

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
575
G 3288
TES/MEH

**GENÉTICA DA RESISTÊNCIA AO ANTIMICÓTICO
TERBINAFINA**

Eleusa Maria Ferreira Rocha Goulart

Orientadora: Prof^a. Dra Nilce M. Martinez-Rossi

Dissertação de Mestrado a ser
apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia para obtenção do título de
Mestre em Genética e Bioquímica, área
de concentração Genética.

UBERLÂNDIA-MG

Julho - 1998

DIRBI/UFU



1000183780

**"MAIS VALE A PACIÊNCIA QUE O HEROÍSMO, MAIS VALE QUEM
DOMINA O CORAÇÃO DO QUE AQUELE QUE CONQUISTA UMA CIDADE."
PROVÉRBIOS 16,32.**

DEDICO

**A UM GRANDE E FIEL AMIGO,
JESUS CRISTO, MEU SENHOR E
SALVADOR**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus Pai, a Deus Filho e a Deus Espírito Santo pelo dom da vida, por tudo que sou e tenho

Aos meus pais, Djalma e Eleuza, pelo amor e dedicação, pelo exemplo de vida e por todos os valores transmitidos

Aos meus irmãos, Rosa, Ana, Ângela e Djalma Jr., sobrinhos e cunhados, pelo apoio e principalmente por sempre acreditarem em mim.

Ao meu marido, Adilson. Pelos pontos de vista diferentes, objetivos e preferências distintas. Aprendi a amar, a perdoar e a esperar. Durante este aprendizado descobri a mim mesma, a pessoa de Jesus e a presença do outro. A você Adilson o meu eterno obrigado por tudo.

A Fundação Educacional de Ituiutaba, à sua direção administrativa e acadêmica, ao departamento de Ciências-Biológicas, aos professores Hélio Franco, José Maria Franco e Neide Almeida por acreditarem e proporcionarem meu crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra Nilce M. Martinez-Rossi pela sua orientação eficiente, compreensão e amizade.

Ao Prof. Dr. Warwick Estevam Kerr e à Profa Dra Ana M. Bonetti, pela atenção e presença constante.

Aos Profs Drs Luiz Ricardo Goulart Filho e Walter Maccheroni Jr. pela disponibilidade para a composição da banca examinadora.

Aos professores e funcionários do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia-MG.

Aos meus queridos amigos Adelmo, Ana Lúcia, Ana Graci, Marcelo, Mônica, Rose, Márcia, Sara, Rosana, Soraia, Márcia Borges, Vivian, Mendelson, Ana Cláudia, Renata, Zenilda, Elaine, Simone e Kelsion, pelo carinho, incentivo, presença, tempo, paciência, compreensão, apoio, auxílio e sugestões que me ajudaram a realizar este trabalho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram neste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelos auxílios financeiros.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	01
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	09
2.1 – Linhagens Utilizadas.....	09
2.2 – Soluções.....	10
2.2.1 – Solução de Elementos-Traço.....	10
2.2.2 – Solução de Sais.....	10
2.2.3 – Solução de Vitaminas.....	10
2.2.4 – Solução de Caseína Hidrolisada.....	11
2.2.5 – Solução de Ácido Nucleico Hidrolisado.....	11
2.3 – Meios de Cultura.....	11
2.3.1 – Meio Mínimo.....	11
2.3.2 – Meio Completo.....	12
2.3.3 – Meio Sabouraud.....	12
2.4 – Solução de Terbinafina	13
2.5 – Estoque das Linhagens.....	13
2.6 – Isolamento de Mutantes Resistentes à Terbinafina....	14
2.6.1 – Preparo da Suspensão de Conídios.....	14
2.6.2 – Indução e Seleção de Mutantes Resistentes à Terbinafina.....	14
2.7 – Caracterização dos Mutantes Resistentes à Terbinafina: Curva Dose-Resposta.....	15
2.8 – Análise Genética.....	15
2.8.1 – Obtenção de Heterocários.....	15
2.8.2 – Isolamentos de Diplóides.....	16
2.8.3 – Análise Mitótica.....	16
2.8.4 – Análise Meiótica.....	17
2.8.5 – Relação de Dominância.....	19
2.8.6 – Teste de Alelismo.....	19
2.9 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	19
2.9.1 – CIM das linhagens <i>pabaA1</i> , <i>terbA7</i> e do diplóide (<i>terbA7</i> //MSF) de <i>A. nidulans</i>	19
2.9.2 – CIM da Linhagem de H6 de <i>T. Rubrum</i>	20
2.10 – Método de Detecção de Mutações Induzidas.....	20
2.10.1 – Efeito do Antimicótico Terbinafina na	

