

CLAUDINÉIA CONATIONI DA SILVA FRANCO

**GENOTOXICIDADE DO ANTINFLAMATÓRIO NÃO-ESTEROIDAL SULFETO
DE SULINDACO EM *Aspergillus nidulans***

**MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
MARÇO-2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CLAUDINÉIA CONATIONI DA SILVA FRANCO

GENOTOXICIDADE DO ANTINFLAMATÓRIO NÃO-ESTEROIDAL SULFETO DE
SULINDACO EM *Aspergillus nidulans*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

MARINGÁ
PARANÁ-BRASIL
MARÇO-2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

F825g Franco, Claudinéia Conationi da Silva
Genotoxicidade do anti-inflamatório não-esteroidal
sulfeto de sulindaco em *Aspergillus nidulans* /
Claudinéia Conationi da Silva Franco. -- Maringá :
[s.n.], 2007.
44 f. : il., figs. color.

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Marialba Avezum Alves
de Castro-Prado.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá. Programa de Pós-graduação em Genética e
Melhoramento, 2007.

1. Anti-inflamatório não-esteroidal. 2. *Aspergillus
nidulans*. 3. *Crossing-over mitótico*. I. Universidade
Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em
Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 21.ed. 579.135

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus, que com certeza foi quem mais confiou na minha capacidade de chegar até aqui.

Ao meu esposo Reginaldo, que me apoiou nos momentos difíceis e não mediu esforços para que eu alcançasse esta vitória.

Aos meus pais Maria e Daniel, que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Marialba Avezum Alves de Castro-Prado pela sua dedicação, compreensão, amizade, orientação e ensinamentos durante o decorrer do Curso de Pós-graduação.

Aos Professores da Pós-graduação em Genética e Melhoramento, com alguns dos quais, por meio das disciplinas cursadas, aprendi muito.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética que contribuíram para concretização e êxito deste trabalho, em especial, à Luzia Aparecida Regassi por toda dedicação na preparação dos materiais, amizade, carinho, e prestatividade; e à Rosinete Gonçalves pela assistência, amizade e dedicação.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos meus colegas Carmen Querol, Cláudia Miyamoto, Cleverson Busso, Eunice Hitomi Takano e Juliane Sant'Anna, pelo companheirismo, amizade e carinho.

A todos aqueles que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Claudinéia Conationi da Silva Franco, filha de Daniel Rodrigues da Silva e Maria José Conationi da Silva, nascida em 27 de março de 1982, na cidade de São Caetano do Sul, Estado de São Paulo.

Em dezembro de 1996 concluiu o Ensino Fundamental, no Colégio Estadual Adélia Rossi Arnaldi, e em dezembro de 1999 concluiu o Ensino Médio, no Colégio Estadual de Paranavaí - PR.

Em Dezembro de 2004, graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Paranaense - UNIPAR, no Campus Regional de Paranavaí.

Em março de 2006 iniciou seus estudos no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em Maringá – PR, realizando estudos na área de genética de microorganismos.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Linhagens.....	10
3.2. Meios de cultura.....	12
3.2.1. Meio mínimo (MM)	12
3.2.2. Meio completo (MC).....	13
3.2.3. Meio seletivo (SM)	13
3.3. Tratamento do Diplóide UT448//A757 com Sulfeto de Sulindaco	13
3.4. Avaliação da toxicidade do sulfeto de sulindaco	13
3.5. Seleção dos segregantes haplóides	14
3.6. Determinação dos índices de homozigotização	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
7. APÊNDICE.....	38

RESUMO

FRANCO, Claudinéia Conationi da Silva, M.Sc., Universidade Estadual de Maringá, março de 2007. **Genotoxicidade do anti-inflamatório não-esteroidal sulfeto de sulindaco em *Aspergillus nidulans***. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marialba Avezum Alves de Castro-Prado. Professoras Conselheiras: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Pires da Silva Machado e Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin.

O sulfeto de sulindaco é um anti-inflamatório não-esteroidal com efeitos quimiopreventivos em cânceres humanos. Por causa da participação da recombinação somática no processo carcinogênico, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial recombinagênico do sulfeto de sulindaco em células diplóides de *Aspergillus nidulans*. O efeito recombinagênico da droga, nas concentrações de 175 µM e 350 µM, foi demonstrado por meio da homozigotização de genes recessivos, previamente presentes em heterozigose. Os valores de HI (Índice de Homozigotização) para diferentes marcadores genéticos apresentaram-se maiores do que 2,0 e significativamente diferentes dos valores obtidos em ausência da droga (controle). O potencial recombinagênico do sulfeto de sulindaco foi associado à indução de quebras na molécula do DNA e a alterações no ciclo celular. O potencial carcinogênico do sulfeto de sulindaco foi associado ao efeito recombinagênico da droga.

Palavras-chave: Agentes anti-inflamatórios, *crossing-over* mitótico, malignidades secundárias, *Aspergillus nidulans*.

ABSTRACT

FRANCO, Claudinéia Conationi da Silva, M.Sc., State University of Maringá, março de 2007. **Genotoxicity of the nonsteroidal antiinflammatory sulindac sulfide in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans***. Adviser: Marialba Avezum Alves de Castro-Prado. Committee Members: Maria de Fátima Pires da Silva Machado and Claudete Aparecida Mangolin.

Sulindac sulfide is a nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) with chemopreventive effect on human cancer cells. Due to the involvement of the somatic recombination in the carcinogenic process, sulindac sulfide's recombinogenic potential has been evaluated by the Homozygotization Index (HI) in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. The drug's recombinogenic potential was evaluated by its capacity to induce homozygosis of recessive genes from heterozygous diploid cells. Sulindac sulfide at 175 and 350 μM concentrations induced mitotic recombination in *A. nidulans* diploid cells, with HI values for genetic markers higher than 2.0, and significantly different from control HI values. The recombinogenic effect of NSAID was related to the induction of DNA strand breaks and cell cycle alterations. Sulindac sulfide's carcinogenic potential was also discussed.

Keyword: non-steroidal anti-inflammatory, *mitotic crossing-over*, secondary malignances, *Aspergillus nidulans*

1. INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo de fármacos com estrutura química variada e com atividades analgésica, antipirética e anti-inflamatória. O efeito tríplice desses fármacos justifica sua ampla utilização (Insel, 1996; Brooks e Day, 1991; Cossermelli e Pastor, 1995).

Os AINEs exercem seus efeitos por meio da inibição da síntese de prostaglandinas, e alguns desses fármacos, tais como: o sulfeto de sulindaco e o ácido acetilsalicílico (aspirina), têm sido amplamente utilizados como quimiopreventivos em uma variedade de tumores (Kim et al., 2001; Jang et al., 2006; Bernardi et al., 2006).

O composto denominado sulindaco consiste essencialmente em um pró-fármaco. Pouca atividade anti-inflamatória se deve ao composto original, porém, a maior parte de sua atividade farmacológica reside em seu metabólito denominado sulfeto de sulindaco (Figura 1) (Roberts II e Morrow, 2003; Etienne et al., 2003).

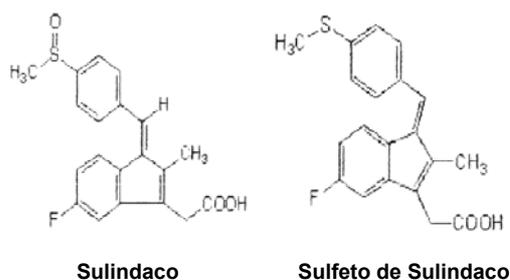


Figura 1. Estrutura química do sulindaco e do sulfeto de sulindaco. Extraído de Etienne et al., (2003).

Estudos realizados com células de câncer de cólon (HCT-15 e HT-29), expostas ao sulfeto de sulindaco nas concentrações de 175 μ M e 200 μ M por 72 horas, demonstraram que esse medicamento induz quebras nas fitas de DNA e inibe a proliferação celular (Qiao et al., 1997).

Levando em conta que a indução de quebras na molécula de DNA pode desencadear o processo de recombinação gênica entre cromátides homólogas, e que a recombinação somática pode atuar como um mecanismo precursor da carcinogênese, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial carcinogênico do sulfeto de sulindaco, por meio de seu efeito sobre a recombinação mitótica, em células diplóides heterozigotas de *Aspergillus nidulans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo de fármacos que inibe a atividade da enzima ciclooxigenase (Figura 2), cuja enzima converte o ácido araquidônico nos compostos intermediários PGG₂ (prostaglandina G₂) e PGH₂ (prostaglandina H₂), envolvidas no processo inflamatório e na sensibilização das vias dolorosas centrais e periféricas. A enzima apresenta dois sítios catalíticos: o sítio ciclooxigenase e o sítio peroxidase. O sítio ciclooxigenase converte o ácido araquidônico na prostaglandina G₂, que por sua vez, é reduzida ao intermediário instável, prostaglandina H₂, pelo sítio peroxidase da enzima, o qual não é inibido pelos AINEs. A PGH₂ é convertida pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) (Insel, 1996; Teixeira et al., 2001; Davies et al., 2002).

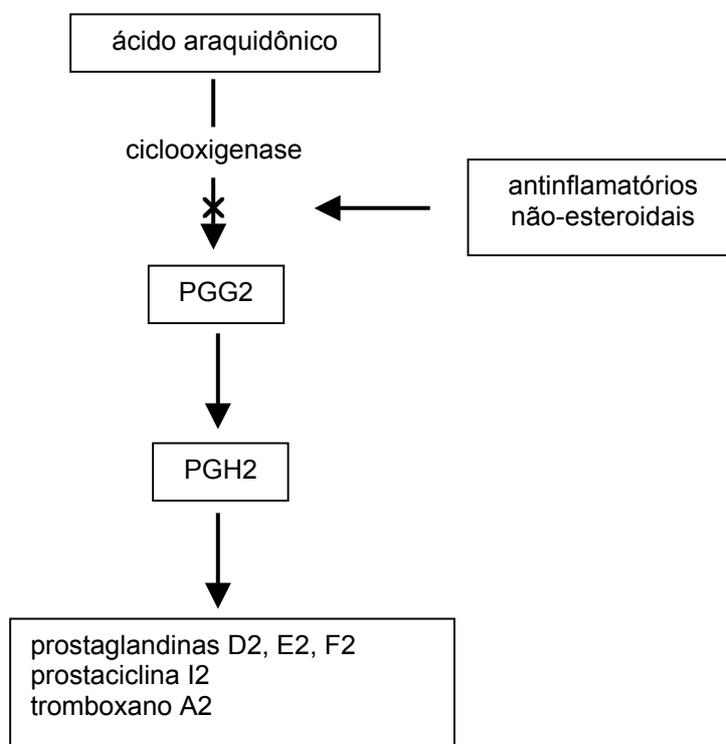


Figura 2. Ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais na via do ácido araquidônico.

A enzima ciclooxigenase apresenta duas isoformas intituladas COX-1 (ciclooxigenase 1) e COX-2 (ciclooxigenase 2). A primeira enzima, COX-1, é composta por 599 aminoácidos, sendo expressa constitutivamente em condições fisiológicas, e encontra-se presente principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e fígado. A COX-2, por outro lado, composta por 604 aminoácidos, é induzida na presença de citocinas (interleucina-1, interleucina-2 e fator de necrose tumoral), fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente em células envolvidas no processo inflamatório, tais como: macrófagos e monócitos. As isoformas COX-1 e COX-2 apresentam estruturas e funções enzimáticas similares, e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente (Vane, 1998; Kulkarni et al., 2000; Carvalho et al., 2004).

O ácido araquidônico é o precursor da síntese de prostaglandinas. Consiste em um ácido graxo de 20 carbonos, liberado a partir de fosfolipídeos de membrana, por meio da enzima fosfolipase A2, enzima ativada por estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos e mitogênicos. A síntese das prostaglandinas inicia-se com a atividade da ciclooxigenase que catalisa a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário, a prostaglandina G2. A mesma enzima, por meio de sua atividade peroxidase, catalisa a redução dessa prostaglandina para formar a PGH2. As PGG2 e PGH2 apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxanos ativos, incluindo PGD2, PGE2, PGF2, prostaciclina (PGI2) e tromboxanos (TX) (Davies et al., 2002) (Figura 3).

Os AINEs, em sua maioria, inibem tanto a atividade da enzima COX-1 quanto da COX-2 (Teixeira et al., 2001; Davies et al., 2002). Acredita-se que a inibição da COX-2 possa mediar, pelo menos em parte, a ação antipirética, analgésica e antiinflamatória dos AINEs. Por outro lado, sabe-se que a inibição simultânea das enzimas COX-1 e COX-2, pelos antiinflamatórios não-esteroidais, resulta em efeitos colaterais indesejáveis, particularmente aqueles que levam ao desenvolvimento de úlceras gástricas, em decorrência da produção diminuída de prostaglandinas (Roberts II e Morrow, 2003).

Os AINEs diferem entre si quanto à farmacocinética química, potência antiinflamatória e efeitos colaterais, e podem ser classificados como: enzimáticos

(parenzime) e não enzimáticos (aspirina), como predominantemente analgésicos e com pouca ou nenhuma ação antiinflamatória (dipirona e paracetamol), como antiinflamatórios moderados (ácido mefenâmico, diclofenaco, celecoxibe, rofecoxibe e paracoxibe), ou como analgésicos e antiinflamatórios potentes (indometacina e butazona) (Cossermelli, 1995; Brooks e Day, 1991).

