

1- INTRODUÇÃO

1.1- Agentes antifúngicos e resistência

O uso constante e inadequado de antimicóticos e inibidores celulares em geral, tem levado à seleção de isolados resistentes, tornando estas drogas ineficientes. Isto tem acontecido com mais frequência nas últimas décadas, principalmente em pacientes imunocomprometidos pela infecção com o vírus da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), pela quimioterapia de pacientes com câncer ou nos transplantados (Georapadokou e Walsh, 1994). Estes fatos têm levado a Indústria Farmacêutica a investir em novas drogas. Porém, o desenvolvimento de antimicóticos específicos para o patógeno constitui-se num desafio científico, pois os fungos e seus hospedeiros são organismos eucariotos e portanto, possuem várias vias metabólicas e estruturas celulares comuns. Desta forma, o estudo dos mecanismos genéticos que levam à resistência a um antimicótico é fundamental para a adequada utilização desta droga, pois elas vêm sendo a forma de intervenção terapêutica mais amplamente usada no combate à infecções.

Os três principais grupos de antifúngicos de uso clínico são: os antibióticos polienos, os derivados azólicos e os alilaminas/tiocarbamatos. Todos interagem com ou inibem o ergosterol, principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos (Georapadokou e Walsh, 1994). A Figura 1 mostra a via da síntese do ergosterol e as etapas desta via que são afetadas por estes inibidores.

Os polienos ligam-se ao esterol da membrana causando um aumento na permeabilidade da membrana, levando à perda de componentes citoplasmáticos e conseqüentemente à morte celular. Os inibidores desta classe têm maior afinidade pelo ergosterol que pelo seu correspondente na espécie humana, o colesterol, viabilizando assim seu uso clínico.

Os compostos azólicos são completamente sintéticos e atuam primariamente na biossíntese do ergosterol no passo da demetilação C-14, uma reação dependente do citocromo P-450. Este é o mecanismo de ação do antimicótico tioconazol indicado na Figura 1, cuja estrutura química está

representada na Figura 2.

Tanto as alilaminas quanto os tiocarbamatos inibem a esqualeno epoxidase, que juntamente com a oxidoesqualeno ciclase transformam o esqualeno em lanosterol. A terbinafina, indicada na Figura 1 e representada na Figura 2, é uma alilamina que exemplifica antifúngicos que atuam neste passo metabólico.

O ergosterol é necessário na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana (Kelly *et al.*, 1990), garantindo a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática (Aoki *et al.*, 1993). A ausência do ergosterol e o acúmulo de seus precursores afetam a estrutura da membrana plasmática e a absorção de vários nutrientes, tornando o fungo vulnerável a danos (Gupta *et al.*, 1994,1997; Georppadokou e Walsh, 1994, 1996).