Sobrevivência e Frequência de Reversão da Linhagem biA1methG1 para Independência de Metionina.....	20
2.10.2 – Introdução de Setores em Linhagens Haplóides e Diplóides em <i>A. nidulans</i>	22
2.10.3 – Produção de Cleistotécio.....	22
2.11- Experimentos em Biologia Molecular.....	22
2.11.1 – Soluções para Obtenção de Protoplastos de <i>T. rubrum</i>	23
2.11.1.1 – Solução CT.....	23
2.11.1.2 – Solução DT.....	23
2.11.1.3 – Solução ET.....	23
2.11.2 – Meios de Regeneração de Protoplasto.....	24
2.11.2.1 – Meio Mínimo com Sacarose (MMS).....	24
2.11.3 – Extração de DNA da Linhagem <i>terbA7</i> de <i>A. nidulans</i>	24
2.11.4 – Extração de DNA da Linhagem H6 de <i>T.</i> <i>rubrum</i>	24
2.11.5 – Clivagem de DNA da Linhagem <i>terbA7</i> de <i>A. nidulans</i> com Enzima de Restrição.....	26
2.11.6 – Obtenção de Protoplasto de <i>T. rubrum</i>	26
2.11.7 – Transformação Inter-específica.....	27
3 – RESULTADOS.....	28
3.1 – Isolamento dos Mutantes Resistentes ao Antimicótico Terbinafina.....	28
3.2 – Caracterização de Mutantes Resistentes à Terbinafina: Curva Dose-Resposta.....	30
3.3 – Análise Genética.....	34
3.3.1 – Determinação do Número de <i>Loci</i> Envolvido na Resistência de Cada Linhagem.....	34
3.3.2 – Localização do Cromossomo que Contém o Gene de Resistência à Terbinafina.....	34
3.3.3 – Mapeamento dos <i>loci</i> Mutantes em Seus Cromossomos.....	37
3.3.4 – Teste de Alelismo.....	40
3.4 – Determinação da Concentração Inibitória (CIM) para a Tebinafina.....	40
3.5 – Método de Detecção de Mutações Induzidas.....	41

3.5.1 – Efeito do Antimicótico Terbinafina na Sobrevivência e frequência de Reversão da Linhagem biAlmethG1 para Independência de Metionina.....	41
3.5.2 – Indução de Setores em Linhagens Haplóides e Diplóides de <i>A. nidulans</i>	41
3.5.3 – Indução do desenvolvimento de Cleistotécio.	45
3. 6 – Obtenção de Transformantes de <i>T. rubrum</i>	46
4 – DISCUSSÃO.....	48
5 – RESUMO.....	54
6 – SUMMARY.....	56
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1- Via da síntese do ergosterol e os sítios da ação de seus principais inibidores..... 02
- FIGURA 2- Fórmula estrutural da terbinafina..... 13
- FIGURA 3- Curva de sobrevivência da linhagem *pabaA1* de *A. nidulans* em relação ao tempo de irradiação com luz ultravioleta (Cuadros, 1996).. 28
- FIGURA 4- Mutantes obtidos da linhagem *pabaA1* por irradiação com luz ultravioleta, cultivados em meio completo na presença da terbinafina (1,0 µg/ml)- I-*pabaA1*, II- *terbA7*, III- *terbA8*, IV- *terbA9* e V- *terbA10*.. 29
- FIGURA 5- Curvas dose-resposta frente ao antimicótico terbinafina. Linhagens cultivadas em meio completo suplementadas ou não com terbinafina. Cada ponto corresponde à média de 3 repetições..... 31
- FIGURA 6- Curvas dose-resposta das linhagens diplóides heterozigotas (*terbA7* // MSF) e (*terbA10*//MSF) e suas respectivas linhagens parentais haplóides (resistentes) *terbA7* e *terbA10* e do parental (sensível) MSF..... 33
- FIGURA 7- Segregantes mitóticos do cruzamento *terbA10* x MSF, cultivados em meio completo na presença da terbinafina 1,0 µg/ml por 3 dias. I- Segregante sensível.; II- Segregante resistente; III- Segregante Hiper-resistente; IV- *terbA10* e V- MSF..... 36
- FIGURA 8- Segregantes meióticos do cruzamento *terbA10*xMSF, cultivados em meio completo na presença de terbinafina 1,0 µg/ml. I- Segregante sensível, II- Segregante resistente, III- Segregante Hiper-resistente, IV- *terbA10* e V- MSF..... 43
- FIGURA 9- Produção de setores em linhagens diplóides e haplóides de *A. nidulans* I- Diplóide em meio completo; II- Setores do diplóide em meio completo com terbinafina (0,1µg/ml); III- Setores da linhagem *biAmethiG1* em meio completo com terbinafina (0,03 µg/ml); IV- Setores da linhagem *terbA7* em meio completo com terbinafina (6,0 µg/ml)..... 43