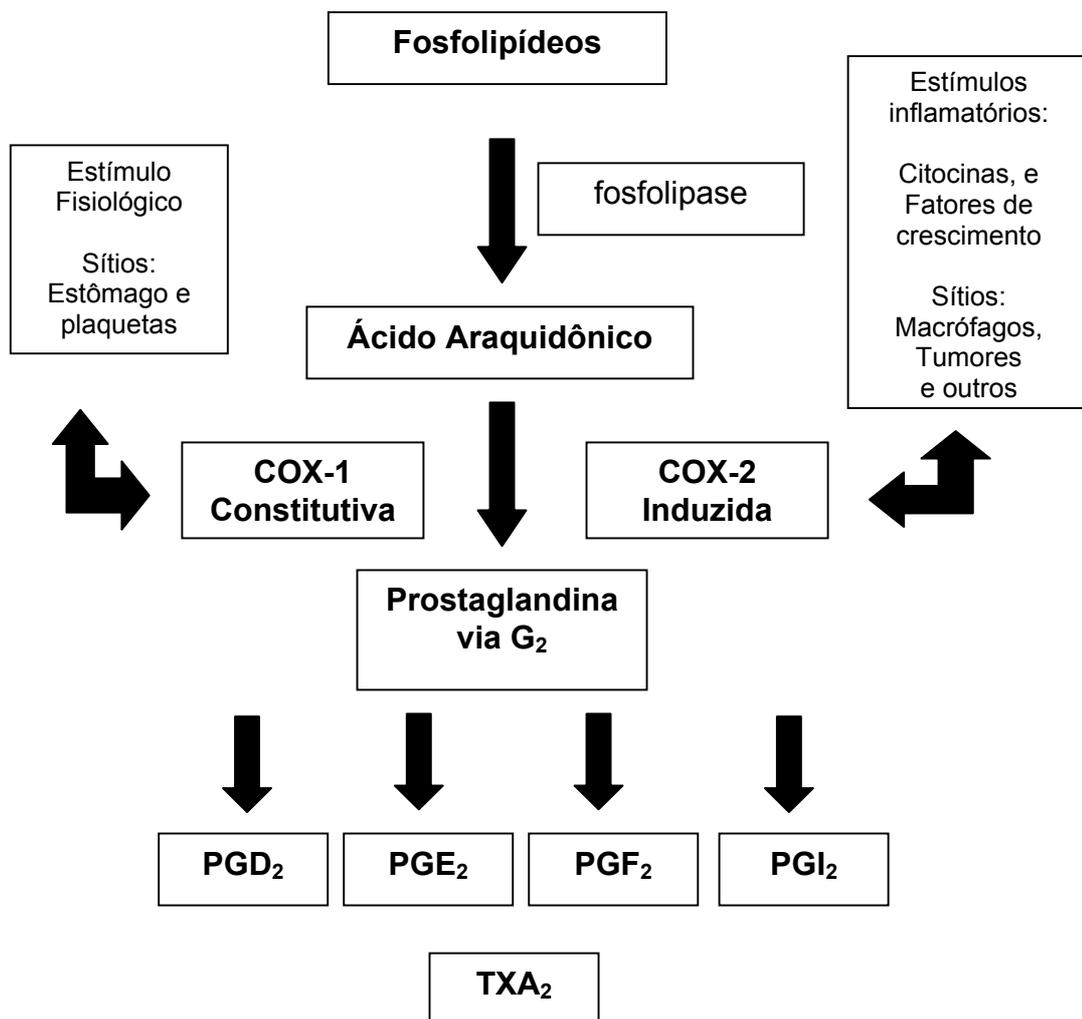


Figura 3. Síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. Extraído de Davies et al., (2002).

A indometacina, introduzida no mercado em 1963, é um dos mais potentes inibidores das enzimas ciclooxigenases. Apresenta elevada biodisponibilidade e efeito anti-inflamatório potente, sendo eficaz no tratamento da doença reumática e da gota, porém os efeitos tóxicos dessa droga limitam sua indicação. Em função disso, um outro agente anti-inflamatório, denominado sulindaco, foi desenvolvido, na tentativa de produzir congêneres menos tóxicos, mas tão eficazes quanto à indometacina (Insel, 1996; Teixeira et al., 2001).

O sulindaco sofre duas biotransformações importantes; inicialmente é oxidado à sulfona e, a seguir, reduzido a sulfeto, de maneira reversível. O último metabólito, sulfeto de sulindaco, constitui a forma ativa do anti-inflamatório, embora todos os três compostos, sulindaco, sulfóxido e sulfeto de sulindaco, sejam encontrados no plasma humano em concentrações comparáveis. A meia-vida do sulindaco é de sete horas, enquanto o sulfeto ativo tem meia-vida de até 18 horas. O metabolismo e a farmacocinética do sulindaco são complexos e variam enormemente entre diferentes espécies. Após administração oral, em seres humanos, ocorre absorção de aproximadamente 90% do fármaco. As concentrações máximas do sulindaco, no plasma, são alcançadas dentro de uma hora, enquanto que para o metabólito sulfeto, tais concentrações são observadas duas horas após a administração oral do anti-inflamatório (Insel, 1996; Teixeira et al., 2001).

O anti-inflamatório sulfeto de sulindaco é utilizado, principalmente, no tratamento da artrite reumatóide, da osteoartrose e da espondilite anquilosante. O fármaco também tem sido prescrito com sucesso no tratamento da gota aguda. (Roberts II e Morrow, 2003; Fernandes, et al., 2003).

Trabalhos anteriores relatam a existência de uma relação inversa entre a incidência de câncer e o uso regular dos anti-inflamatórios não-esteroidais, incluindo a aspirina, dentre outros (Kim et al., 2001; Jang et al., 2006). A administração dos anti-inflamatórios ibuprofeno e o celecoxibe em ratas fêmeas Sprague-Dawley resultou em reduções significativas na incidência, multiplicação e no volume de tumores mamários, induzidos por 7,12-dimetilbenzotraceno (Robertson et al., 1998; Harris et al., 2000). Em seres humanos, pacientes com polipose adenomatosa familiar mostraram redução no número e no tamanho de adenomas coloretais, após a administração do sulindaco. Sua eficácia nessa situação pode ser atribuída, em parte, ao fato de que a redução do sulindaco ao

sulfeto ativo é mediada primariamente pela microbiota intestinal que atua sobre o sulindaco excretado na bile (Strong et al., 1985; Giardiello et al., 1993; Matsushashi et al., 1997;).

Em células cancerígenas do cólon, o sulindaco e seus metabólitos foram capazes de inibir a proliferação celular e induzir quebras nas fitas de DNA e morte celular por apoptose (Pasricha et al., 1995; Qiao et al., 1997). O mecanismo biológico do efeito antineoplásico do sulfeto de sulindaco parece ser mesmo mediado pela indução seletiva de apoptose, o que também foi observado em células de câncer de mama, pulmão e próstata (Piazza et al., 1995; Soriano et al., 1999).

Além de efeitos anti-tumorais, os AINEs podem também apresentar efeitos citotóxicos. Em células cancerígenas de pulmão e em células leucêmicas, o sulindaco e outros anti-inflamatórios não-esteroidais, aumentaram a citotoxicidade de drogas anticancerígenas, tais como: doxorubicina, daunorubicina e epirubicina. Os efeitos citotóxicos dos AINEs foram relacionados à inibição do efluxo das drogas anticancerígenas, o qual é mediado pela proteína MRP, proteína ativa na reação de Resistência Multi-Drogas (MDR). A clássica reação de MDR é caracterizada pela resistência cruzada a uma variedade de drogas quimicamente não-relacionadas, e MRP (proteína associada à MDR) é uma proteína trans-membrana de transporte (Kruh et al., 1995).

Estudos realizados *in vitro*, com células HT-29 de adenocarcinoma de cólon, demonstraram que os anti-inflamatórios ácidos acetilsalicílico, indometacina, piroxicam e o sulfeto de sulindaco bloqueiam a proliferação celular e alteram a morfologia das células de maneira tempo-concentração dependente. Esses medicamentos alteram ainda a distribuição das fases do ciclo celular: aumentam a proporção de células na fase G0/G1 e reduzem a proporção de células na fase S do ciclo celular. Esses compostos também reduzem a atividade de algumas proteínas quinases ciclina-dependentes, que regulam a progressão do ciclo celular. Pesquisas realizadas com os anti-inflamatórios indometacina e sulindaco, utilizando células tumorais da mucosa gástrica de ratos, demonstraram que esses dois medicamentos induzem a fragmentação do DNA de maneira tempo-concentração dependente (Shiff et al., 1995; Hidenobu et al., 1998; Shiff et al., 1996; Eli et al., 2001).

As alterações no ciclo celular e a promoção de quebras no DNA induzidas pelo sulfeto de sulindaco sugerem sua participação na carcinogênese, caracterizada como um processo complexo que envolve uma série de eventos genéticos e celulares. Segundo a teoria da carcinogênese, proposta por Nowell (1976), o desenvolvimento de um tumor maligno é uma conseqüência de alterações genéticas ou epigenéticas múltiplas. A formação da massa tumoral envolve três etapas distintas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é um evento que ocorre quando células normais são expostas a uma substância que altera o DNA. Na ausência de reparo, a célula alterada poderá reproduzir-se durante a mitose, gerar clone de células mutantes. Na promoção, ocorre a expansão numérica dessas células alteradas, formando população de células tumorais pré-malignas. Por fim, a progressão é um processo irreversível, que produz um novo clone de células tumorais com capacidade proliferativa e com potencial metastático (Marks et al., 2000; Shubik, 2002).

O *crossing-over* mitótico foi descrito, inicialmente, em *Drosophila melanogaster* (Stern, 1936), sendo, atualmente, considerado um processo de ampla atuação em células diplóides, com importante função na promoção de neoplasias, em células heterozigotas. O referido processo ocorre durante a segregação das cromátides irmãs na mitose. Em uma célula heterozigota, a segregação de uma cromátide paternal e uma recombinante para o mesmo pólo mitótico resultará na homozigose dos genes distais ao ponto de permuta (Beumer et al., 1998).

A homozigose de genes recessivos, induzida pelo *crossing-over* mitótico, pode ter efeito carcinogênico pela redução da heterozigozidade constitucional de genes supressores de tumores. Dessa forma, substâncias que induzem quebras no DNA, ou que inibem sua replicação, podem apresentar atividade carcinogênica por estimularem a ocorrência do *crossing-over* mitótico (Figura 4) (Zimmermann et al., 1966; Lasko et al., 1991; Hagstrom e Dryja, 1999; Becker e Castro-Prado, 2004; Kaneshima e Castro-Prado, 2005; Souza-Júnior e Castro-Prado, 2005).

O fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* possui oito cromossomos em seu genoma, e, é considerado um excelente organismo para conduzir estudos do potencial carcinogênico de substâncias químicas, pois esse microrganismo passa a maior parte de seu ciclo celular em G2. Nessa fase, os cromossomos

apresentam-se duplicados, o que favorece significativamente o evento de recombinação mitótica (Osman et al., 1993).

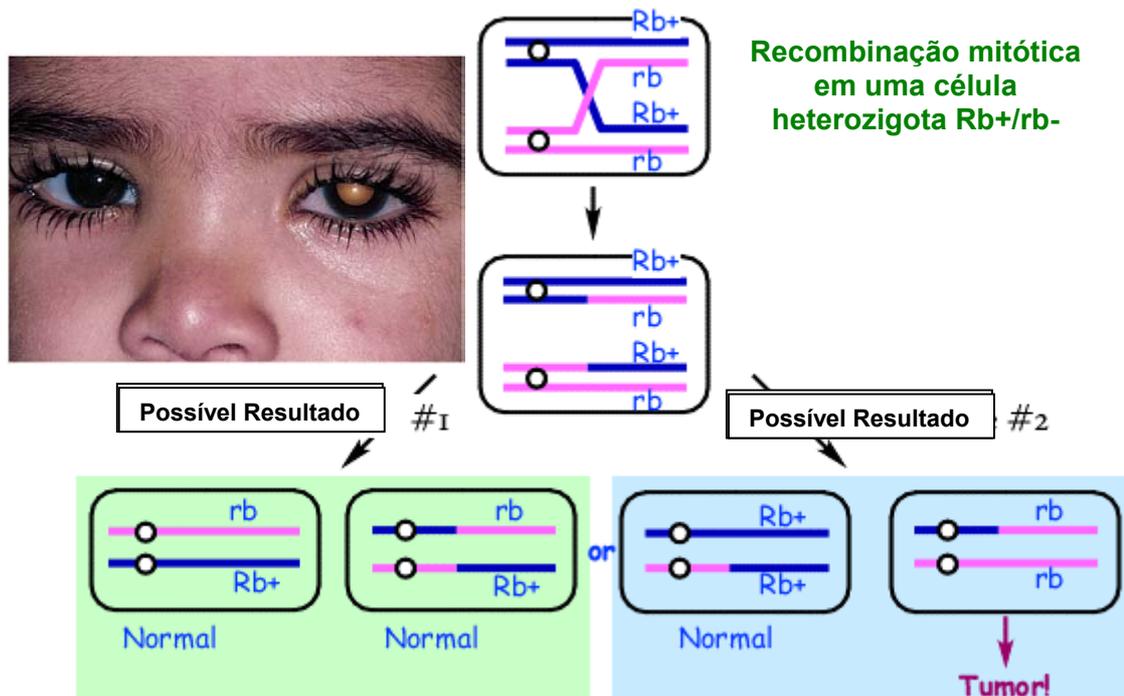


Figura 4. Esquema da perda da condição de heterozigose (Rb^+/rb^-) e origem de células homozigotas (Rb^+/Rb^+ e rb/rb^-), por meio do *crossing-over* mitótico. Adaptado de Griffiths, et al. (2001).

Considerando-se, portanto, a participação da recombinação somática nos mecanismos que conduzem à carcinogênese (Hagstrom e Dryja, 1999), e as alterações no DNA e no ciclo celular induzidas pelo sulfeto de sulindaco, o presente estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade *in vivo* desse agente anti-inflamatório em células heterozigotas de *A. nidulans*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens

Os genótipos e origens das linhagens de *Aspergillus nidulans* são mostrados no Quadro 1.

A linhagem diplóide UT448//A757 (Figura 5), foi obtida conforme metodologia descrita por Roper (1952), cuja técnica consiste em recolher a massa micelial, obtida a partir da heterocariose, com o auxílio de alça de platina, e dividi-la em quatro partes, que foram colocadas em posições distintas, em placas de Petri que contém meio mínimo (MM). As placas foram incubadas a 37°C durante cinco dias. Ao final desse período, foram observadas algumas regiões heterocarióticas com crescimento mais vigoroso (linhagem diplóide), as quais foram transferidas para novas placas contendo MM, e novamente incubadas a 37°C, por cinco dias. Após este período, os conídios diplóides foram estocados em MM a 5°C.