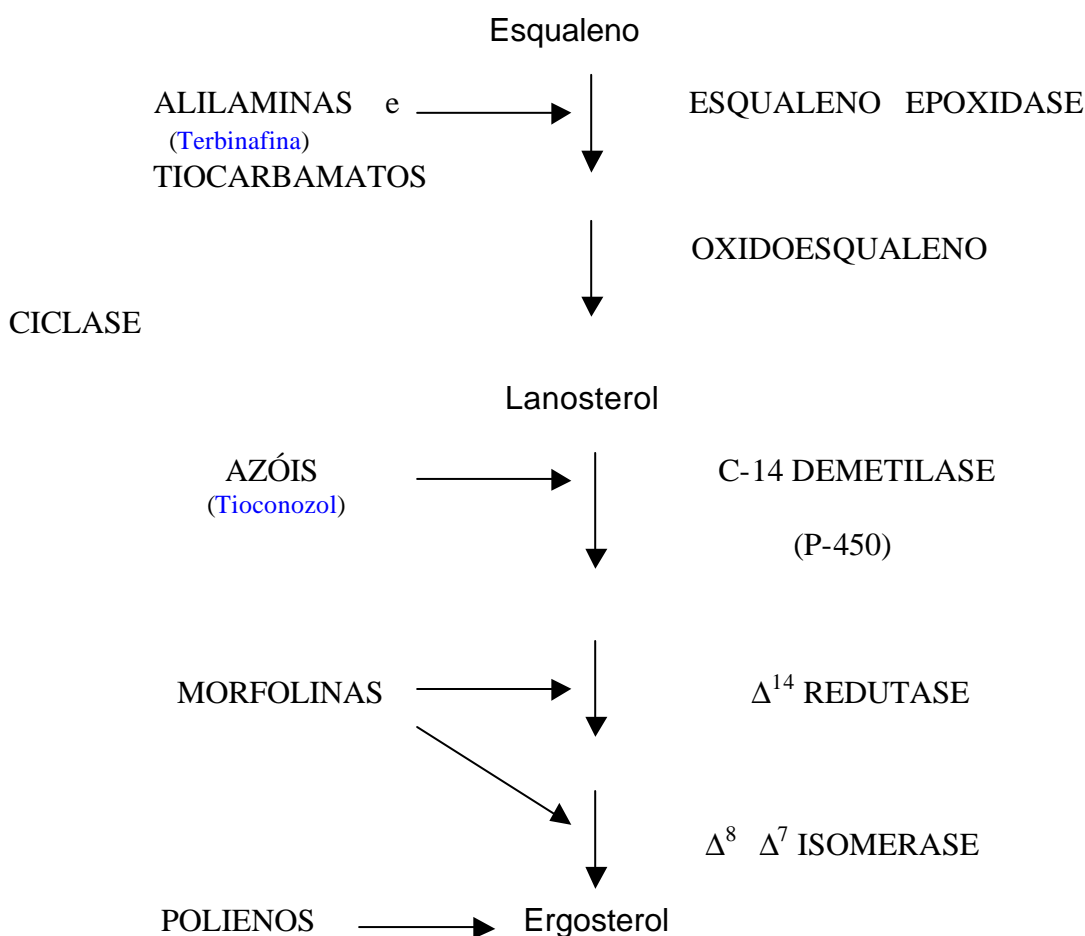


Figura 1 Via de síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores.

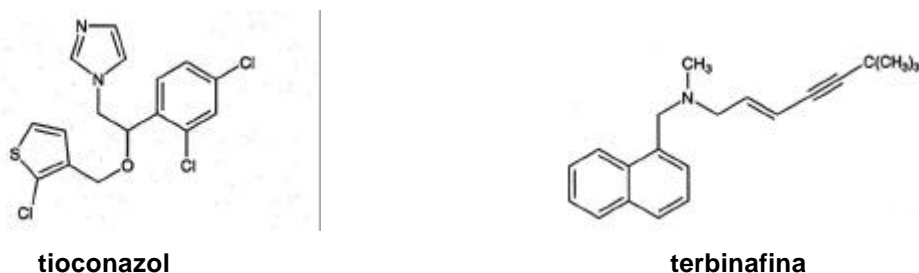


Figura 2 - Estrutura química dos antifúngicos tioconazol e terbinafina

A acriflavina, denominada quimicamente de diaminoacridina (“3,6-diamino-10-methyacrídium chloride”) (Figura 3), pertence a família das acridinas, que são derivadas do composto antraceno. Ela foi primeiramente isolada do carvão de alcatrão (Pons *et al.*, 2001).