FIGURA 10- I- Produção de cleistotécio pela linhagem *terbA7* de *A. nidulans* na presença de terbinafina (6,0 µg/ml) (I) e (12,0 µg/ml) (II)..... 45

FIGURA 11- Linhagem H6 de *T. rubrum* em meio Sabouraud (I); Transformante em meio Sabouraud com terbinafina (1,0 µg/ml) (II)..... 47

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1- ED ₅₀ da terbinafina para as linhagens <i>terbA7</i> , <i>terbA8</i> , <i>terbA9</i> , <i>terbA10</i> , Segregante 1 e Segregante 2.....	32
TABELA 2- Análise dos segregantes dos cruzamentos <i>terbA7</i> X MSF e <i>terbA10</i> X MSF.....	34
TABELA 3- Análise mitótica dos segregantes haplóides do cruzamentos <i>terbA7</i> X MSF quanto à segregação da marca de resistência à terbinafina....	35
TABELA 4- Análise mitótica dos segregantes haplóides do cruzamento <i>terbA10</i> X MSF quanto à segregação da marca de resistência à terbinafina..	37
TABELA 5- Análise meiótica do cruzamento <i>terbA7</i> X MSF.....	38
TABELA 6- Análise meiótica do cruzamento <i>terbA10</i> X MSF.....	40
TABELA 7- Análise meiótica do cruzamento <i>terbA7(6)</i> X <i>terbA10(9)</i>	40
TABELA 8- Valores da concentração mínima inibitória (CIM) de terbinafina para linhagens H6 de <i>T. rubrum</i> , e para as linhagens <i>pabaA1</i> , <i>terbA7</i> e do diplóide (<i>terbA7</i> // MSF) de <i>A. nidulans</i>	41
TABELA 9- Efeito do antimicótico terbinafina na sobrevivência e frequência de reversão da linhagem <i>bimethG1</i> para independência de metionina.....	42
TABELA 10- Números de setores em linhagens haplóides e diplóides em <i>A. nidulans</i> obtido em meio completo suplementado com terbinafina.....	44

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos, as drogas vêm sendo a forma de intervenção terapêutica disponível aos médicos, mais amplamente usada no combate à infecções. Os produtos naturais ainda são importantes em alguns campos, notavelmente na quimioterapia, mas a principal fonte de novas drogas são agora os produtos químicos sintéticos.

Um dos princípios da quimioterapia se baseia na forma pela qual a droga atua sobre um ou mais alvos na célula. O esclarecimento da natureza destes alvos, bem como dos mecanismos pelos quais ocorre a associação da droga com estes alvos constitui um dos objetos da investigação científica a respeito do modo de ação das drogas.