Quadro 1. Genótipo e origem das linhagens de *A. nidulans*

<i>Linhagem</i>	<i>Genótipo</i>	<i>Origem</i>
A757	<i>yA2</i> (I), <i>methA17</i> (II), <i>pyroA4</i> (IV).	FGSC*
UT448	<i>riboA1</i> (I), <i>pabaA124</i> (I), <i>biA1</i> (I), <i>AcrA1</i> (II), <i>wA2</i> (II),	UTRECHT**

Requerimentos para: riboflavina = *riboA1*, ácido p-aminobenzóico = *pabaA124*, biotina = *bioA1*, metionina = *methA17*, piridoxina = *pyroA4*. Coloração do conídio: branco = *wA2*; amarelo = *yA2*. *AcrA1*, resistência à acriflavina, *FGSC = Fungal Genetic Stock Center, University of Kansas Medical Center, Kansas, USA, **UTRECHT = Holanda. Os parênteses representam os cromossomos I, II, III e IV de *A. nidulans*.

A heterocariose, associação de núcleos geneticamente diferentes, em um sistema capaz de se propagar, é um fenômeno peculiar, mas comum em fungos.

Este fenômeno fornece mecanismo para restauração da função normal em genomas combinados, sendo separadamente deficientes e é um mecanismo de evolução dos modelos altamente eficientes de sexualidade, característico dos fungos superiores.

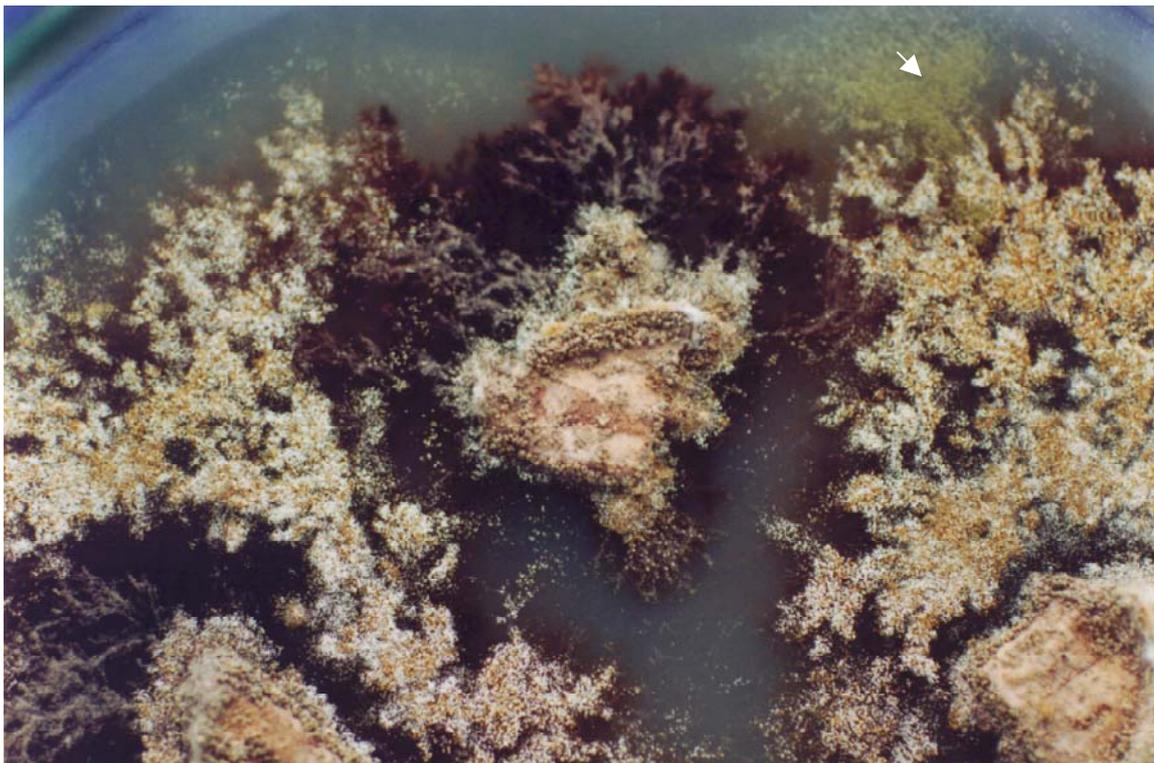


Figura 5. Origem da linhagem diplóide UT448//A757 (seta).

O heterocário fornece benefícios às linhagens que o originaram uma vez que qualquer deficiência genética de uma delas será suprida pela correspondente capacidade normal de outra e vice-versa (Raper, 1955).

A técnica para obtenção do heterocário consiste em colocar conídios de duas linhagens complementares, em 2,5 mL de meio mínimo, (MM) mais 2% de meio completo, (MC) e incubar a 37°C. O MC completo permitirá pequeno desenvolvimento dos conídios, facilitando a anastomose de hifas. Após um período de 72 horas, observa-se o estabelecimento de uma associação heterocariótica (massa micelial compacta) contendo os dois diferentes tipos de núcleos (Figuras 5 e 6).

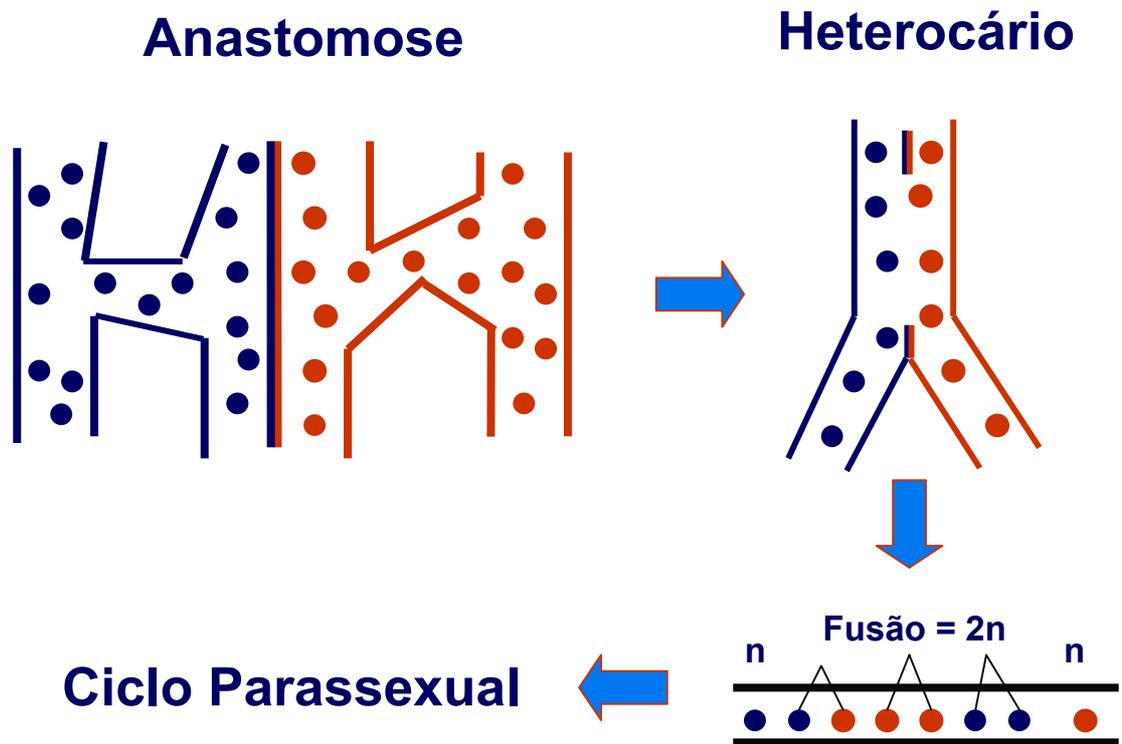


Figura 6. Esquema do ciclo parassexual.

O ciclo parassexual em *A. nidulans* forneceu novos métodos para estudos de recombinação mitótica que pode ocorrer por dois processos distintos: *crossing-over* mitótico e haploidização, em que cromossomos inteiros do diplóide são perdidos ao acaso, até que o estágio haplóide estável seja atingido (Pontecorvo e Kafer, 1958) (Figura 6).

No fenômeno da haploidização, os marcadores de um grupo de ligação segregam em blocos, porém os marcadores de diferentes cromossomos mostram livre recombinação (Kafer, 1958).

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meio mínimo (MM): 900 mL de água destilada, 100 mL da solução concentrada de MM (1000 mL de água destilada; 60,0 g de NaNO_3 ; 15,2 g de KH_2PO_4 ; 5,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 5,2 g de KCl ; 0,02 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$); 10 g de glicose, 15 g de ágar.

3.2.2 Meio completo (CM): adicionam-se ao MM (3.2.1): peptona (2.000 mg/L^{-1}), extrato de levedura (500 mg/L^{-1}), caseína hidrolisada (1.000 mg/L^{-1}), glicose (10.000 mg/L^{-1}), biotina (2 mg/L^{-1}), pirodoxina (50 mg/L^{-1}), ácido *para*-aminobenzóico (50 mg/L^{-1}), ácido fólico (50 mg/L^{-1}), ácido nicotínico (100 mg/L^{-1}), ácido pantenóico (200 mg/L^{-1}), cloreto de colina (200 mg/L^{-1}), riboflavina (100 mg/L^{-1}), inositol (400 mg/L^{-1}) e tiamina (50 mg/L^{-1}).

3.2.3 Meio seletivo (SM): O meio seletivo foi preparado adicionando-se ao MM (3.2.1) os nutrientes requeridos pelas linhagens UT448 e A757, [riboflavina ($0,1 \mu\text{g/ml}^{-1}$), ácido *para*-aminobenzóico ($0,6857 \mu\text{g/ml}^{-1}$), biotina ($0,02 \mu\text{g/ml}^{-1}$), metionina ($149,21 \mu\text{g/ml}^{-1}$) e pirodoxina ($0,05 \mu\text{g/ml}^{-1}$)], omitindo-se um dos nutrientes, em cada tipo de meio.

Após o preparo, o pH dos meios de cultura foi ajustado para o valor 6,0, e os meios foram autoclavados a uma atmosfera de pressão, durante 15 minutos, e mantido à temperatura ambiente. A temperatura de incubação para o crescimento das linhagens foi de 37°C .

3.3 Tratamento do Diplóide UT448//A757 com Sulfeto de Sulindaco

Duas concentrações de sulfeto de sulindaco (Sigma-Aldrich) foram utilizadas no presente trabalho: $175 \mu\text{M}$ e $350 \mu\text{M}$. O composto foi adicionado ao MM fundido, após solubilização em $10 \mu\text{L}$ de dimetil - sulfóxido (DMSO). Essas concentrações foram testadas, pois na dose de $175 \mu\text{M}$, o agente antiinflamatório induziu alterações na fase G1/S do ciclo celular, em células de adenocarcinomas de cólon (Qiao et al., 1997).

3.4 Avaliação da Toxicidade do Sulfeto de Sulindaco

Conídios do diplóide UT448//A757 foram inoculados no centro de placas de Petri, contendo MM (controle) e MM + sulfeto de sulindaco (tratamento). Foram utilizadas dez placas para cada dose ($175 \mu\text{M}$ e $350 \mu\text{M}$) e para o controle, as quais foram incubadas a 37°C . Os diâmetros das colônias foram medidos com

o auxílio de uma régua, após 48, 72, 96 e 144 horas de incubação. Os valores obtidos na presença e na ausência da droga foram comparados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de Student.

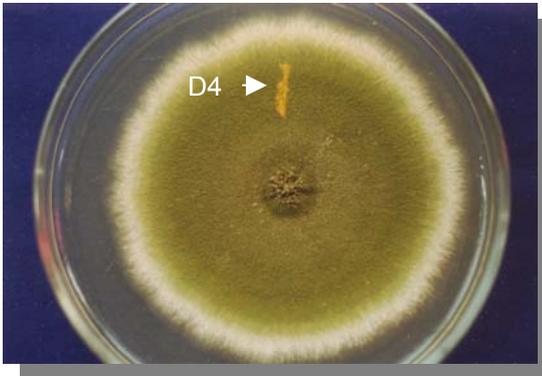
3.5 Seleção dos Segregantes Haplóides

Conídios da linhagem diplóide UT448//A757 (Figura 5) foram inoculados em placas de Petri, contendo MM (controle) e MM + sulfeto de sulindaco nas concentrações de 175 μ M e 350 μ M (tratamento). As placas foram incubadas por cinco dias à temperatura de 37°C. O tratamento originou setores mitóticos nas colônias da linhagem diplóide, os quais apresentaram morfologia distinta do diplóide original.

Seis setores foram isolados (D1 a D6), purificados em MM e posteriormente transferidos para MC + benomyl (agente fungicida também conhecido como Benlate, que exerce seu mecanismo de efeito interferindo na segregação dos cromossomos durante a mitose). Para os testes de recombinação, apenas os segregantes haplóides, derivados dos diplóides tratados (D1 a D6) foram utilizados, que resultam de um processo denominado haploidização mitótica. Esse processo consiste na perda da condição diplóide das células por meio da não-disjunção cromossômica, durante a mitose. Células aneuplóides ($2n - 1$; $2n - 2$, etc.) podem ser produzidas nessa etapa, são extremamente instáveis e continuam perdendo cromossomos ao acaso, até que o estágio haplóide seja finalmente atingido. Se o *crossing-over* mitótico ocorrer antes da haploidização, haplóides recombinantes serão obtidos (Kafer, 1958; Pontecorvo e Kafer, 1958). A seleção dos segregantes haplóides, em detrimento dos aneuplóides, foi realizada por meio de testes de instabilidade mitótica em placas de MC + benomyl (0,5 μ g/mL). Os segregantes que se apresentaram instáveis, em presença de benomyl, foram descartados da amostra (Franzoni et al., 1997). Conídios de cada setor haplóide foram finalmente transferidos individualmente para 25 posições definidas (modelo 5x5) em placas de MC. Após 48 horas de incubação a 37°C, as colônias foram reaplicadas para meios seletivos apropriados para determinação do fenótipo dos segregantes haplóides (Figura 7). Os meios seletivos foram preparados suplementando-se o MM com os

nutrientes requeridos pelas linhagens UT448 e A757, omitindo-se um dos nutrientes, em cada tipo de meio.

