



O objetivo principal deste trabalho foi fornecer subsídios que pudessem contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência à acriflavina e outros agentes inibidores em fungos. Para isto clonamos, por transformação, um gene que confere esta resistência em *A. nidulans* e o caracterizamos molecularmente. O comportamento codominante do alelo mutante impossibilitou a utilização de uma biblioteca genômica disponível no nosso laboratório (Fungal Genetic Stock Center), o que nos levou à construção de uma biblioteca específica. Construímos esta biblioteca a partir de uma linhagem duplo resistente *acrA1 tebA7* denominada segregante 1 (Rocha *et al.*, 2002), obtida por cruzamento genético entre as linhagens de Terb7 e MSF.

Além do caráter codominante acima citado, optamos por construir a biblioteca genômica deste segregante 1 porque esta linhagem era portadora de duas mutações de interesse do nosso laboratório. Obtivemos um total de 17.856 clones recombinantes que constitui a biblioteca genômica do segregante 1 duplo resistente *acrA1 tebA7* (Figura 5). O tamanho molecular do genoma do *A. nidulans* é de 31Mb e a média do tamanho dos fragmentos clonados foi de 6,5Kb, sugerindo que temos 4 equivalentes genômicos do DNA de *A. nidulans* (Clarke e Carbon, 1976). Este resultado indicou que tínhamos uma biblioteca representativa, pois existia uma probabilidade de 98% do gene *acrA1* estar presente nesta biblioteca.

Esta biblioteca genômica foi construída no vetor integrativo pRG4 (este vetor contém o gene *pyr4<sup>+</sup>* de *N. crassa* que complementa a mutação *pyrG89* em *A. nidulans*). Vetores transformantes (integrativos) geralmente se inserem ao genoma por recombinação homóloga em *A. nidulans*. Embora o gene *pyr4<sup>+</sup>* complemente a mutação *pyrG89*, a identidade entre as suas seqüência é pequena o bastante para não permitir o pareamento entre estes genes (Oakley *et al.*, 1987). Isto facilita e aumenta a chance de integração entre os alelos resistente e sensível à acriflavina devido a alta homologia existente entre eles.

Utilizamos a linhagem GR5 de *A. nidulans*, sensível à acriflavina e ao tioconazol, como receptora nos experimentos de transformação. Primeiramente, definimos os CIMs (Concentração Inibitória Mínima) do tioconazol, da acriflavina e terbinafina para os conídios e protoplastos (Tabela 5, 6 e 7) da linhagem sensível (GR5) e das resistentes (MSF e segregante 1) de *A. nidulans*. Estes dados foram necessários para estimar a concentração ideal da droga inibidora que foi utilizada nos experimentos de transformação no fungo.

A partir da análise dos resultados obtidos, optamos por utilizar a acriflavina como agente seletivo, pois a diferença de sensibilidade dos protoplastos entre as linhagens sensíveis e resistentes a esta droga foi bastante significativa (Tabela 6), o que facilitou a seleção dos transformantes. Esta diferença de sensibilidade praticamente não existiu quando os mesmos protoplastos de linhagens sensíveis e resistentes foram submetidos ao tioconazol (Tabela 5). É provável que o próprio meio de cultura com alta osmolaridade esteja homogenizando a resposta das linhagens ao tioconazol, interferindo no efeito da mutação.

Além disso, a presença da parede celular deve também estar conferindo aos conídios uma maior resistência ao tioconazol, sugerindo que ela possa representar uma importante barreira natural de resistência a este antifúngico, pois os protoplastos se revelaram muito mais sensível ao tioconazol que os conídios. Este mesmo efeito não foi observado com a droga terbinafina, ressaltando que ambas as drogas são inibidoras da biossíntese do ergosterol do fungo, e este é essencial na formação e manutenção da membrana celular.

Estes resultados mostraram que é essencial identificar a diferença de sensibilidade de conídios e protoplastos antes de iniciar qualquer experimento de transformação, quando o objetivo for clonar um gene de resistência a um inibidor.