Os alvos protéticos para ação destas drogas nas células podem ser divididos em: receptores, canais iônicos, moléculas transportadoras e enzimas (Rang *et al.*, 1997). Entre as drogas que são direcionadas às enzimas, existe um novo antimicótico sintético, pertencente ao grupo das alilaminas, chamado terbinafina. A terbinafina oral foi aprovada como medicamento no tratamento das dermatofitoses no Reino Unido e na Dinamarca em 1991, no Canadá em 1993 e nos Estados Unidos em 1996 (Gupta e Shear, 1997). Este antimicótico é utilizado nos tratamentos das micoses humanas (Georpadokou e Wash, 1994), assim como na aspergilose pulmonar e candidíase, provocadas respectivamente pelas espécies *Aspergillus fumigatus* (Shiraldi, 1996) e *Candida albicans* (Sanglard, 1996). A terbinafina age como um inibidor enzimático, na via de síntese do ergosterol, o principal esteroide dos fungos. Esta droga atua como um inibidor não competitivo e reversível da esqualeno epoxidase em *Candida* (Ryder, 1992), e juntamente com outra enzima ciclase, é responsável pela ciclização do esqualeno em lanosterol, utilizando moléculas

de oxigênio e NADH durante a catálise enzimática (Ryder, 1997) (Figura 1).

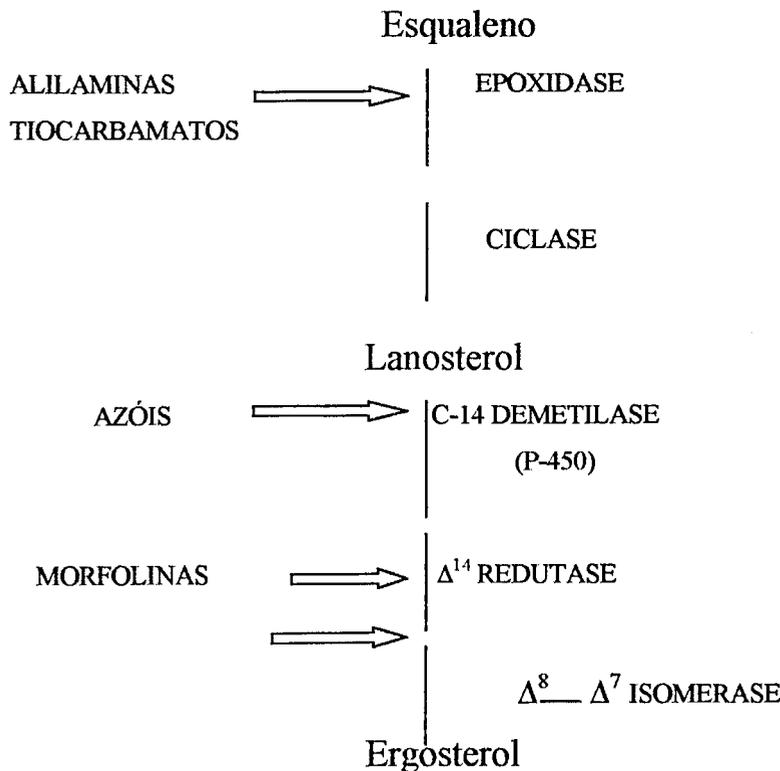


Figura 1- Via de Síntese do ergosterol e os sítios de ação de seus principais inibidores.

Em contraste, a inibição da esqualeno epoxidase de fígado de rato ocorre somente em altas concentrações da terbinafina, e é competitiva com o esqualeno (Ryder, 1992). A esqualeno epoxidase não é uma enzima citocromática, o que sugere que a terbinafina seja menos tóxica que os azóis, que atuam na 14 α -esterol demetilase, dependente de citocromo P-450, também na via da síntese do ergosterol (Marichal e Bossche, 1995). O ergosterol é necessário na manutenção da permeabilidade e fluidez da membrana (Kelly *et al.*, 1990), garantindo assim, a modulação de enzimas ligadas à membrana plasmática (Aoki *et al.*, 1993). A ausência do ergosterol e o acúmulo de esqualeno afetam a estrutura da membrana plasmática e a

absorção de vários nutrientes (Georgopapadokou e Walsh, 1994, 1996).

Estudos com os inibidores da síntese do ergosterol são de grande interesse do ponto de vista genético, bioquímico e fisiológico, porque podem fornecer informações valiosas sobre a fisiologia celular. Além disto, mutantes resistentes a agentes inibidores, cujo mecanismo de resistência ocorre por alterações da permeabilidade da membrana celular dos fungos, são instrumentos valiosos no estudo da resistência à múltiplas drogas (MDR) (Martinez-Rossi, 1995). Este mecanismo de resistência celular é provavelmente um dos mais importantes pois, um único gene é responsável pela resistência à várias drogas não relacionadas química ou funcionalmente.