Conídios Linhagem 2n (UT448//A757)
inoculadas MM (controle)+MM (tratamento)

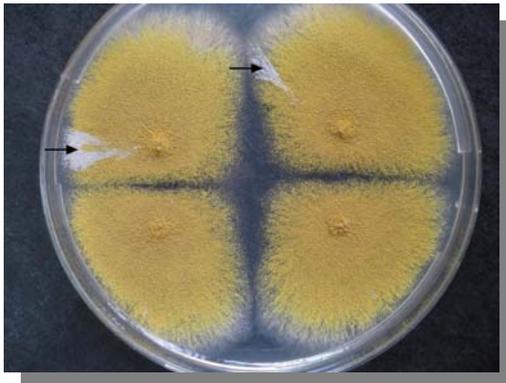


Isolamento e purificação MM (D1 a D6)



Incubadas por 5 dias a 37°C

Haploidização mitótica
MC + Benomyl



Teste de Instabilidade mitótica
MC + Benomyl



Conídios dos setores haplóides
inoculados em MC



Análise fenotípica em
MM suplementado

Figura 7. Seleção dos Segregantes Haplóides.

3.6 Determinação dos Índices de Homozigotização

O *crossing-over* mitótico induz à homozigotização de genes presentes, originalmente em heterozigose. Dessa forma, se o tratamento do diplóide UT448//A757 com sulfeto de sulindaco induzir o *crossing-over* mitótico somente diplóides prototróficos heterozigotos (+/- ou -/+) ou homozigotos (+/+) serão obtidos, uma vez que os diplóides auxotróficos (-/-) não se desenvolvem em MM. Conseqüentemente, o Índice de Homozigotização (HI), para um determinado marcador nutricional, será igual ou superior ao valor 2,0. Valores de HIs inferiores a 2,0 indicam ausência de *crossing-over* para um dado gene. Por outro lado, HIs > 2,0 indicam a ocorrência de mais de um evento de recombinação, envolvendo um determinado marcador (Figura 8). Os valores de HI foram calculados por meio da fórmula:

$$HI = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de segregantes prototróficos}}{\text{N}^{\circ} \text{ de segregantes auxotróficos}}$$

Os HIs obtidos em presença e em ausência do agente anti-inflamatório, e em presença de DMSO, foram comparados utilizando-se o teste do Chi-Quadrado, com a correção de Yates para $p < 0,05$.

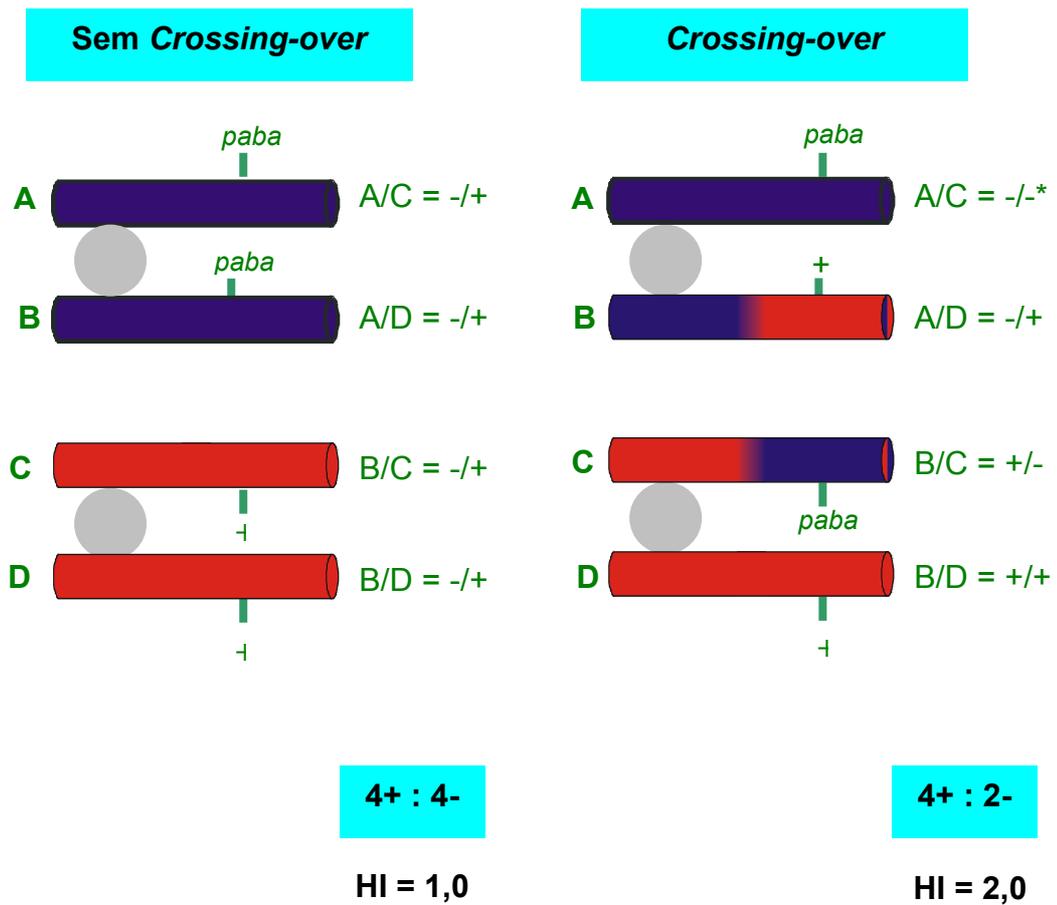


Figura 8. Origem dos diplóides heterozigotos (-/+ e +/-) e homozigoto (+/+) resultantes do *crossing-over* mitótico entre o gene *paba* e o centrômero.
 *Diplóides homozigotos (-/-) não são selecionados em MM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento micelial do diplóide UT448//A757 apresentou-se significativamente reduzido apenas em presença da maior concentração de sulfeto de sulindaco (350 μM), quando comparado com o controle (crescimento em ausência do anti-inflamatório) (Figura 9). Nos testes de recombinação, entretanto, ambas as concentrações de sulfeto de sulindaco mostraram-se capazes de induzir o *crossing-over* mitótico.

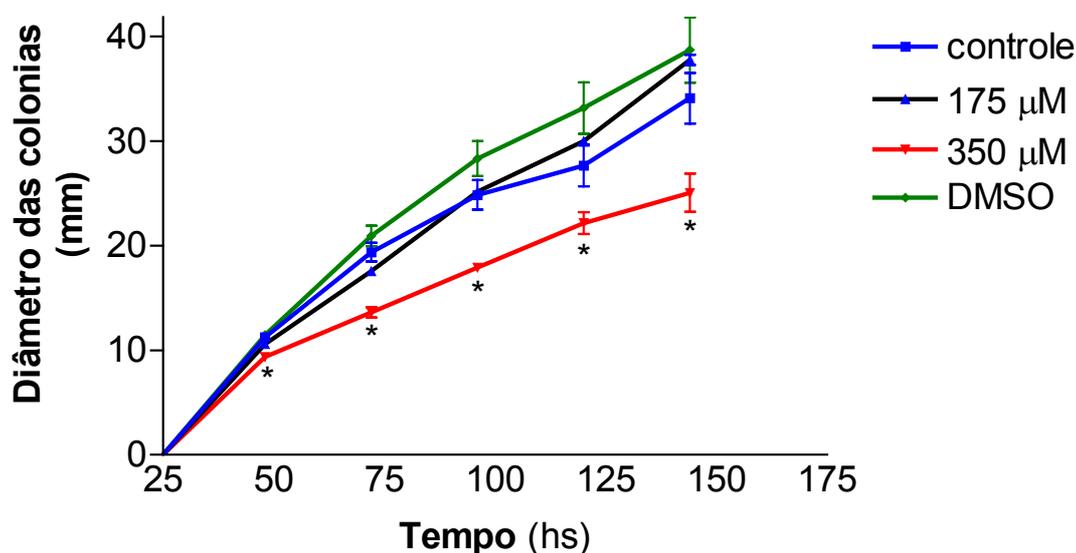


Figura 9. Crescimento micelial do diplóide UT448//A757 em MM (controle), MM + 175 μM de sulfeto de sulindaco, MM + 350 μM de sulfeto de sulindaco e MM + 10 μL de DMSO.

O potencial genotóxico do sulfeto de sulindaco, bem como do solvente DMSO foram avaliados por meio da determinação dos valores de HI para os seguintes marcadores nutricionais: *riboA1*, *pabaA124*, *biA1*, *methA17* e *pyroA4*. Esse índice permite a detecção da homozigotização de qualquer marcador nutricional previamente presente em heterozigose em linhagens diplóides de *A. nidulans* (Pires e Zucchi, 1994). A metodologia para a obtenção do HI não

permite o isolamento de diplóides auxotróficos (-/-), pois esses não são selecionados em MM. É possível, porém, obter-se diplóides homozigotos recessivos para os marcadores de coloração de conídios (*y* e *w*).

Os diplóides DS1 a DS3 foram obtidos após tratamento da linhagem UT448//A757 com 10 µL de DMSO. Após isolamento e purificação, DS1 a DS3 foram submetidos ao processo de haploidização, e posteriormente ao teste de recombinagênese. Os valores de HI obtidos para os marcadores *paba*, *bi* e *meth* não foram significativamente diferentes dos valores do controle, demonstrando que o DMSO, na concentração utilizada, não apresenta genotoxicidade (Quadro 2).

Quadro 2. Índices de Homozigotização obtidos para os marcadores nutricionais dos diplóides DS1 a DS3, derivados do diplóide UT448//A757, após tratamento com 10 µL de DMSO

Marcadores ^a	Controle ^b		DS1		DS2		DS3	
	NS ^c	HI ^d	NS	HI	NS	HI	NS	HI
<i>paba</i> +	37	1,15	50	1,31	49	1,36	42	1,16
<i>paba</i> -	32		38		36		36	
<i>bi</i> +	40	1,37	55	1,66	48	1,33	46	1,43
<i>bi</i> -	29		33		36		32	
<i>meth</i> +	38	1,22	56	1,75	50	1,42	47	1,51
<i>meth</i> -	31		32		35		31	

^a*paba* = ácido p-aminobenzóico; *bi* = biotina; *meth* = metionina. ^bDiplóide não-tratado com DMSO. ^cNúmero de segregantes analisados. ^dÍndice de homozigotização.

O tratamento do diplóide UT448//A757 com ambas as concentrações de sulfeto de sulindaco permitiu o isolamento de seis diplóides prototróficos (D1 a D6), que se apresentaram morfológicamente distintos do diplóide original, com a produção de conídios verdes e amarelos (Figura 10). Os diplóides D1 a D6 foram purificados em MM e transferidos para placas de Petri contendo MC + benomyl para obtenção dos segregantes mitóticos haplóides (Figura 11). Os segregantes estáveis foram, posteriormente, inoculados em posições definidas (Figura 12) de

placas de Petri contendo MC, a partir das quais, os segregantes foram transferidos para meios seletivos apropriados.

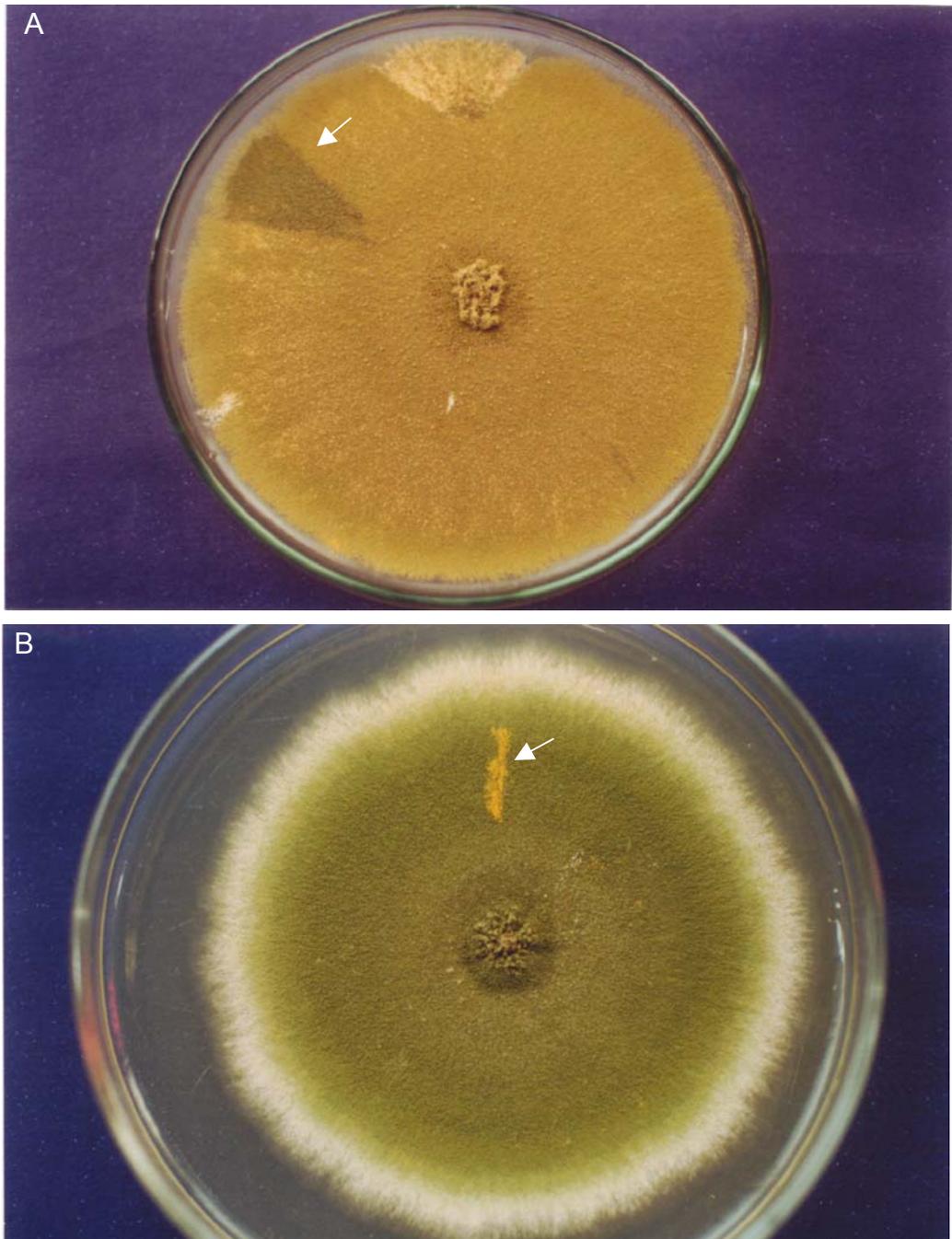


Figura 10. Origem dos diplóides D1 (A) e D4 (B), de *A. nidulans* obtidos após tratamento da linhagem UT448//A757 com 175 μM e 350 μM , de sulfeto de sulindaco, respectivamente. As setas indicam os diplóides D1 (verde) e D4 (amarelo).