Um clone denominado de C08 isolado desta biblioteca genômica do segregante 1 transformou a linhagem sensível em resistente à acriflavina numa frequência de 5 colônias transformantes por  $\mu\text{g}$  de DNA em meio

seletivo contendo acriflavina, e em ausência de uracila e uridina. No controle deste experimento, ou seja, o meio seletivo sem uracila, uridina e sem acriflavina foram obtidos 60 transformantes/ $\mu\text{g}$  de DNA. Esta diferença é esperada pois no primeiro caso são dois fatores seletivos e portanto dois genes que devem ser expressos simultaneamente nos protoplastos, ainda em regeneração para sobreviverem neste meio: o gene *pyrG89* e o alelo que confere resistência à acriflavina. Foi observado que os protoplastos de *A. nidulans* se regeneravam com dificuldade na presença de acriflavina. Esta mesma dificuldade foi relatada por Akiyama and Nakashima (1996) quando eles regeneraram esferoplasto (estrutura semelhante ao protoplasto de *A. nidulans*) em meio de cultura com acriflavina, e durante a seleção dos transformantes em *N. crassa*. Eles sugerem que esta dificuldade observada foi devido ao efeito da alta toxicidade da droga.

A seqüência de nucleotídeos de parte do clone C08 que foi capaz de transformar a linhagem sensível e receptora (GR5) de *A. nidulans* em resistente à acriflavina, bem como a do seu alelo sensível, foram processadas no programa “*phredPhrap*” e em seguida inseridas ao programa blastx onde revelaram similaridade significativa com as seguintes proteínas: “clock-controlled gene-9” de *N. crassa*; trealose fosforilase de *P. sajor-caju*; trealose sintase de *G. frondosa* e trealose sintase de *N. crassa* (Tabela 8). A melhor similaridade das seqüências de nucleotídeos do gene de resistência e a do seu alelo sensível com o banco de dados destas proteínas acima mencionadas foram obtidas utilizando-se os frames +1 e +3, isto indicou a presença de pelo menos 1 íntron no gene (Figura 16). Íntrons foram também verificados na trealose de *G. frondosa* (8 íntrons) (AB010104 número de acesso do GenBank) (Saito *et al.*, 1998) e no clock-controlled gene-9 protein (ccg-9) de *N. crassa* (2 íntrons) (AF088906 número de acesso do GenBank) (não publicado), mostrados na tabela 8.

O gene que expressa a trealose sintase em *S. cerevesiae* é essencial e não foi descrito em humanos. Portanto a trealose, sendo uma molécula específica de fungos, pode ser um alvo terapêutico no combate às

infecções fúngicas inviabilizando o patógeno e sem causar danos ao hospedeiro (Penna-Muralla *et al.*, 2002).

O alinhamento entre as seqüências das proteínas trealose fosforilase (*Pleurotus sajor-caju*) (750 aminoácidos), trealose sintase (*Grifola frondosa*) (731 aminoácidos), clock-controlled gene-9 protein (ccg-9) (*Neurospora crassa*) (728 aminoácidos) e com a seqüência do gene em estudo que confere resistência à acriflavina (697 aminoácidos) relevou a existência de regiões consenso (Figura 16), com resíduos conservados dos aminoácidos histidina (H) e aspartato (D), provavelmente envolvidos com o sítio de ligação ao substrato e com o sítio catalítico da própria enzima trealose sintase. Na trealose sintase (TreS) de *Thermus aquaticus* e *Pimetobacter sp*, também foram identificados resíduos conservados dos aminoácidos histidina e aspartato. Em *Thermus aquaticus* foi sugerido que as histidinas das posições 100 e 305 (His-100 e His-305) da proteína estão relacionadas com o sítio de ligação ao substrato e os aspartatos das posições 197 e 306 (Asp-197 e Asp-306) estão envolvidos com o sítio catalítico da enzima (Tsusaki *et al.*, 1996, 1997).