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 transcrição de um gene que codifica uma proteína de membrana denominada glicoproteína P, que funciona como uma bomba de efluxo de drogas dependente 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). Esta proteína de membrana, a glicoproteína P, pertence a uma grande família de ATPase que funciona como uma bomba de efluxo em organismos eucariontes e procariontes (Neyfakh *et al.*, 1991).

Alterações na permeabilidade da membrana em linhagens resistentes a azol em *C. albicans*, já tinham sido identificadas por Hitchcock *et al.*, (1986, 1987). Estas alterações estariam relacionadas à captação das drogas ou com o seu efluxo (Vanden Bosshe *et al.*, 1990).

Recentes investigações sobre o mecanismo de resistência ao fluconazol (um azol) em *C. albicans*, demonstrou que a maioria dos isolados resistentes não acumulam os mesmos níveis de fluconazol intracelularmente que os

isolados sensíveis. Transportadores multidrogas envolvidos com efluxo foram identificados como os possíveis mediadores deste processo, que envolve também, resistência à cetoconazol, itraconazol, amorfina e terbinafina em *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1995, 1996, 1997).

Ryder *et al.* (1998) observaram em *C. albicans* colônias resistentes à terbinafina, à fluconazol e resistentes para ambas as drogas. Estes autores sugerem então, que deva existir mais de um mecanismo de resistência à terbinafina. Estes autores também afirmam que, como a terbinafina e os azóis atuam em enzimas da mesma via biossintética do ergosterol, outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos e mais estudos devem ser realizados para esclarecer esta questão.

O fenômeno da MDR, relacionado aos transportadores ABC (ATP-binding cassette transporter) em fungos filamentosos foi descrito, em mutantes resistentes a imazalil (um azol) de *Aspergillus nidulans* (Del Sorbo *et al.*, 1997). Estas mutações nos genes *imaA* e *imaB* haviam sido mapeadas, respectivamente, nos cromossomos VII e V de *A. nidulans* (Tuyl, 1977).

O gene *acrA* localizado no cromossomo II de *A. nidulans* pode também, ser um candidato a participar do mecanismo de resistência envolvendo múltiplas drogas. Esta sugestão foi possível porque o seu alelo mutante *acrA1* permite que o fungo se torne resistente, simultaneamente, a derivados de acridina entre eles a acriflavina e ao antimicótico tioconazol, duas drogas não relacionadas estrutural ou funcionalmente (Pereira, 1997).

Além destes aspectos, 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 pelo vírus da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), pela quimioterapia

de pacientes com câncer ou nos transplantados. Estes fatos têm levado a Indústria Farmacêutica a investir em novas drogas. Porém, o desenvolvimento de antimicóticos específicos para o patógeno constitui-se um desafio científico, pois os fungos e seus hospedeiros são organismos eucariontes e portanto, possuem várias vias metabólicas e estruturas celulares comuns.

Portanto, o estudo dos mecanismos genéticos que levam à resistência a um antimicótico é fundamental para a adequada utilização destas drogas, bem como para o desenvolvimento de outras novas.

Por isto, um dos objetivos deste trabalho é contribuir para o entendimento da genética da resistência ao novo antimicótico terbinafina utilizando inicialmente o fungo filamentoso *A. nidulans* como modelo experimental, pois este possui várias vantagens para tais estudos (Pontecorvo *et al.*, 1953). Possui um sistema genético bem definido e caracterizado por vários marcadores de resistência e nutricionais, um genoma pequeno e haplóide, requerimentos nutricionais simples, ciclo de vida curto, etc. 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).

O segundo objetivo deste trabalho foi tentar extrapolar os resultados encontrados em *A. nidulans* para o dermatófito *Trichophyton rubrum*, verificando se o gene mutado que confere resistência à terbinafina de *A. nidulans* complementaria a espécie *T. rubrum*.

Os dermatófitos vivem à custa da queratina da pele, dos pêlos e das unhas e são capazes de transformar este material queratinizado em material nutritivo, garantindo o seu desenvolvimento a sua manutenção e causando infecções. Durante o período de sua implantação na superfície do corpo, os dermatófitos liberam enzimas proteolíticas, que estão relacionadas com a sua

patogenicidade. Por exemplo podemos citar a elastase, uma enzima que lhes permite agir sobre a elastina, o que também poderia auxiliar na sua instalação no hospedeiro (Trabulsi, 1986).