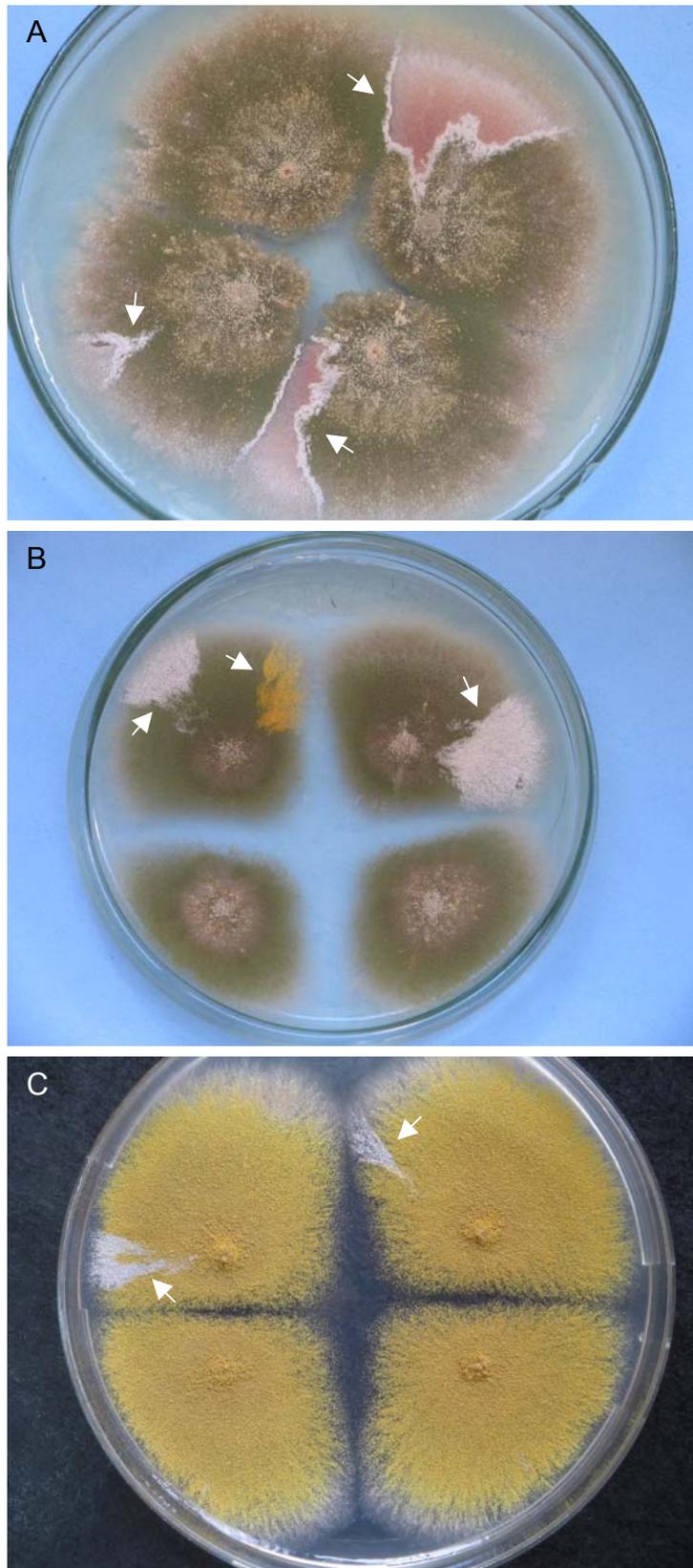


Figura 11. Instabilidade mitótica dos Diploides D1 (A), D2 (B) e D4 (C) em placas de Petri contendo MC + benomyl, após cinco dias de incubação a 37°C. As setas indicam a origem dos segregantes mitóticos.

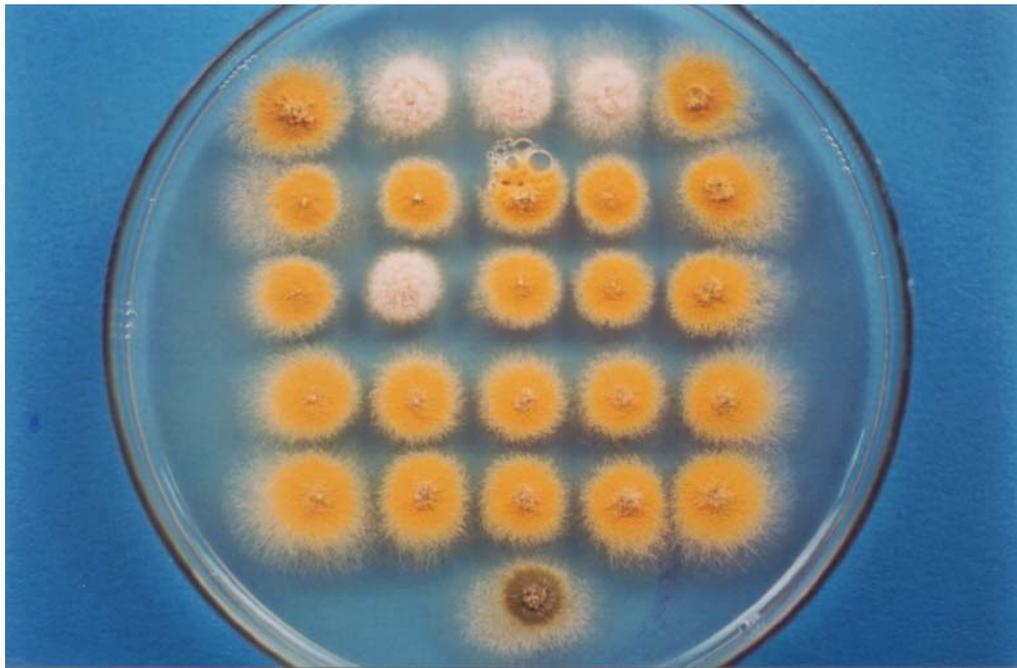


Figura 12. Segregantes haplóides mitóticos que ocupam posições definidas em placa de Petri contendo MC.

Os segregantes mitóticos derivados dos diplóides D1 e D3, obtidos com 175 μ M de sulfeto de sulindaco, exibiram HIs > 2,0 e significativamente diferentes dos HIs obtidos pelo controle (diplóide original, UT448//A757). Por outro lado, os valores de HI obtidos para os segregantes mitóticos do diplóide D2 não apresentaram valores superiores a 2,0, indicando ausência de *crossing-over* mitótico em seu genoma (Quadro 3).

Índices de Homozigotização maiores do que 2,0 e significativamente diferentes dos valores do controle foram também obtidos para os diplóides derivados da linhagem UT448//A757, após tratamento com 350 μ M de sulfeto de sulindaco (D4 a D6). Analisando, em conjunto, os diplóides D4 a D6, observa-se que todos os marcadores nutricionais estudados apresentaram HIs > 2,0 (Quadro 3). O diplóide D4 mostrou-se homozigoto para o gene *paba* e produziu conídios amarelos. Já, o diplóide D6, mostrou-se heterozigoto para os marcadores nutricionais, porém homozigoto para o marcador *y* de coloração de conídios (Quadro 3, Figura 13).

Quadro 3. Índices de Homozigotização (HI) obtidos para os marcadores da linhagem diplóide UT448 // A757 após tratamento com 175 µM (D1-D3) e 350 µM (D4 -D6) de sulfeto de sulindaco

Marcadores ^a	Controle ^b		D1		D2		D3		D4		D5		D6	
	NS ^c	HI	NS	HI	NS	HI	NS	HI	NS	HI	NS	HI	NS	HI
<i>ribo+</i>	33	1.2	50	1.7	37	1.2	41	1.8	30	0.8	50	7.1*	30	1.0
<i>ribo</i>	27		29		30		23		36		07		29	
<i>paba+</i>	34	1.3	50	1.7	36	1.2	41	1.8	66	nd	50	7.1*	32	1.2
<i>paba</i>	26		29		31		23		0		07		27	
<i>Bi+</i>	33	1.2	54	2.2*	44	1.9	50	3.6*	57	6.3*	50	7.1*	40	2.1
<i>Bi</i>	27		25		23		14		09		07		19	
<i>Meth+</i>	33	1.2	71	8.9*	61	nd	58	nd	66	nd	56	nd	51	6.4*
<i>meth</i>	37		08		06		06		0		01		08	
<i>Pyro+</i>	31	1.1	49	1.6	39	1.4	41	1.8	38	1.35	32	1.3	42	2.5*
<i>pyro</i>	29		30		28		23		28		25		17	

^a *ribo* = riboflavina; *paba* = ácido p-aminobenzoico; *bi* = biotina; *meth* = metionina e *piro* = piridoxina. ^bDiplóide não-tratado com sulfeto de sulindaco. ^cNúmero de segregantes analisados. *Significativamente diferente do controle ($p < 0.05$), nd: não-determinado.

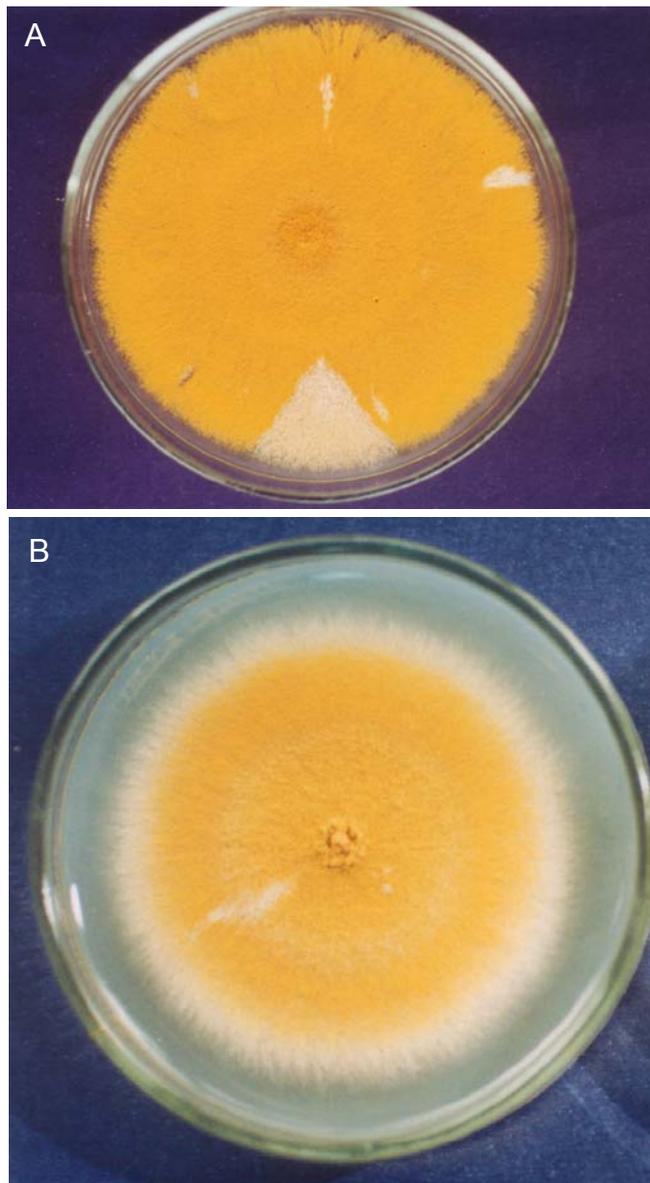


Figura 13. Diplóides D4 (A) e D6 (B) obtidos após tratamento da linhagem UT448//A757 com 350 μ M de Sulfeto de Sulindaco.

Em células humanas de carcinoma cervical e de câncer de cólon, o sulindaco em sua forma ativa, sulfeto de sulindaco inibiu a proliferação celular e induziu apoptose (Babbar et al., 2003; Rice et al., 2003). Esses resultados sugerem que o efeito citotóxico da concentração de 350 μ M de sulfeto de sulindaco, observado durante o crescimento micelial da linhagem diplóide de A.

nidulans, (Figura 9), pode estar relacionado com alterações no ciclo celular ou morte celular.

Bergen e Morris (1983) descreveram a cinética de divisão nuclear em *A. nidulans in vitro*, e estabeleceram que o ciclo celular ocorre durante a germinação do conídio, com duração em torno de 75-120 minutos, dependendo das condições de cultivo. Na temperatura de 37°C, a duração da fase M é em torno de cinco minutos, G2 tem a duração em torno de 30 minutos, a fase S, 25 minutos e G1, tem duração em torno de quinze minutos.