Outros aminoácidos tais como: serina (S), treonina (T), tirosina (Y) também são altamente conservados em algumas destas regiões consenso (Figura 16). Estes são geralmente alvos de fosforilação pelas proteínas quinases. Estas proteínas quinases podem catalisar a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para os resíduos específicos de serina e, mais raramente, de treonina ou tirosina, formando assim uma ligação éster fosfórico. Portanto, a fosforilação que é catalisada por uma proteína quinase pode atuar em algumas proteínas transformando-as de inativas em ativas ou vice-versa.

As próprias proteínas quinases estão sujeitas a regulação, podendo ser ativadas por mecanismos diversos, por exemplo através de AMP cíclico ou íons de cálcio. Baseando-se na presença de vários resíduos de serina e dos resíduos de treonina e tirosina identificados nas regiões de consenso do alinhamento de múltiplas seqüências (Figura 16) e da seqüência de aminoácidos da proteína do gene envolvido na resistência,

podemos sugerir que o gene que clonamos codifica uma proteína que participa na síntese de trealose e que está sujeita a regulação pela fosforilação por uma proteína quinase. Yuhong *et al.* (2002) relatou que a proteína caseína quinase II (CKII) fosforila a proteína FREQUENCY (FRQ) “clock” e que este evento representa um importante mecanismo da regulação do ciclo circadiano em *N. crassa* ( Yuhong *et al.*, 2002).

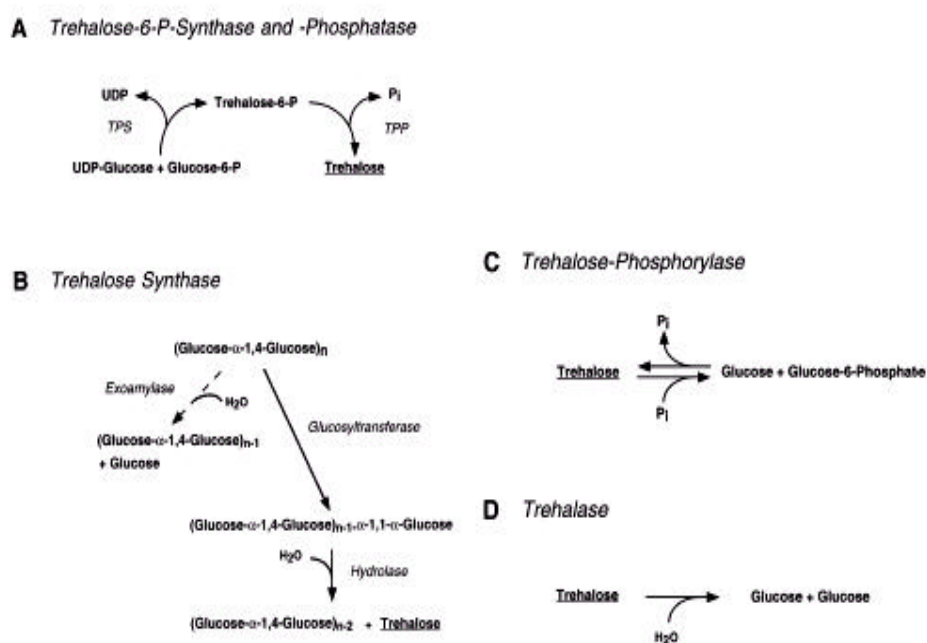
A maioria dos genes que regulam o ciclo circadiano são denominados de clock-controlled genes (ccgs) e estão envolvidos na regulação da formação dos conídios de *N. crassa* e outros com os processos de fotoindução e detoxificação (Bell-Pedersen *et al.*, 1996). Geralmente durante a formação dos conídios é observado um acúmulo de trealose em fungos (Thevelein, 1984).

A trealose é um dissacarídeo (“1- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1, 1- $\alpha$ -D-glucopyranoside”) (Thevelein, 1984; Stambuk *et al.*, 1998), não-redutor, utilizado como fonte de carbono, principalmente durante a germinação dos conídios em *A. nidulans* e durante a esporulação em *S. cerevisiae* (Thevelein, 1984; Fillinger *et al.*, 2001).