As dermatofitoses são também conhecidas clinicamente por “tinhas” ou “tineas”, sendo a sua ocorrência muito freqüente em quase todas as partes do mundo. Geralmente podem ser provocadas por três gêneros principais: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Kwon-chung e Bennett, 1992).

A espécie *Trichophyton rubrum*, considerada cosmopolita, é caracterizada pela presença de macroconídios lisos e microconídios. Os macroconídios podem ser claviformes ou fusiformes, formando-se individualmente, e os micronídios tem forma variada. O desenvolvimento colonial é de aspecto cotonoso e branco e à medida que se desenvolve, torna-se de aspecto aveludado. A parte inferior da colônia pode apresentar alguma pigmentação avermelhada, rosa púrpura ou ocre (Minelli, 1972).

O *T. rubrum* foi relatado pela primeira vez em 1911, mas foi isolado com eficácia após a Segunda Guerra Mundial (De Bièvre *et al.*, 1987). Ainda é desconhecida a fase sexual desta espécie, e por isto, o *T. rubrum* foi classificado pela sua morfologia como pertencente aos fungos Deuteromicetos ou Fungos Imperfeitos. O conhecimento das estruturas sexuais é fundamental para uma classificação segura (Badillet, 1991).

Pelo fato do *T. rubrum* ser o fungo mais prevalente entre as micoses humanas e o seu conhecimento genético e mesmo biológico ser ainda incipiente, decidimos investir em experimentos de transformação gênica.

Em fungos filamentosos, o primeiro relato da ocorrência de transformação foi realizada em um mutante nutricional *inl* (inositol) da espécie *Neurospora crassa*, no laboratório de E.T. Tatum na Universidade

Rockefeller (Mishara *et al.*, 1973). O DNA isolado da linhagem selvagem (*inl*⁺) foi introduzido no mutante (*inl*). Entretanto, este experimento não foi aceito como um fenômeno de transformação, até que vieram outros relatos em outros genes e em outras espécies confirmando que esta seria uma nova técnica de trabalho (Finchan, 1989).

Beggs (1978) relatou a construção e o uso do primeiro vetor de *Saccharomyces cerevisiae*-*Escherichia coli*. Este era um plasmídeo quimérico com duas origens de replicação, uma do plasmídeo ColE1 e a outra do plasmídeo (2 μ M) de *S. cerevisiae*. Este plasmídeo também continha o gene LEU2 para seleção em *S. cerevisiae* e o gene da resistência à tetraciclina para a seleção em *E. coli* (Broach, 1981). Foi graças ao desenvolvimento de vetores plasmidiais como este, que o fenômeno da transformação pode contribuir com o desenvolvimento da biologia molecular em fungos filamentosos.

A técnica de remoção da parede celular da célula micótica teve uma contribuição significativa no aumento da frequência de transformação *in vitro*. Estas células são chamadas de protoplastos e são mantidas em estabilizadores osmóticos. Devido ao uso dos protoplastos pode-se ter um aumento do fenômeno da transformação principalmente na classe *Ascomycetes*, nas espécies *N. crassa* (Case, 1979) e *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1983).

Um sistema de transformação entre os fungos filamentosos também foi desenvolvido na espécie *Trichophyton mentagrophytes*. O sistema emprega um vetor plasmidial chamado de pH1S, o qual está ligado um gene de resistência à higromicina B bacteriano com seqüências regulatórias (Turgeon *et al.*, 1987).

O sistema de transformação *in vitro* por complementação, empregado neste trabalho, teve a utilização de um vetor plasmidial autoreplicativo denominado pAB4-ARp1, contendo cerca de 11.7 Kb. O plasmídeo pAB4-

ARp1 possui a capacidade de se replicar autonomamente, conferida por uma sequência de DNA de *A. nidulans* denominada AMA1. Este plasmídeo, também, contém um gene *pyrG* de *A. niger*, que pode complementar um mutante auxotrófico em um meio seletivo. Este vetor tem por vantagem um aumento significativo na frequência da transformação *in vitro* no gênero *Aspergillus* (Verdoes *et al.*,1994).

