, determinando assim, que o extrato

nas concentrações analisadas promove alterações no ciclo assexual do conidióforo. Esse resultado determina que o extrato é capaz de alterar o ciclo celular de células eucariontes.

## CONCLUSÕES

Considerando que o extrato da planta *C. officinalis* L pode alterar o crescimento de células eucariontes, torna-se importante uma investigação mais precisa da ação desse extrato, afim de, determinar seu papel e local de atuação no ciclo celular de células eucariontes, bem como sua eficácia na terapêutica do câncer.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sandra Coutinho Nunes, Ângela Kwiatkowski e Moacir da Silva pelo suporte técnico.

Uériton Dias de Oliveira

Josy Fraccaro de Marins

Simone Jurema Ruggeri Chiuchetta

Endereço para correspondência: Faculdade Integrado de Campo Mourão

Rodovia BR 158 Km 207

CEP 87300-970. Campo Mourão, Paraná.

Telefone: (44) 3518-2200;

e-mail: [simonej@grupointegrado.br](mailto:simonej@grupointegrado.br)

Recebido em 10/08/06

Revisado em 05/10/06

Aceito em 07/10/06

## REFERÊNCIAS

- (1) AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram.**, s.L., v.28, p.13-19, 1993.
- (2) VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- (3) \_\_\_\_\_. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.2, p.273-286, 2002.
- (4) ALMEIDA ALVES, T.M.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA-JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- (5) COOPER, G.M. A célula. In: \_\_\_\_\_. **O ciclo celular**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.595-631.
- (6) ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAAF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Biologia molecular da célula. In: \_\_\_\_\_. **O ciclo de divisão celular**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.863-910.
- (7) SHUBIK, P. Reflecion on the implication of multistage carcinogenesis for the nature of neoplasia. **Food and Chemical Toxicology**, s.L., v.40, n.4, p.739-742, 2002.
- (8) DEACON, J.W. **Modern micology**. Oxford: Blackwell Science, 1997.
- (9) BUSBY, T.M.; MILLER, K.Y.; MILLER, B.L. Supression and enhancement of *Aspergillus nidulans* medusa mutation by altered dosage of the *bristle* and *stunded* genes. **Genetics**, v.143, n.2, p.155-163, 1996.
- (10) TIMBERLAKE, W.E.; CLUTTERBUCK, A.J. Genetic regulation of conidion. **Prog. Ind. Microbiol.**, s,L,, v.29, n.4, p.383-427, 1994.
- (11) ROPER, J.A. Production of heterozygous in filamentous fungi. **Experientia**, s.L., v.8, n.1, p.14-15, 1952.
- (12) VAN DE VATE, C., JANSEN, G.J.O. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. **Genetic Research**, s.L., v.31, n.1, p.29-52, 1978.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.