Um fato extremamente interessante relatado em fungos filamentosos, leveduras e bactérias foi o acúmulo de trealose em resposta a várias condições fisiológicas tais como: períodos de crescimento reduzido, principalmente durante o processo de diferenciação celular; períodos de jejum, principalmente em células dormentes, como conídios e esporos, durante o estresse oxidativo, térmico, escassez nutricional, presença de metanol e outros (Müller *et al.*, 1999; Fillinger *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2002).

O processo de síntese da trealose é menos conhecido que o processo de hidrólise, mas sabe-se que existe uma via de síntese que envolve dois passos. O primeiro é catalisado pela enzima trealose-6-fosfato sintase que leva à síntese de trealose-6-fosfato (Tre6P) através da transferência da unidade glicosil da UDPG para a glicose-6-fosfato (Figura 30). No segundo passo, a Tre6P é transformada em trealose e fosfato pela ação da trealose-6-fosfato fosforilase. Em *S. cerevisiae* a síntese de

trealose é realizada através de um complexo protéico multimérico codificada pelos genes *TSP1*, *TSP2*, *TSP3* e *TSL1*. No entanto, o mecanismo molecular da biossíntese da trealose não está bem elucidado (Plourde-Owobiet *et al.*, 2000). O blastp revelou que a proteína obtida tem um motivo de glycosyltransferase, trealose sintase e trealose fosforilase. As trealoses estão representadas na figura 16.



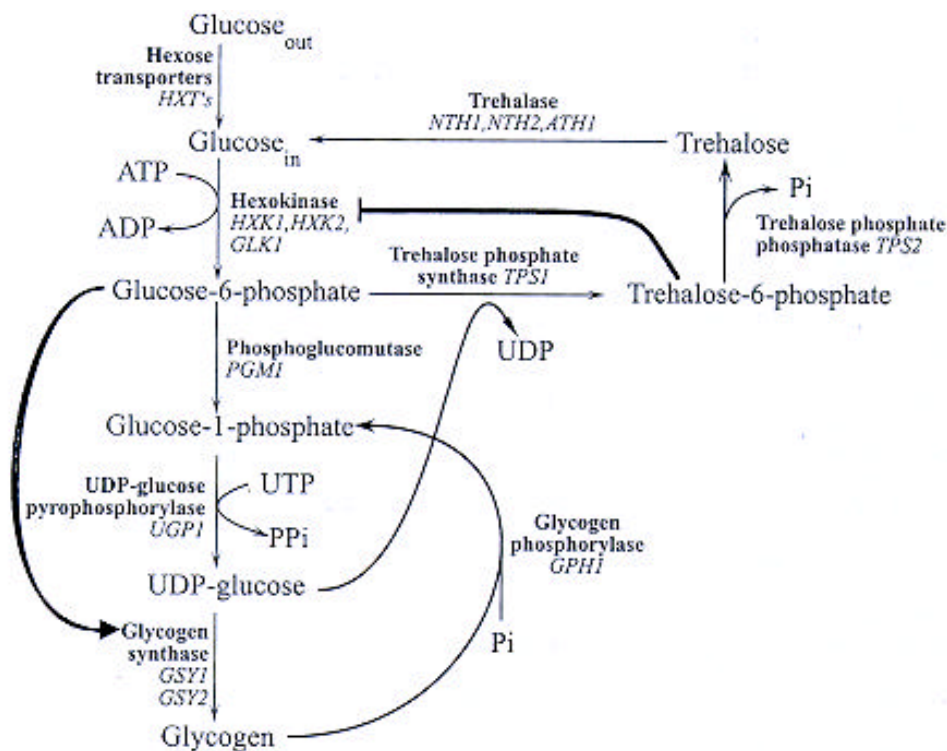
**Figura 30**– Via geral da biossíntese e de degradação da trealose. A Síntese da trealose catalisada pela trealose-6-fosfato sintase/fosfatase B- Síntese da trealose catalisada pela trealose sintase. C- Síntese e degradação da trealose catalisada pela trealose fosforilase. D- Degradação da trealose catalisada pela trealase.