Resumidamente este trabalho teve como objetivos principais: 1) entender o mecanismo genético da resistência ao antimicótico terbinafina utilizando linhagens de *A. nidulans*; 2) verificar a existência de uma complementação heteróloga de função do gene de resistência à terbinafina de *A. nidulans* no dermatófito *T. rubrum*, via a estratégia de transformação *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens Utilizadas

As linhagens de *A. nidulans* utilizadas neste trabalho na caracterização fisiológica e genética foram as seguintes:

- 1) MSF (Master Strain F): *adE20 suAadE20 yA2 acrA1 galA1 pyroA4 facA303 sB3 nicB8 riboB2*
- 2) *pabaA1*
- 3) *biA1methG1*
- 4) Diplóide (*udaA2*//MSF)

O significado dos marcadores genéticos e seus respectivos grupos de ligação estão relacionados na Tabela abaixo.

Marcador	Grupo de Ligação	Característica
<i>adE20</i>	I	Auxotrofia para adenina
<i>acrA1</i>	II	Resistência à acriflavina
<i>facA303</i>	V	Não utilização de acetato como fonte de carbono
<i>galA1</i>	III	Não utilização de galactose como fonte de carbono
<i>nicB8</i>	VII	Auxotrofia para ácido nicotínico
<i>pabaA1</i>	I	Auxotrofia para ácido <i>p</i> -aminobenzóico
<i>pyroA4</i>	VI	Auxotrofia para piridoxina
<i>riboB2</i>	VIII	Auxotrofia para riboflavina
<i>sB3</i>	VI	Auxotrofia para tiosulfato de sódio
<i>suAadE20</i>	I	Gene supressor de <i>adE20</i>
<i>yA2</i>	I	Conídios amarelos
<i>biA1</i>	I	Auxotrofia para biotina
<i>methG1</i>	IV	Auxotrofia para metionina
<i>udaA2</i>	VIII	Resistência ao ácido undecanóico

Uma linhagem de *T. rubrum* denominada H6 de aspecto cotonoso, coloração branca e com auxotrofia para glicina foi utilizada para complementação gênica. Esta linhagem foi isolada de pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (SP) com dermatofitose, e caracterizada no laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos da FMRP, USP de Ribeirão Preto (SP).

2.2 - SOLUÇÕES

2.2.1 - SOLUÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇO (Cove, 1966)

borato de sódio decahidratado.....	40mg
sulfato de cobre pentahidratado.....	400mg
sulfato de ferro heptahidratado.....	532mg
sulfato de manganês monohidratado.....	292mg
molibdato de sódio bihidratado.....	800mg
sulfato de zinco heptahidratado.....	8g
água destilada estéril (q.s.p.).....	1000ml

Esta solução foi mantida sob clorofórmio (2ml), a 4°C.

2.2.2 - SOLUÇÃO DE SAIS (Cove, 1966)

cloreto de potássio.....	26g
sulfato de magnésio heptahidratado.....	26g
solução de elementos traço.....	50ml
fosfato de potássio monobásico.....	76g
água destilada estéril (q.s.p.).....	1000ml

Esta solução foi mantida sob clorofórmio (2ml), a 4°C.

2.2.3 - SOLUÇÃO DE VITAMINAS (Pontecorvo *et al.*, 1953)

Ácido fólico	10mg
Ácido nicotínico.....	100mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico	10mg
B-mesoinositol.....	200mg
Biotina.....	1mg
Cloreto de Colina.....	100mg
Piridoxina.....	50mg

Pantotenato de cálcio.....	100mg
Riboflavina.....	100ml
Tiamina.....	50mg
Água destilada estéril (q.s.p.).....	1000ml

Esta solução foi mantida em frasco escuro sob clorofórmio, a 4°C.

2.2.4 - SOLUÇÃO DE CASEÍNA HIDROLISADA

caseína hidrolisada.....	20g
água destilada estéril (q.s.p.)	100ml

Esta solução foi mantida em frasco escuro sob clorofórmio, a 4°C.

2.2.5 - SOLUÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO HIDROLISADO

Para a obtenção desta solução foram dissolvidos, separadamente, 2g de ácido nucléico de levedura em 15 ml de HCl (1N), e 2g em 15 ml de NaOH (1N). Estas soluções foram aquecidas por 20 minutos, em banho maria, misturadas, e o seu pH ajustado em 6,0. A mistura foi filtrada, o volume final foi completado para 40 ml de água destilada e estocada a 4°C, sob clorofórmio.