A genotoxicidade do sulfeto de sulindaco foi avaliada nesse estudo pela sua capacidade de induzir homozigose durante a propagação mitótica da linhagem UT448//A757. Os resultados obtidos demonstram que tanto a concentração citotóxica (350 µM) quanto a não-citotóxica (175 µM) do agente anti-inflamatório induziram aumentos significativos nos valores de HI, em comparação com os valores de HI, obtidos em ausência da droga (controle). O DMSO, utilizado para a solubilização do sulfeto de sulindaco, não apresentou genotoxicidade (Quadro 2).

Os diplóides D1 e D3, derivados da linhagem UT448//A757, após tratamento com 175 µM de sulfeto de sulindaco, originaram valores de HI maiores do que 2,0 para os genes *biA1* e *methA17*. Esses resultados demonstram a ocorrência de recombinação mitótica nos cromossomos I e II da linhagem diplóide original. Não foi possível calcular os valores de HI para o gene *methA17*, entre os segregantes mitóticos dos diplóides D2 e D3, uma vez que os segregantes de fenótipo *meth* pertenciam à classe paternal *w+*, *meth* (Quadro 3, Figura 14). Inversamente, todos os segregantes de fenótipo *meth*, obtidos após a haploidização do diplóide D1, foram caracterizados como recombinantes *w*, *meth* (Quadro 3).

Os diplóides, obtidos com 350 µM de sulfeto de sulindaco, D4 a D6, apresentaram valores de HI superiores a 2,0 e significativamente diferentes dos respectivos valores do controle, para os genes *riboA1*, *pabaA124*, *biA1*, *methA17* e *pyroA4* (Quadro 3). A ausência e o reduzido número de segregantes de fenótipo *meth*, derivados dos diplóides D4 e D5, respectivamente, podem ser justificados pelo elevado número de segregantes com conídios brancos (*w*), isolados após a haploidização. Na linhagem original, UT448, o gene *w* encontra-se intimamente ligado ao gene *meth+*, conseqüentemente, a maioria dos

segregantes *w* (conídios brancos) apresenta também o fenótipo *meth+*. De maneira análoga ao que ocorreu nas análises dos diplóides D2 e D3, o segregante *meth* derivado do diplóide D5 após o processo de haploidização, não apresentou fenótipo recombinante, mas paternal, e em função disto, o valor do HI para esse marcador não foi determinado (Quadro 3).

Embora o tratamento da linhagem original UT448//A757 com sulfeto de sulindaco, em MM, não permita o isolamento de diplóides auxotróficos, ou seja, homocigotos recessivos para os marcadores nutricionais, foram obtidos dois diplóides homocigotos para o gene recessivo *y*, de coloração de conídios. O tratamento do diplóide original UT448//A757 com 350 µM de sulfeto de sulindaco permitiu o isolamento dos diplóides D4 e D6, ambos recombinantes e homocigotos *y // y*. As análises fenotípicas desses diplóides evidenciaram que D4 é recombinante para o intervalo centrômero-*paba* e D6, para o intervalo *paba-y*, ambos localizados no cromossomo I. As segregações dos marcadores do cromossomo I (*ribo*, *paba*, e *bi*) entre os segregantes mitóticos da linhagem D6, indicam que tais genes encontram-se em heterocigose no genoma de D6 (*ribo paba bi // ribo+ paba+ bi+*). Por outro lado, a ausência de segregantes *paba* entre os haplóides derivados do diplóide D4, sugere que esse marcador encontra-se em homocigose no genoma de D4 (*ribo paba+ bi // ribo+ paba+ bi+*) (Quadro 3, Figura 13).

Os resultados mostrados, no Quadro 3, demonstram que o sulfeto de sulindaco é um indutor efetivo do *crossing-over* mitótico em *A. nidulans*. O potencial recombinagênico desse agente anti-inflamatório pode resultar de um efeito direto sobre o DNA, induzindo quebras nas cadeias nucleotídicas, ou de alterações no ciclo celular.

A carcinogênese é um processo que resulta de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas, as quais ocorrem de maneira progressiva e em resposta aos efeitos tóxicos de agentes endógenos e ambientais. A doença desenvolve-se a partir de uma única mutação oncogênica, em um proto-oncogene ou em um gene supressor de tumor, e esse evento primário é denominado de iniciação. A expansão clonal das células iniciadas é necessária para a fixação da primeira mutação e para a promoção do tumor, aumentando a probabilidade de ocorrerem alterações adicionais em genes decisivos, envolvidos na progressão do tumor (Marks et al., 2000).

Embora uma célula portadora de um gene supressor de tumor mutante (m) possa apresentar-se fenotipicamente normal, em virtude da presença do alelo funcional ($m+$), a perda da condição de heteroziguidade pode desencadear o processo carcinogênico. De fato, um rearranjo cromossômico que envolve o *locus* afetado pode resultar em homozigose (m/m) ou hemizigose ($m/0$), com a subsequente expressão do caráter maligno recessivo (Lasko et al., 1991). Células homozigotas (m/m) poderão originar pela troca de segmentos entre cromátides homólogas, no estágio G2 do ciclo celular, seguida pela segregação das cromátides recombinantes para pólos mitóticos opostos. Como uma consequência, os genes distais ao ponto de permuta tornam-se homozigotos (Zimmermann et al., 1966; Zimmermann, 1971; Kinsella e Radman, 1978; Beumer et al., 1998). O *crossing-over* mitótico apresenta, portanto, a importante função de permitir a expressão de mutações deletérias ou oncogênicas em células heterozigotas iniciadas. No retinoblastoma humano, a perda da heteroziguidade consiste num importante mecanismo capaz de desencadear o processo de transformação de uma célula normal em uma célula cancerígena (Figura 4) (Cavenee et al., 1991; Hagstrom e Dryja, 1999).

Considerando-se, portanto, que o *crossing-over* mitótico ocorre numa etapa anterior à divisão celular, o período G2, é possível que substâncias como o sulindaco, que promovem alterações na fase S do ciclo celular e quebras cromossômicas, possam atuar como indutoras da recombinação mitótica. Esse processo pode originar células recombinantes, desencadeando a tumorigênese. Os resultados dessa pesquisa demonstram que o antiinflamatório sulfeto de sulindaco pode ser caracterizado como um promotor secundário de neoplasias em células diplóides. O potencial carcinogênico desse agente antiinflamatório pode ser conduzido pela perda da heteroziguidade induzida pelo *crossing-over* mitótico.

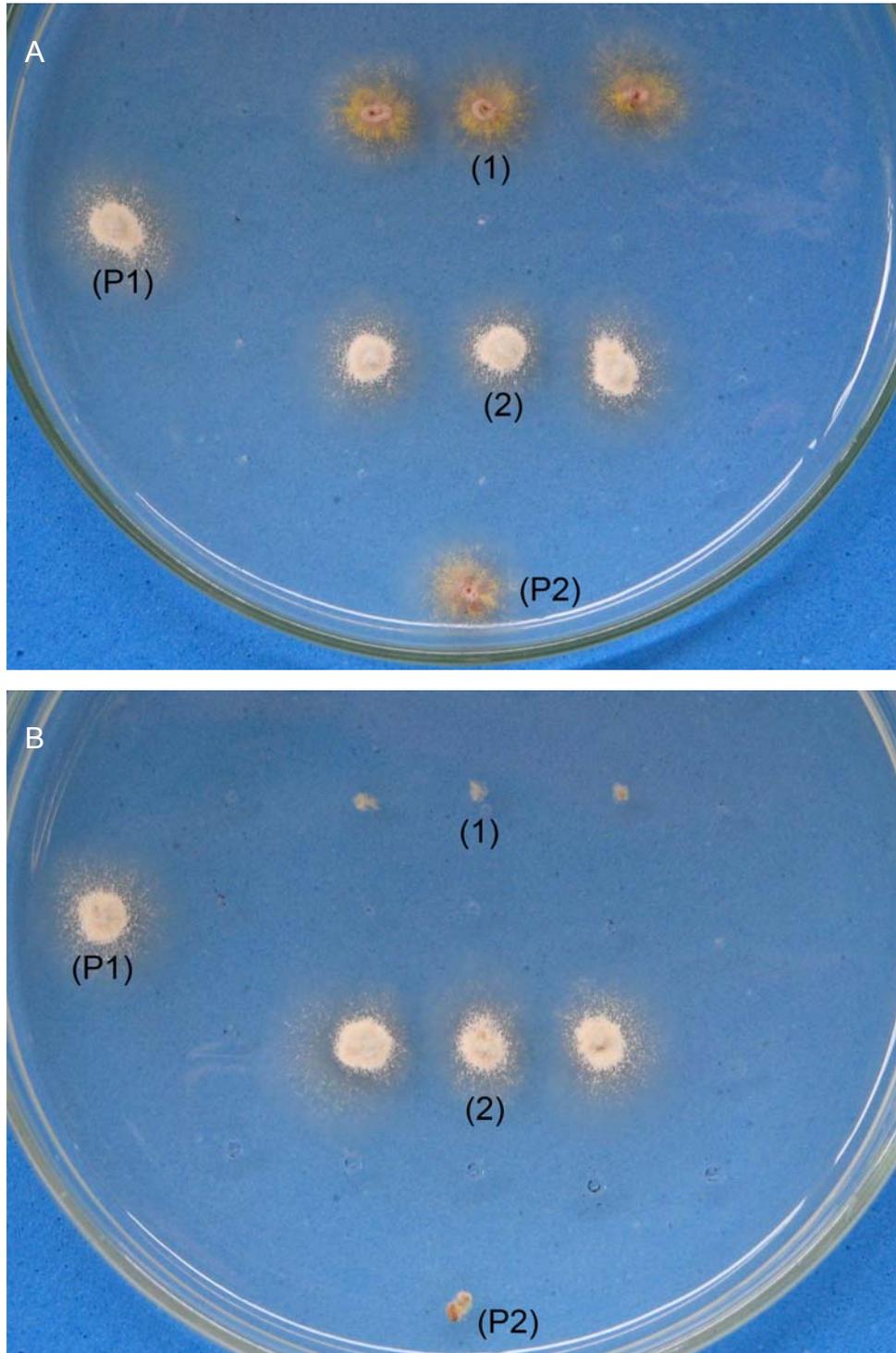


Figura 14. Segregantes mitóticos $w^+ meth$ (1) e $w meth^+$ (2) dos diplóides D2 e D3 crescendo em presença (A) e em ausência de metionina (B); P1 e P2 representam as linhagens paternas UT448 e A757, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

O anti-inflamatório não-esteroidal sulfeto de sulindaco induz *crossing-over* mitótico em células diplóides de *A. nidullans*.

O potencial carcinogênico do sulfeto de sulindaco pode ser conduzido por meio da perda da heterozigosidade, resultante de seu efeito recombinagênico.

Considerando-se o potencial recombinagênico do sulfeto de sulindaco, esse medicamento deve ser utilizado com cautela quando prescrito para o tratamento de doenças inflamatórias.

Pacientes portadores de neoplasias e tratados com sulfeto sulindaco devem ser periodicamente avaliados, quanto ao desenvolvimento de malignidades secundárias, por causa do potencial recombinagênico do referido anti-inflamatório.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABBAR, N.; IGNATENKO, N.A.; CASEROJR, R.A.; GERNER, E.W. Cyclooxygenase-independent induction of apoptosis by sulindac sulfone is mediated by polyamines in colon cancer. **The Journal of Biological Chemistry**, 278 (46): 47762-47775, 2003.

BECKER, T.C.A.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Parameiosis in *Aspergillus nidulans* in response to doxorubicina. **Folia Microbiology**, 49 (6): 699-704, 2004.

BERGEN, L.G.; MORRIS, N.R. Kinetics of the nuclear division cycle of *Aspergillus nidulans*. **Journal of Bacteriology**, 126 (1): 155-160, 1983.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M.C.; DELGADO-CAÑEDO, A.; LENZ, G.; BATTASTINI, A.M.O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U 138-MG glioma cell lines. **European Journal of Pharmacology**, 523: 214-222, 2006.

BEUMER, K.J.; PIMPINELLI, S.; GOLIC, K.G. Induced chromosomal exchange directs the segregation of recombinant chromatids in mitosis of *Drosophila*. **Genetics**, 150 (1): 173-188, 1998.

BROOKS, P.M.; DAY, R.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs – differences and similarities. **New England Journal of Medicine**, 324 (24): 1716-1725, 1991.

CAVENEY, W.K.; SCRABLE, H.J.; JAMES, C.D. Molecular genetics of human cancer predisposition and progression. **Mutation Research**, 247 (2): 199-202, 1991.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 54 (3): 448-464, 2004.

COSSERMELLI, W.; PASTOR, E.H. Antiinflamatórios não-esteróides e doenças reumatológicas. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**, 50: 115-124, 1995.

DAVIES, G.; MARTIN, L.A.; SACKS, N.; DOWSETT, M. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. **Annals of Oncology**, 13: 669-678, 2002.

ELI, Y.; PRZEDECKI, F.; LEVIN, G.; KARIV, N.; RAZ, A. Comparative effects of indometacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grows *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical Pharmacology**, 61 (5): 565-571, 2001.

ETIENNE, F.; RESNICK, L.; SAGHER, D.; BROTH, N.; WEISSBACH, H. Reduction of Sulindac to its active metabolite, sulindac sulfide: assay and role of the methionine sulfoxide reductase system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 312 (4): 1005-1010, 2003.

FERNANDES, E.; TOSTE, S.A.; LIMA, J.L.F.C.; REQUIMTE, S.R. The metabolism of sulindac enhances its scavenging activity against reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology & Medicine**, 35 (9): 1008-1017, 2003.

FRANZONI, M.G.M.; CASTRO-PRADO, M.A.A.; GEBARA, J.S. On the recombinagenic activity of norfloxacin in a diploid strain of *Aspergillus nidulans*. **Cytologia**, 62 (4): 39-45, 1997.

FUNGAL GENETIC STOCK CENTER. Disponível em <www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>. Acesso em: 02 de março de 2007.