Uma outra via de biossíntese da trealose a partir da  $\alpha$ -glicose-1-fosfato e D-glicose foi também relatada por Saito *et al.* (1998) em *G. frondosa*, e é catalisada pela enzima trealose sintase (TSase) (Figura 30 e

31). Além destas vias de síntese da trealose existe uma outra que catalisa a reação a partir da trealose fosforilase (Figura 30C).

A glicose que é utilizada durante a síntese da trealose é fosforilada por uma hexoquinase (Figura 31), que transfere o grupo fosfato terminal do ATP para a glicose convertendo-a em glicose-6-fosfato (ou glicose-1-fosfato). A fosforilação da glicose é regulada por uma proteína quinase. As proteínas quinases estão sujeitas a regulação podendo ser ativadas pelos níveis de AMP cíclico sinalizador.

A ativação da síntese do cAMP é também dependente da hexoquinase-mediada pela fosforilação da glicose, sugerindo assim que a glicose seja detectada extracelularmente pela Grp1 (um receptor ligado a proteína G (GPCR) e intracelularmente pela hexoquinase (Thevelein, 1994; Beullens *et al.*, 1988; Rolland *et al.*, 200; D'Souza e Heitman, 2001 ). Como a atividade da hexoquinase influencia na síntese do cAMP ainda não está estabelecido (Thevelein, 1996; D'Souza e Heitman, 2001).



**Figura 31-** Esquema geral da via metabólica da trealose e do glicogênio.



Foi observado em *S. cerevisiae*, em *A. nidulans* e em *A. niger*, que trealose-6-fosfato (T6P) é um potente inibidor da hexoquinase sugerindo assim que sua função está associada ao controle do fluxo glicolítico, principalmente no influxo da glicose nestas espécies (Panneman *et al.*, 1998; Blazquez *et al.*, 1993; Bonini *et al.*, 2000; Hohmann *et al.*, 1996; Ruijter *et al.*, 1996; Fillinger *et al.*, 2001).

Este resultado principalmente em *S. cerevisiae* sugere que a inibição da atividade da hexoquinase pela trealose-6-fosfato (T6P) é requerida para a indução do gene *MCK1* necessário para a esporulação das células de leveduras (De Silva-Udawatta *et al.*, 2001).

A acriflavina é um inibidor de proteínas quinases, principalmente a C (PKC), “*in vitro*” e “*in vivo*” (Akiyama e Nakashima, 1996; Hannun, Y. A. e Bell, R. M. 1998; Choi *et al.* 2000). É provável que a acriflavina esteja exercendo um papel semelhante da trealose-6-fosfato (T6P), que também inibe uma proteína quinase, a hexoquinase. A acriflavina estaria inibindo direta ou indiretamente a hexoquinase, que participa na via de biossíntese da trealose (Figura 31) e uma vez bloqueada esta via, uma segunda via (Figura 30B) seria ativada para a síntese da trealose. Portanto, uma outra via de síntese da trealose estaria sendo ativada pela presença da droga e o acúmulo de trealose, como mencionado anteriormente, estaria beneficiando a célula durante o estresse e garantindo a sua sobrevivência sob o estresse à droga.

A montagem de parte da seqüência do clone W27D11 da biblioteca cromossomo específica do alelo selvagem, e a do clone C08 do alelo resistente à droga em estudo revelou a presença de um gene de 2276 nucleotídeos, interrompida por íntrons (Figura 13) e pela presença de um “stop codon” na posição 597 da seqüência de nucleotídeos (Figura 13 e 15). Este “stop codon” existe tanto no mutante quanto na linhagem considerada selvagem, FGSCA4. Como não havia nesta região seqüências consenso de “splicing” decidimos amplificar por PCR um fragmento de cDNA que contivesse o “stop codon”.