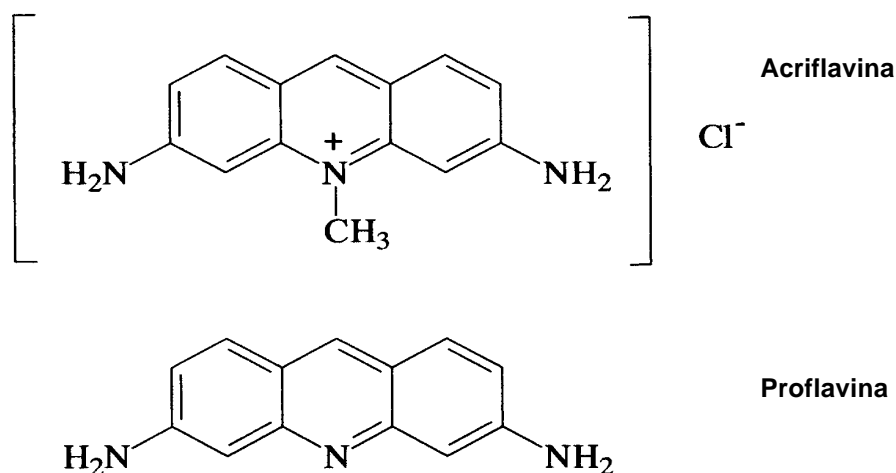


Figura 3 - Estrutura química da acriflavina e proflavina (ACF) (Choi *et al.*, 2000)

A acriflavina está sendo utilizada nos tratamentos das infecções microbianas em humanos e peixes (Yu *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2000). Seu mecanismo de ação na célula hospedeira envolve a inibição de um lipopolissacarídeo (LSP)-indutor da atividade do fator de transcrição nuclear conhecido como NF- κ B, associados com a resposta inflamatória. A acriflavina como inibidor do LSP-indutor age como um agente anti-

inflamatório (Choi *et al.*, 2000). Ela também está sendo usada como antibactericida, antiséptico e inibidor, como citado acima (Pons *et al.*, 2001). Ela está disponibilizada comercialmente com o nome de acriflavina (ACF), e compõe-se de uma mistura 1:1 de acriflavina e proflavina (3,6-diamino acridina) (Figura 3) (Pons *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2000).

Sabe-se também que a acriflavina pode perturbar a bicamada lipídica e conseqüentemente inibindo a atividade de certas enzimas (Roth *et al.*, 1967), inclusive a proteína quinase C (PKC) (Hannun e Bell, 1988; Kim *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2000). Ela pode ligar-se na membrana celular e nuclear, que proporcionam sítios de ligação a esta droga, devido a uma interação com substâncias polianiônicas (Ferey *et al.*, 1986). Este mesmo efeito da acriflavina sobre a atividade da PKC “*in vitro*” foi também observado “*in vivo*” em células de ratos e macrófagos (Choi *et al.*, 2000). Alteração na atividade da PKC através da modulação da integridade da membrana celular, pode ser um valioso instrumento no estudo dos componentes envolvidos com os sinais da via de transdução na ativação ou inativação da transcrição gênica (Kim *et al.*, 1998).

Kim e colaboradores (1998) relataram que a acriflavina (ACF) possui efeito contra a proliferação de células tumorais. Este efeito antitumoral parece ser devido à obstrução da membrana plasmática (Ferey *et al.*, 1986) e do funcionamento de proteínas que se movimentam através dela, e também à perturbação da via de sinalização e/ou alteração do transporte nutricional (Kim *et al.*, 1998).

Pallares e colaboradores (2000) discutem que a proteína quinase C (PKC) é essencial para o mecanismo de MDR (múltipla resistência à droga) em células tumorais. O fenômeno de MDR foi identificado, pela primeira vez, em linhagens de células tumorais, em pacientes com câncer tratados com drogas antitumorais. Um aumento da expressão transcricional de uma proteína de membrana denominada de glicoproteína P, que funciona como uma bomba de efluxo de drogas dependentes de ATP, foi observado nestas células. Devido a este mecanismo de efluxo observa-se um menor acúmulo das drogas citotóxicas no interior destas células (Bradley *et al.*,

1988). A glicoproteína P pertence a uma grande família de bombas de efluxo de ATPase de membranas presente em organismos eucariotos e procariotos (Neyfakh *et al.*,1991).