GIARDELLO, F.M.; HAMILTON, S.R.; KRUSH, A.J.; PIANTADOSI, S.; HYLIND, L.M.; CELANO, P.; BOOKER, S.V.; ROBINSON, C.R.; OFFERHAUS, G.J. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. **The New England Journal of Medicine**, 328 (18): 1313-1316, 1993.

GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.438, 2001.

HAGSTROM, S.A.; DRYJA, T.P. Mitotic recombination map of 13cen-13q14 derived from an investigation of loss of heterozygosity in retinoblastomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 96 (6): 2952-2957, 1999.

HARRIS, R.E.; ALSHAFIE, G.A.; ABOU-ISSA, H.; SEIBERT, K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, cyclooxygenase-2 inhibitor. **Cancer Research**, 60 (8): 2101-2103, 2000.

HIDENOBU, K.; MATSUYUKI, H.; MATSUURA, M.; IMAYOSHI, T.; OKUR, T.; MATSUI, H. Induction of apoptotic DNA fragmentation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs cultured rat gastric mucosal cells. **European Journal of Pharmacology**, 360 (2-3): 273-280, 1998.

INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W. (eds.). **The pharmacological basis of therapeutics**. (9 ed.). New York: Mc Graw-Hill, p. 617-657, 1996.

JANG, T.J.; JUNG, K.H.; CHOI, E.A. Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer. **International Journal of Cancer**, 118 (6): 1356-1363, 2006.

KAFER, E. An 8 - chromosome map of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, 9:105-145, 1958.

KANESHIMA, E.N.; CASTRO-PRADO, M.A.A. Benznidazole-induced genotoxicity in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100 (3): 325-329, 2005.

KIM, T.I.; JIN, S.H.; KIM, W.H.; KANG, E.H.; CHOI, K.Y.; KIM, H.J.; SHIN, S.K.; KANG, J.K. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. **International Journal Colorectal Diseases**, 16 (3): 167-173, 2001.

KINSELLA, A.R. AND RADMAN, M. Tumor promoter induces sister chromatid exchanges: relevance to mechanisms of carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 75 (12): 6149-6153, 1978.

KRUH, G.D.; GAUGHAN, K.T.; GODWIN, A.; CHAN, A. Expression pattern of MRP in human tissues and adult solid tumor cell lines. **Journal National Cancer Institute**, 87 (16): 1256-1258, 1995.

KULKARNI, S.K.; JAIN, N.K.; SINGH, A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, 22 (5): 291-298, 2000.

LASKO, D.; CAVENEE, W.; NORDENSKJOLD, M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. **Annual Reviews Genetics**, 25: 281-314, 1991.

MATSUHASHI, N.; NAKAJIMA, A.; FUKUSHIMA, F.; YAZAKI, Y.; OKA, T. Effects of sulindac on sporadic colorectal adenomatous polyps. **Gut**, 40 (3): 344-349, 1997.

MARKS, F.; MÜLLER-DECKER, K.; FÜRSTENBERGER, G. A causal relationship between unscheduled eicosanoid signaling and tumor development: cancer chemoprevention by inhibitors of arachidonic acid metabolism. **Toxicology**, 153 (1-3): 11- 26, 2000.

NOWELL, P. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, 194: 23-28, 1976.

OSMAN, F.; TOMSETT, B.; STRIKE, P. The isolation of mutagen-sensitive *nuv* mutants of *Aspergillus nidulans* and their effects on mitotic recombination. **Genetics**, 134: 445-454, 1993.

PASRICHA, P.J.; BEDI, A.; O'CONNOR, K.; RASHID, A.; AKHTAR, A.J.; ZAHURAK, M.L.; PIANTADOSI, S.; HAMILTON, S.R.; GIARDIELLO, F.M. The effects of sulindac on colorectal proliferation and apoptosis in familial adenomatous polyposis. **Gastroenterology**, 109 (3): 994-998, 1995.

PIAZZA, G.A.; RAHM, A.L.; KRUTZSCH, M.; SPERL, G.; PARANKA, N.S., GROSS P.H.; BRENDEL, K.; BURT, R.W.; ALBERTS, D.S.; PAMUKCU, R. Antineoplastic drugs sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. **Cancer Research**, 55: 3110-3116, 1995.

PIRES, L.T.A.; ZUCCHI, T.M.A.D. A new method to detect potencial genotoxic agents using mitotic crossing over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal Genetics**, 17: 371-376, 1994.

PONTECORVO, G.; KAFER, E. Genetic analysis based on mitotic recombination. **Genetics**, 9: 71-104, 1958.

QIAO, L.; SHIFF, S.J.; RIGAS, B. Sulindac sulfide induces several subpopulations of colon cancer cells, defined by PCNA/Ki-67 and DNA strand breaks. **Biochimica of Biophysica Acta**, 1359: 222-232, 1997.

RAPER, J.R. Heterokaryosis and sexuality in fungi. **New York Academy Science**, 17: 627-635, 1955.

RICE, P.L.; WASHINGTON, M.; SCHLEMAN, S.; BEARD, K.S.; DRIGGERS, L.J.; AHNEN, D.J. Sulindac sulfide inhibits epidermal growth factor-induced phosphorylation of extracellular-regulated kinase $\frac{1}{2}$ and bad in human colon cancer cells. **Cancer Research**, 63: 616-620, 2003.

ROBERTS II, L.J.; E MORROW, J.D. Analgésicos - Antipiréticos, Agentes Antinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E. (eds.). **As bases farmacológicas da Terapêutica**. (10 ed.). Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, p.517-566, 2003.

ROBERTSON, F.M.; PARRETT, M.L.; JOARDER, F.S.; ROSS, M.; ABOU-ISSA, H.M.; AKHAFIE, G.; HARRIS, R.E. Ibuprofen-induced inhibition of cyclooxygenase isoform gene expression and regression of rat mammary carcinomas. **Cancer Letters**, 122 (1-2): 165-175, 1998.

ROPER, J.A. Production of heterozygous in filamentous fungi. **Experientia**, 8: 14-15, 1952.

SHIFF, S.J.; QIAO, L.; TSAI, L.L.; RIGAS, B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. **Journal of Clinical Investigation**, 96: 491-503, 1995.

SHIFF, S.J.; KOUTSOS, M.I.; QIAO, L.; RIGAS, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. **Experimental Cell Research**, 222(1):179-188, 1996.

SHUBIK, P. Reflection on the implication of multistage carcinogenesis for the nature of neoplasia. **Food and Chemical Toxicology**, 40: 739-742, 2002.

SORIANO, A.F.; HELFRICH, B.; CHAN, D.C.; HEASLEY, L.E.; BUNNJR, P.A.; CHOU, T.C. Synergistic effects of new chemopreventive agents and conventional cytotoxic agents against human lung cancer cell lines. **Cancer Research**, 59: 6178-6184, 1999.

SOUZA - JUNIOR, S.A.; CASTRO - PRADO, M.A.A. Chlorhexidine digluconate induces mitotic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Oral Diseases**, 11: 146-150, 2005.

STERM, C. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, 21: 625-730, 1936.

STRONG, H.A.; WARNER, N.J.; RENWICK, A.G.; GEORGE, C.F. Sulindac metabolism the importance of an intact colon. **Clinic Pharmacology Therapeuty**, 38 (4): 387-393, 1985.

TEIXEIRA, M.J.; BIELA, L.; TEIXEIRA, W.G.J.; ANDRADE, D.C.A. Tratamento farmacológico da dor músculo-esquelética. Dor músculo-esquelética. Edição especial. **Revista de Medicina (USP)**, 80: 179-244, 2001.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**; 38: 97-120, 1998.

ZIMMERMANN, F.K.; SCHWAIER, R.; LAER, U. Mitotic recombination induced in *Saccharomyces cerevisiae* with nitrous acid, diethylsulfate and carcinogenic, alkylating nitrosamides. **Zeitschrift Für Vererbungslehre**, 98: 230-246, 1966.

ZIMMERMANN, F.K. Genetics aspects of carcinogenesis. **Biochemical Pharmacology**, 20: 985-995, 1971.

7. APÊNDICE

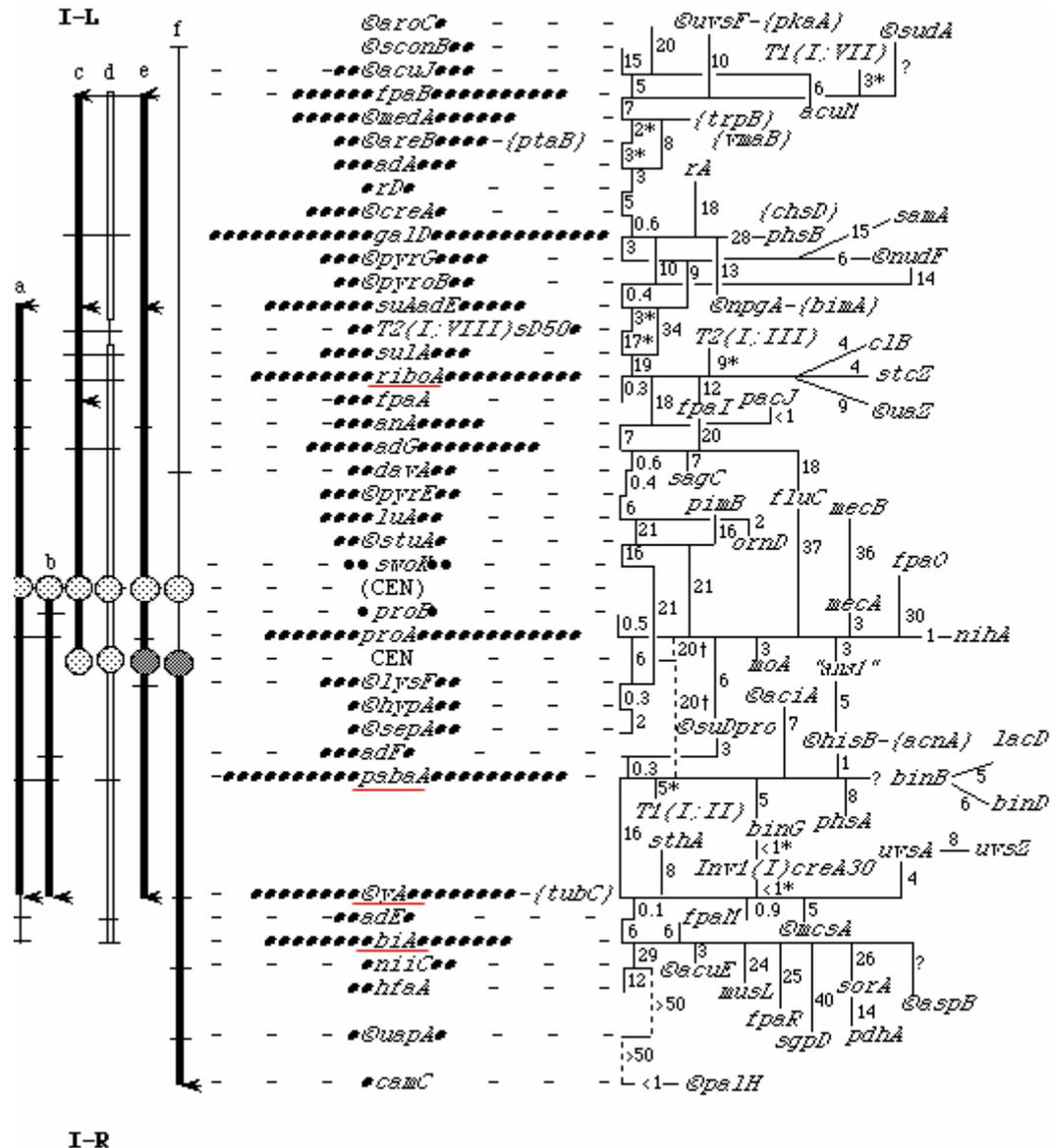


Figura 15. Esquema do cromossomo I de *A. nidulans* e seus respectivos loci. I-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo I; I-R, genes localizados no braço direito do cromossomo I. Adaptado de: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>.

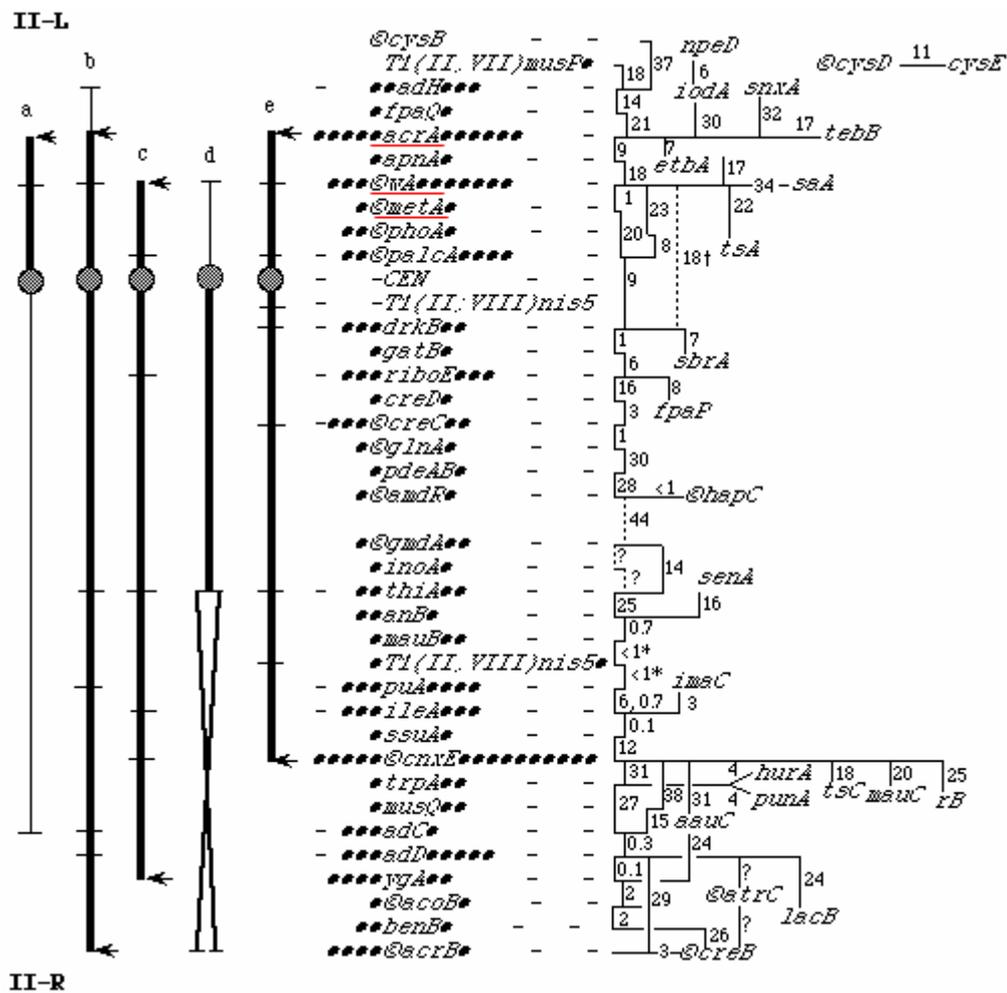


Figura 16. Esquema do cromossomo II de *A. nidulans* e seus respectivos loci. II-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo II; II-R, genes localizados no braço direito do cromossomo II. Adaptado de: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>.