O cDNA foi obtido através do RNA total das linhagens sensível e resistente à acriflavina. A figura 14 mostra que tanto os fragmentos de cDNA e como o fragmento de DNA genômico apresentaram aparentemente a mesma massa molecular. Em seguida, os fragmentos do cDNA e do DNA genômico foram clonados e seqüenciados. O cDNA da linhagem mutante apresentou o “stop codon” (UAA), porém no cDNA da linhagem sensível este “stop codon” foi removido pela presença de um possível íntron contendo 48 nucleotídeos. Nesta região do íntron não foi identificado nenhuma região consenso conhecida de íntrons de fungos.

O experimento com o cDNA da linhagem resistente à acriflavina foi repetido para descartar a possibilidade de contaminação com o DNA genômico. O DNA foi primeiramente tratado com DNase e em seguida amplificado em cDNA e o “stop codon” estava presente no cDNA da linhagem resistente exposta ou não a droga acriflavina.

Foi descartada a possibilidade deste “stop codon” presente na linhagem resistente, codificar um aminoácido raro como o UGA, existente na proteína selenocisteína (Low e Berry, 1996). Além disto, não se trata do 22º aminoácido (UAG=pyrrolysine) identificado recentemente por Atkins e Gesteland (2002).

Nos últimos anos foram descritos vários genes que não codificam para proteínas, são os denominados ncRNA (“non coding RNA”) (Sean, 1999). Estes ncRNA têm várias funções celulares entre elas os de RNAs guia utilizados em processos de edição, ou os envolvidos na regulação de expressão gênica, como os RNA antisense e RNA de interferência. Estes ncRNAs não têm ORFs pois não são traduzidos. No entanto, esta possibilidade não foi considerada tendo em vista a grande identidade que este gene apresenta com outros já conhecidos, como o que codifica a enzima trealose sintase de *N. crassa*.

Outra possibilidade seria a própria edição do RNA produzido, suprimindo o “stop codon”, dependendo das condições ambientais. Esta edição teria de preservar o frame de leitura para a hipótese ser válida. Este exemplo ocorre no gene para o componente da apolipoproteína B das

lipoproteínas de baixa densidade nos vertebrados. Uma das formas desta apolipoproteína B é sintetizada no fígado e a outra no intestino. Ambas são produzidas a partir de um mRNA produzido pelo mesmo gene. No entanto, uma enzima denominada citosina deaminase, encontrada apenas no intestino liga-se ao mRNA no códon CAA (Gln) e converte a C em uma U, introduzindo um codon de terminação (UAA). Esta reação permite a síntese de duas proteínas diferentes caracterizando uma regulação tecido-específico (Campton, D. *et al.* 2002; Linden, D. *et al.*,2002). Este mecanismo de regulação pode também nos sugerir que este “stop codon” (UAA) possa ser um códon sinalizador de processamento de duas proteínas diferentes.

Os alelos selvagem e mutante do gene que confere resistência à acriflavina não apresentaram diferenças na seqüência nucleotídica, nem na região promotora. Portanto, uma das hipóteses para explicar os resultados obtidos seria que o mutante não é processado, provavelmente por uma alteração no mecanismo envolvido neste processamento, comprometendo a funcionalidade da trealose sintase/fosforilase produzida. Sua transcrição deve ser paralisada no “stop codon” da região intrônica. Assim a mutação não seria na trealose sintase propriamente dita, mas num gene que teria a função de processar seu mRNA.

Os experimentos de “*northern blotting*” mostraram um aumento nos níveis de expressão deste gene na presença de acriflavina em *A. nidulans*, quando o micélio foi exposto à concentração de 320µg/ml desta droga (Figura 26). Observamos um aumento na transcrição do gene visualizada através do aparecimento de uma banda de aproximadamente 2.0kb, o que sugere que a acriflavina direta ou indiretamente induz a expressão deste gene.