A glicoproteína P é fosforilada pela PKC e o bloqueio desta fosforilação acarreta um aumento no acúmulo de droga. Esta observação sugere que a fosforilação da glicoproteína P estimula o transporte de droga. Todavia, o mecanismo de inibição da glicoproteína P associado ao transporte de drogas através do bloqueio da PKC e a função desta fosforilação pela PKC na regulação da glicoproteína continua ainda não esclarecidos. A PKC parece estar relacionada com os sinais da via de transdução na regulação da glicoproteína P mediando assim o transporte de drogas (Castro *et al.*,1999).

Estudos de células MDR, células que apresentam mecanismos típicos de resistência a múltiplas drogas, têm sido uma fonte valiosa de informações sobre este mecanismo de resistência. No entanto, nestas células foi observado que o composto diacilglicerol (DG) foi fisiologicamente ativado por uma PKC, sugerindo que o DG possa estar envolvido não somente na ativação do transporte, como também na expressão do gene *mdr1* (gene que codifica uma glicoproteína P), e na redução do influxo de drogas (Fan *et al.*, 1992; Pallares *et al.*, 2000). Duas fosfolipases estão diretamente ou indiretamente envolvidas na produção do diacilglicerol (DG) pela ativação da PKC em células MDR (Yang *et al.*,1997; Pallares *et al.*, 2000).

Além disto, devido à sua estrutura química com anéis hidrofóbicos, as acridinas, como a acriflavina e o brometo de etídeo (Figuras 3 e 4), podem se inserir entre os pares de bases na dupla hélice de ácidos nucléicos. Estes intercalantes podem entrar na célula e interferir em vários processos como replicação, tradução, recombinação, processamento do RNA e formação do Z-DNA (Walker *et al.*,1985; Hardin *et al.*,1988). É pouco conhecido o mecanismo pelo qual estes agentes causam cura plasmidial ou rearranjo do DNA cromossomal. Finalmente estes intercalantes causam a

morte celular, mas é desconhecido se este processo ocorre devido a mutagenicidade ou a outros efeitos tóxicos (Lee *et al.*, 1996).

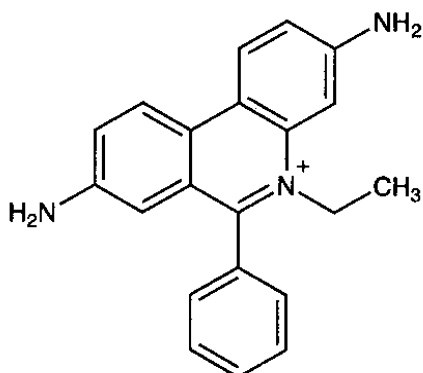


Figura 4 – Estrutura química do brometo de etídio

Mutação no gene *acrA* de *Aspergillus nidulans* foi descrita inicialmente como responsável pela resistência à acriflavina e foi mapeado no cromossomo II, tendo o caráter do tipo semidominante (Roper e Käfer, 1957). Posteriormente, verificou-se que a mutação *acrA1* era também responsável pela resistência ao brometo de etídio (Scarazzatti *et al.*, 1979) e ao antimicótico tioconazol (Pereira *et al.*, 1998). Dois outros genes, também no cromossomo II de *A. nidulans*, foram descritos como responsáveis por resistência à acriflavina e ao brometo de etídio neste fungo (Roper e Käfer, 1957; Scarazzatti *et al.*, 1979). As mutações descritas em ambos trabalhos tornaram o fungo menos resistente à acriflavina que o alelo *acrA1*. Duas linhagens do fungo *Trichophyton rubrum* resistentes ao tioconazol, obtidas após tratamento mutagênico, tornaram-se simultaneamente resistentes à acriflavina e ao brometo de etídio, sugerindo a existência de um mecanismo de resistência a estes inibidores semelhante aquele observado para os mutantes de *A. nidulans* (Pereira *et al.*, 1998).