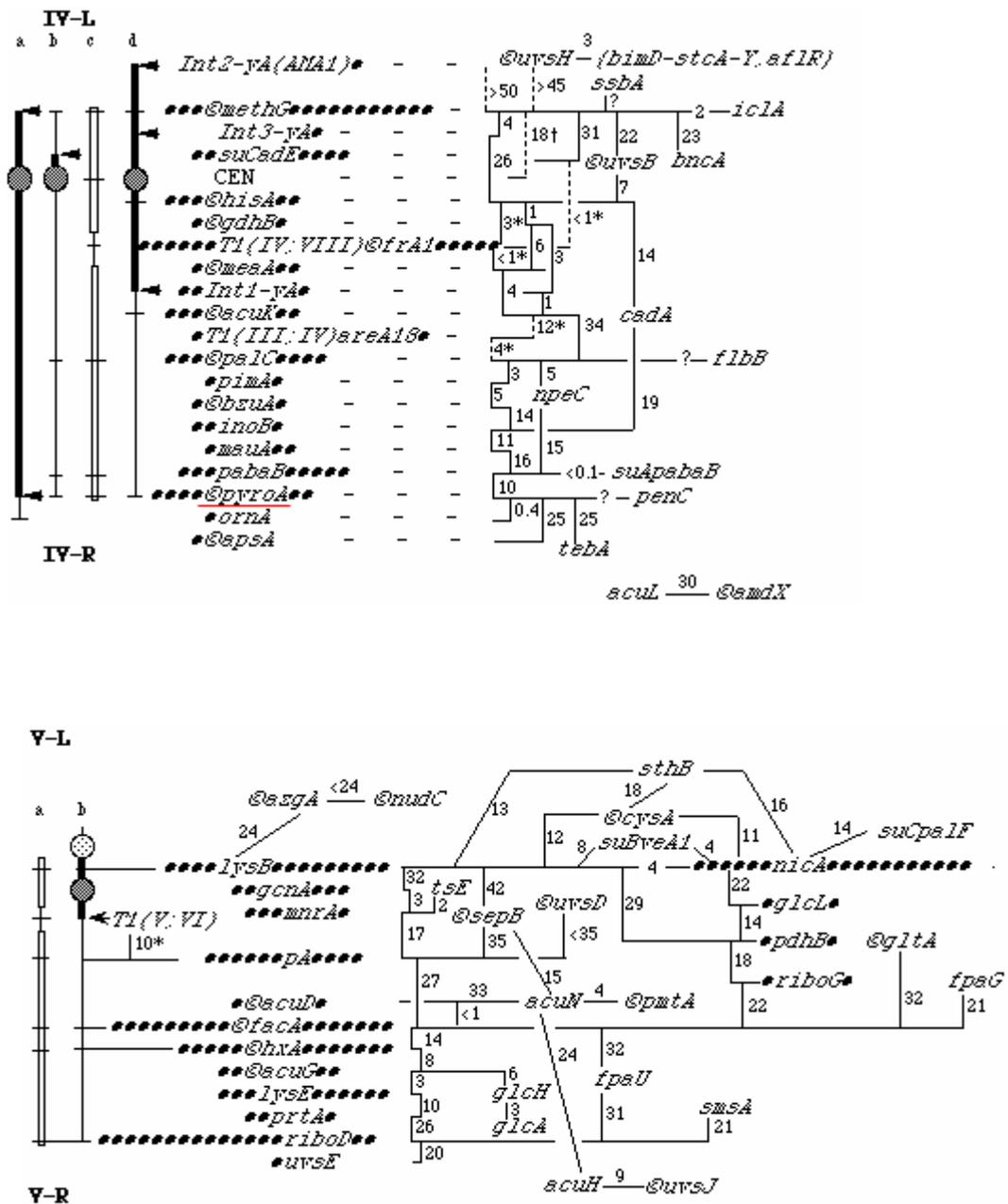


Figura 18. Esquema dos cromossomos IV e V de *A. nidulans* e seus respectivos *loci*. IV-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo IV; IV-R, genes localizados no braço direito do cromossomo IV, V-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo V, V-R, genes localizados no braço direito do cromossomo V. Adaptado de: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>.

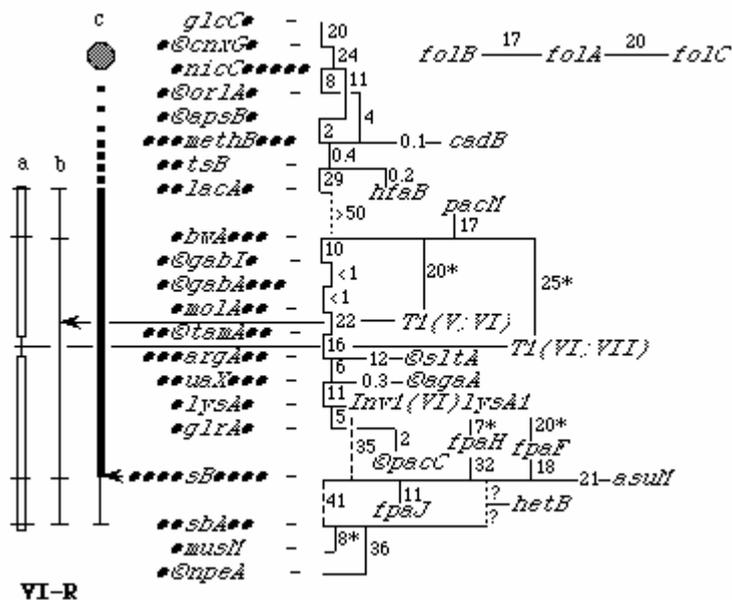


Figura 19. Esquema do cromossomo VI de *A. nidulans* com seus respectivos *loci*. VI-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo VI; VI-R, genes localizados no braço direito do cromossomo VI. Extraído de: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>.

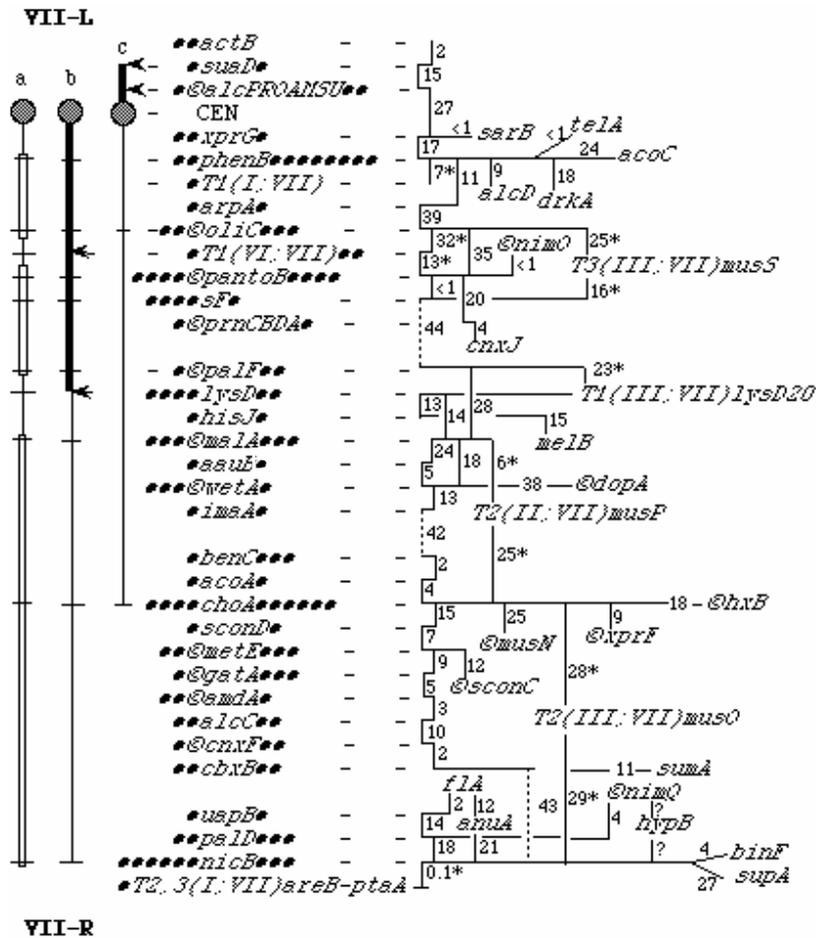


Figura 20. Esquema do cromossomo e VII de *A. nidulans* com seus respectivos *loci*. VII-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo VII, VII-R, genes localizados no braço direito do cromossomo VII. Extraído de: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>.

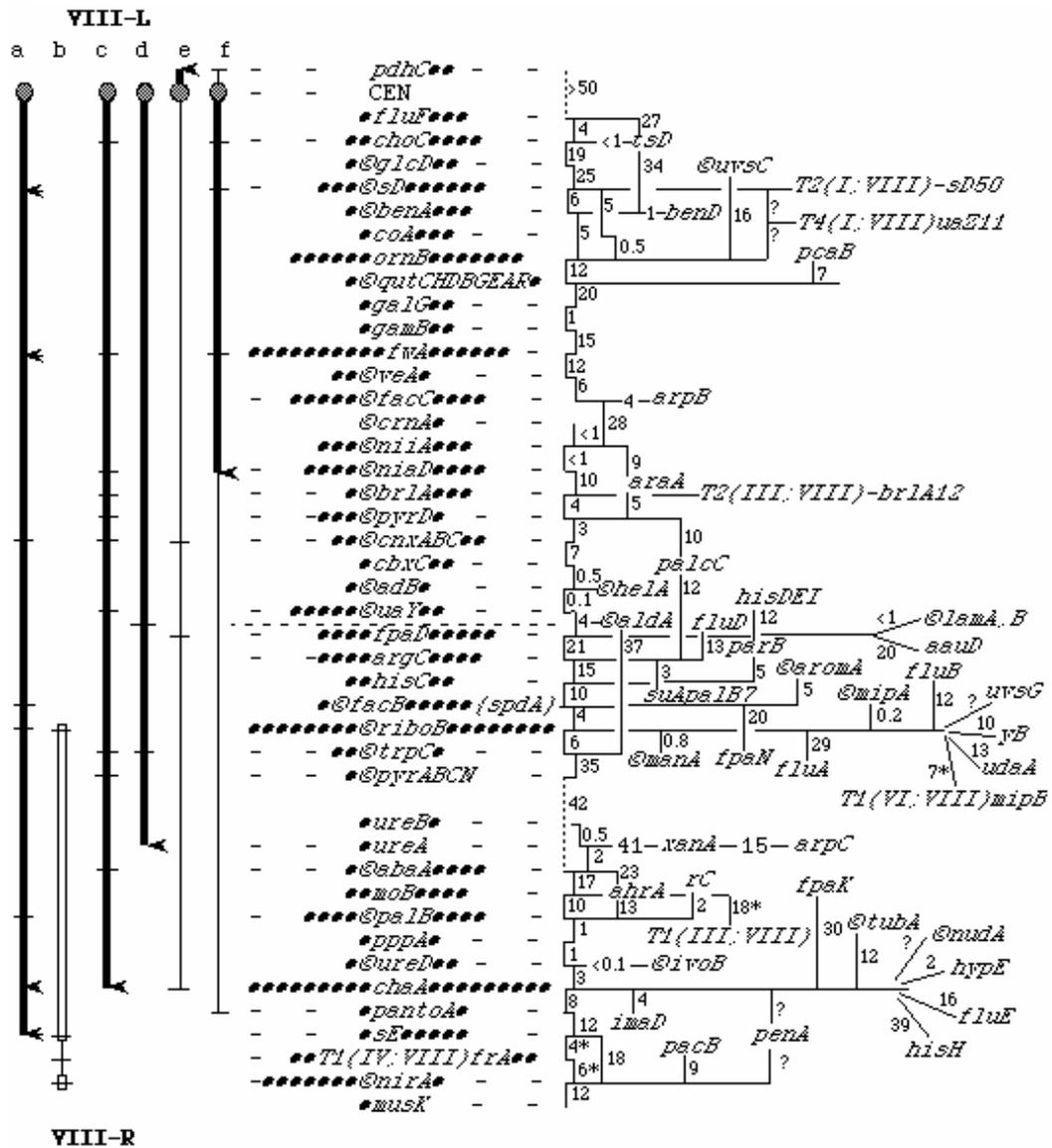


Figura 21. Esquema do cromossomo VIII de *A. nidulans* e seus respectivos loci, VIII-L, genes localizados no braço esquerdo do cromossomo VIII; VIII-R, genes localizados no braço direito do cromossomo VIII. Extraído de: <http://www.gla.ac.uk/Acad/IBLS/molgen/Aspergillus/maps.html>.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)