Para caracterizar funcionalmente o gene que confere resistência à acriflavina em *A. nidulans* realizamos o nocaute gênico. Utilizamos o plasmídeo JYargBC22 de *A. nidulans* que contém o gene *argB* na construção do cassete da ruptura gênica, o qual foi substituído por parte do gene de resistência à acriflavina. Paralelamente uma linhagem de *A. nidulans* denominada 22 ( $\Delta argB$  *acrA1*) foi utilizada como receptora para o cassete do

nocautado gênico durante os experimentos de transformação no fungo. Esta linhagem foi obtida e caracterizada em nosso laboratório, através de cruzamento da linhagem mutante nulo para arginina, sensível à acriflavina ( $\Delta argB\ acrA^+$ ) com uma resistente à acriflavina ( $argB\ acrA1$ ).

A seleção dos transformantes ruptantes ( $argB\ acrA^+$ ) foi baseada na redução da sensibilidade à acriflavina e no crescimento da colônia na ausência do aminoácido arginina em meio de cultura apropriado (Figura 21). Um transformante nocauteado com fenótipo esperado foi confirmado por “*southern blotting*” (Figura 25). Alguns transformantes de *A. nidulans* foram cultivados na presença de glicose ou de trealose, como fonte de carbono (Figuras 22 e 23). Houve um aumento significativo na conidiação das colônias transformantes cultivadas na presença de trealose, quando comparado com o cultivo em presença de glicose como fonte de carbono. Além disto, algumas destas colônias em presença da glicose como fonte de carbono apresentaram setores o que não foi observado na presença de trealose (Figura 23). Este resultado sugere que a trealose possa garantir uma melhor estabilidade a estes transformantes durante a divisão celular. Quando o fenótipo dos transformantes foi analisado na presença de acriflavina e brometo de etídio em meio completo observamos que a linhagem nocauteada se mostrava resistente a estes inibidores (Figura 24). É provável que a linhagem nocauteada tenha adquirido alguma mutação com o fenômeno da transformação, impedindo-a de crescer em meio mínimo (Figura 21), mas permitindo que ela se revelasse resistente à acriflavina em meio completo (Figura 24). Uma linhagem com o gene *tsaA* ruptado, apresentado com o fenótipo resistente à acriflavina e ao brometo de etídio, embora não fosse esperado inicialmente, é perfeitamente compatível com os resultados obtidos. Isto porque a consequência de um nocaute neste gene deveria ser a mesma apresentada pelo mutante, que produz uma proteína truncada e confere resistência à acriflavina. Portanto, este nocaute gênico confirmou que a resistência a estes inibidores é provocada pelo não funcionamento da enzima trealose sintase/fosforilase. Além disto, mostrou também que o gene *tsaA* de *A. nidulans* não é essencial.

O “differential display” foi utilizado para identificar genes diferencialmente expressos pelo fungo em presença/ausência das drogas, acriflavina e brometo de etídio (Figura 28). Um fragmento diferencialmente expresso na linhagem sensível (*pabaA1*) quando cultivada em meio sem acriflavina foi clonado e apresentou similaridade com proteínas dependentes de GTP. Estas proteínas pertencem a uma grande família de proteínas de ligação de nucleotídeos de guanosina que mediam uma grande variedade de transdução de sinais celulares. Entretanto, na presença de acriflavina houve uma inibição na expressão deste fragmento clonado, o que não foi observado na presença do brometo de etídio.