Aparentemente o tioconazol e os derivados de acridina (acriflavina e brometo de etídio) não têm os mesmos mecanismos de ação e portanto, um plausível mecanismo de resistência à estas drogas proporcionado pelo alelo *acrA1* seria a ocorrência de alterações na permeabilidade da

membrana celular. Estas alterações podem interferir na captação da droga (Hitchcock *et al.*,1987) ou no seu efluxo (Vanden Bosshe *et al.*,1990). Exemplos deste último mecanismo são aqueles já mencionados resultantes da ação de transportadores de múltiplas drogas (Sanglard *et al.*,1995, 1996, 1997; Clark *et al.*,1996; Ryder, 1992 e Ryder *et al.*,1997, 1998). Além disso, um alelo mutante que confere resistência à acriflavina e simultaneamente promove resistência a um azol (3-amino-1,2,4-triazol) foi descrito em *Neurospora crassa* (Akiama e Nakashima, 1996). Este gene codifica uma proteína que contém 595 resíduos de aminoácidos, com um domínio putativo "zinc finger" Zn(II)Cys6 e uma região rica em serina/treonina próximo ao amino-terminal (Akiyama e Nakashima, 1996). Os genes *PDR1* e *PDR3* de *Saccharomices cerevisiae* também codificam uma proteína com "motif" Zn(II)Cys6 "zinc finger" e estas proteínas regulam a expressão do gene *PDR5*, que codifica um transportador acoplado à membrana celular (Katzmann *et al.*, 1994; Akiyama e Nakashima, 1996).

Os genes *ebrA* e *ebrB*, que conferem resistência à acriflavina e ao brometo de etídio em *Bacillus subtilis*, foram clonados e a análise de suas seqüências mostraram uma similaridade com a família de bomba de efluxo multidroga conhecida como SMR ("Small Multidrug Resistance"). Nem *ebrA* nem *ebrB* separadamente foram capazes de fornecer resistência a estas drogas, mas quando a linhagem receptora foi transformada com ambos plasmídios simultaneamente ela se tornou resistente. Portanto, os genes *ebrA* e *ebrB* são dois novos componentes da bomba de efluxo da família acima relatada (Masaoka *et al.*, 2000).

A proteína AtrBp de *A. nidulans* foi funcionalmente caracterizada como sendo um transportador do tipo ABC ("ATP-Binding Cassette"), um transportador multidrogas que possui afinidade por substratos de uma grande classe de fungicida agrícola e alguns compostos tóxicos naturais. Além destes compostos, foram identificados outros compostos como os azoles e a acriflavina, com os quais esta proteína demonstrou ter também afinidade (Andrade *et al.*, 2000). Os transportadores do tipo ABC ou ATPases tráficas geralmente são proteínas que estão localizadas na

membrana plasmática, membranas intracelulares e incluem tanto sistemas de efluxo como de influxo (Van Veen e Konings, 1998)

1.2 - Modelo experimental utilizado

Os fungos e as leveduras são organismos eucariotos, caracterizados por uma ampla diversidade morfológica e fisiológica. Muitos deles encontram aplicação industrial na síntese de enzimas, ácidos, antibióticos, produção de alimentos e outros produtos (*Saccharomyces* e *Penicillium*), e também em processos de biorremediação (*Phanerochaete*), enquanto outros têm importância na área biomédica (*Trichophyton*).

Os fungos filamentosos apresentam crescimento apical na forma de hifas, são heterótrofos e se reproduzem por esporos. Dentre os ascomicetos, o gênero *Aspergillus* é um dos mais estudados, e a espécie *A. nidulans*, por ser bem caracterizada do ponto de vista genético e bioquímico (Martinelli e Kinghorn, 1994), é com frequência o modelo escolhido para os estudos de mecanismos envolvidos em processos de divisão e diferenciação celulares e regulação da expressão gênica em fungos.

A. nidulans apresenta uma grande versatilidade fisiológica, sendo capaz de crescer em condições de cultura variáveis e suportar grandes flutuações dos fatores ambientais, como temperatura, fonte de carbono, osmolaridade, força iônica e pH (Rossi e Arst, 1990). Foi classificado por Beever e Laracy (1986) como um microrganismo xerotolerante, com base na escala definida por Griffin (1981).