A seqüência de nucleotídeos da ORF de 1.2Kb parte do clone W27D11 como do clone C08 (Figura 12) apresentou similaridade com as seguintes proteínas: um fator de ADP-ribosilação, pequena proteína G e proteína ligada ao GTP (Tabela 10). Além desta similaridade apresentada pela ORF de 1.2Kb com o fator de ADP-ribosilação é importante ressaltar que também apresentou uma outra similaridade com pequenas proteínas ligadas ao GTP e que são codificadas pelos genes *ras*, cuja principal função está associada com o processo de diferenciação celular e com o transporte de vesícula da membrana (Hosaka *et al.*, 1996; Pasqualato *et al.*, 2001). Alguns genes humanos que codificam pequenas proteínas GTP-“binding” que possuem atividade de GTPase também foram relacionados com o genes *ras*. No entanto, o gene *ras* também é considerado um oncogene bem caracterizado, que codifica uma proteína com atividade de ligação ao GTP normal, mas sem atividade GTPase. Quando a proteína Ras é produzida na célula funcional, ela permanece sempre na sua forma ativa, independentemente dos sinais que chegam através dos receptores normais, e este resultado gera um crescimento não regulado (câncer). Entretanto, estas proteínas RAS NCYPT1 de eucariotos possuem dois resíduos conservados de cisteína C-terminal, sugerindo também uma modificação pos-transducional pela acetilação dos lipídeos que são requeridos para o ancoramento na membrana, e estão envolvidos com o controle dos processos secretórios (Heintz *et al.*, 1992).

#### 4.1- Análise genética

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar a possível existência de uma interação gênica entre *acrA1* e *tebA7*. Esta suposta interação havia sido observada em segregantes duplo resistentes à acriflavina e à terbinafina (*acrA1 tebA7*) provenientes dos cruzamentos das linhagens mutantes resistentes à terbinafina (*tebA7* e *tebA10*) com uma linhagem Master (MSF) resistente à acriflavina (Rocha *et al.*, 2002). Estes segregantes duplo resistentes (*acrA1 tebA7*) apresentam uma super resistência à terbinafina (a resistência observada era maior que as dos próprios mutantes isolados e caracterizados *tebA7* e *tebA10*). O gene *acrA1* foi mapeado no cromossomo II em *A. nidulans* ( Roper e Käfer, 1957), como já foi citado, e ele não confere resistência à terbinafina nas linhagens que possuem o alelo *tebA* selvagem. Esta suposta interação acima citada seria diferente, portanto, de interações clássicas. Para identificar se existia ou não a influência do gene *acrA1* sobre o aumento da tolerância à terbinafina observada nos segregantes relatados acima, realizamos um cruzamento entre o segregante 1 (duplo resistente *acrA1 tebA7*) e a linhagem 47 (sensível à acriflavina e à terbinafina). Analisamos cerca de 267 segregantes deste cruzamento e analisamos os segregantes que portaram os dois alelos mutantes (*acrA1 tebA7*) com relação aos seus fenótipos em presença de concentrações variadas de terbinafina, para definir os níveis de resistência a esta droga apresentada pelos duplo resistentes. Obtivemos 66 segregantes duplo resistentes (*acrA1 tebA7*), dos quais 56 foram super-resistentes e 10 resistentes, provenientes do cruzamento acima relatado (Tabela 11). Se o alelo *acrA1* (junto com alelo *tebA7*) fosse responsável pelo fenótipo da alta resistência, esperaríamos obter 100% de super-resistentes. Concluímos que a interação entre os genes *acrA1* e *tebA7* não existe. Um outro gene também localizado no cromossomo II (*tebB*) e distante 17 cM de *acrA* esta propiciando o aumento da resistência à terbinafina em alguns segregantes duplo resistentes à acriflavina e terbinafina (Rocha *et al.*, 2002).

Os resultados fornecidos pelo cruzamento acima citado, permitiu a definição da distância gênica (que foi estimada a partir do número de segregantes recombinantes dividido pelo número total de colônias analisadas x 100) entre dois marcadores *pyroA4*, *pabaB22* provenientes da linhagem 47 e a mutação *tebA7*, todos presentes no cromossomo IV do fungo *A. nidulans*. O resultado indicou que a distância gênica entre *tebA* e *pyroA* e entre *tebA* e *pabaB* são, respectivamente, de 25,0 e 30,0 Unidades de Recombinação (Tabela 12, Figura 29), e a distância gênica entre *pyroA* e *pabaB* é 16,0 Unidades de Recombinação (Figura 29). Portanto, este teste de 3 pontos permitiu definir a posição do *tebA* no genoma de *A. nidulans*.