Além disto, ele possui várias vantagens para este tipo de estudo como segue: é geneticamente caracterizado com mais de 200 *loci* gênicos mapeados, possui um genoma pequeno e haplóide, um sistema genético bem definido e caracterizado por vários marcadores de resistência e nutricionais, requerimento nutricional simples, cresce em meios quimicamente definidos, ciclo de vida curto, várias ferramentas moleculares disponíveis, como vetores de clonagem e de expressão, coleção de ESTs, bibliotecas gênicas e um projeto genoma piloto. Protoplastos obtidos através

da remoção da parede celular do fungo contribuem significativamente no aumento da frequência de transformação *in vitro*, uma técnica imprescindível para clonagem por transformação ou ganho de função. Estas vantagens o faz um organismo de fácil manipulação para os estudos de genética clássica (Pontecorvo *et al.*, 1953), bem como para a aplicação das novas tecnologias da genética molecular (Timberlake e Marshall, 1988).

1.3 - Objetivos e Justificativa

A humanidade tem aumentado drasticamente o uso de antibióticos, antifúngicos, inseticidas, herbicidas e agentes quimioterápicos para tratar infecções, câncer e obter ganho econômico com a produção agrícola e industrial. O repetido uso destas substâncias leva frequentemente à sua ineficiência devido ao surgimento ou seleção de organismos resistentes ou tolerantes, com graves consequências econômicas e sociais. Vários mecanismos de resistência à drogas em microrganismos já foram descritos revelando uma complexidade e uma inter-relação entre estes sistemas.

Diferentes tipos de mecanismos bioquímicos contribuem para o fenótipo de resistência à drogas em eucariotos. Os mais frequentes destes mecanismos incluem a redução da captação ou o aumento do efluxo celular, modificação ou degradação da droga dentro da célula, mudanças na interação da droga com o sítio alvo ou ainda a alteração de outras enzimas na mesma via enzimática (Tabela 1).

Do ponto de vista molecular essas alterações bioquímicas podem resultar de uma amplificação, transferência e deleção gênica, mutações pontuais, perda de elementos regulatórios de ação cis-trans, ativação transcricional e hipo ou hiper-metilação. Todos estes efeitos podem ser em genes diretamente envolvidos no combate ao composto citotóxico e/ou em genes envolvidos na sua regulação ou processamento (Vanden Bossche *et al.*, 1998). No entanto, outros mecanismos moleculares também podem estar envolvidos na resistência a agentes inibidores, além da possibilidade da ocorrência de variações específicas dos mecanismos já descritos.

Tabela 1. Potenciais mecanismos moleculares de resistência a antifúngicos

<i>Alterações no processamento intracelular do antifúngico</i>
Modificação
Degradação
<i>Alterações da enzima alvo</i>
Mutação pontual
Superexpressão
Amplificação gênica
Conversão gênica ou recombinação mitótica
<i>Alterações de outras enzimas na via da biossíntese do ergosterol</i>
<i>Bombas de efluxo</i>
Transportadores ABC
"Major" Facilitadores

White *et al.* (1998)

O objetivo principal deste projeto foi contribuir para o entendimento das bases moleculares envolvidas nas respostas adaptativas dos fungos, particularmente em presença de acriflavina, brometo de etídeo e tioconazol.

Para atingir este objetivo utilizamos as seguintes estratégias:

1. Construção de uma biblioteca genômica do fungo resistente a estes inibidores,
2. Clonagem, mapeamento físico, subclonagem e seqüenciamento do gene envolvido no fenômeno da resistência (alelo selvagem e mutante),
3. Análise da expressão do gene que confere a resistência em estudo,
4. Inativação do gene envolvido nesta resistência e análise do fenótipo do mutante nulo
5. Análise da expressão diferencial de genes do fungo *A. nidulans* submetido à acriflavina e ao brometo de etídeo,
6. Análise por genética clássica da possível interação entre os genes *tebA7* e *acrA1* de *A. nidulans*.