2.3 - MEIOS DE CULTURA

2.3.1 - MEIO MÍNIMO (MM) (Cove 1966)

Solução de sais.....	20ml
Água destilada (q.s.p).....	1000ml

O pH do meio foi ajustado em 6,8 e em seguida autoclavado a 1 atm durante 20 minutos. As soluções de glicose (50mM) (fonte de carbono) e de nitrato de sódio (70mM) (fonte de nitrogênio), foram autoclavadas separadamente e então acrescentadas ao meio. Durante o preparo do meio mínimo foi adicionado 1,5% de ágar antes deste ser autoclavado.

2.3.2 - MEIO COMPLETO (MC) (Pontecorvo *et al.*, 1953)

Solução de Sais.....	20ml
Solução de Vitaminas.....	2ml
Caseína hidrolisada.....	1,5g
Solução de hidrolisado de ácido nucléico.....	2,5ml
Peptona.....	2g
Extrato de levedura.....	1g
Água destilada (q.s.p.).....	1000ml

O pH do meio foi ajustado em 6,8 e em seguida autoclavado a 1 atm durante 20 minutos. As soluções de glicose (50mM) (fonte de carbono) e de nitrato de sódio (70mM) (fonte de nitrogênio), foram autoclavadas separadamente e então acrescentadas ao meio. Durante o preparo do meio mínimo foi adicionado 1,5% de ágar antes deste ser autoclavado.

2.3.3 – MEIO SABOURAUD

Glicose.....	20 g
Neopeptona.....	10 g
Água destilada q.s.q.	1000 ml

O pH do meio foi ajustado em 5,7 e o meio foi autoclavado a 1 atm de pressão por 20 minutos. Foi adicionado ao meio 1,5% de ágar.

2.4 - SOLUÇÃO DE TERBINAFINA

A terbinafina é um antimicótico derivado da alilamina e seu nome sistemático é : N-(6,6-Dimethyl-2-hepten-4-yn-yl)-N-methyl-1-naphthalenemethanamine. A fórmula geral da terbinafina é $C_{21}H_{25}N$ (Figura 2) e seu peso molecular é de 291,44. C= 86,55%, H= 8,65%, N= 4,81%..

A solução de terbinafina foi preparada em dimetilsulfoxido (DMSO) na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ (solução estoque).

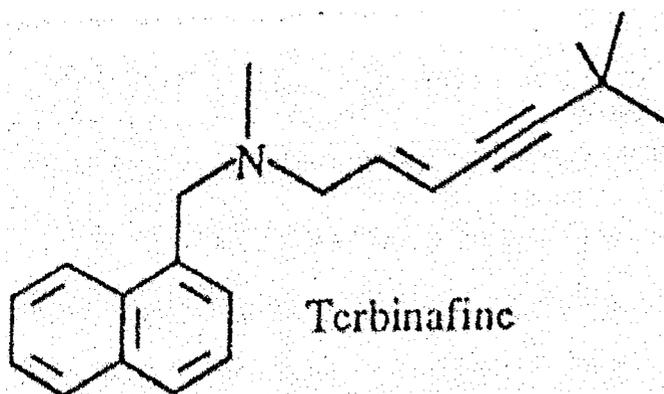


Figura 2 – Fórmula Estrutural da Terbinafina

2.5 - ESTOQUES DAS LINHAGENS

Para a preservação das linhagens de *A. nidulans* por um longo período, estas foram mantidas em grânulos de sílica gel. Neste caso, os esporos de culturas recém cultivadas foram ressuspensos em algumas gotas de leite em pó, desnatado, diluído (5%) e transferidas para tubos ou frascos contendo sílica gel esterilizada e seca. Para utilização de uma determinada linhagem alguns grânulos de sílica foram colocados em placas de Petri contendo meio completo. Esta técnica permite que os repiques das linhagens sejam sempre obtidos de um mesmo estoque, evitando-se assim subculturas sucessivas.

2.6 - ISOLAMENTO DE MUTANTES RESISTENTE À TERBINAFINA

2.6.1 - PREPARO DA SUSPENSÃO DE CONÍDIOS

Conídios da linhagem *pabaA1* de *A. nidulans* crescida em meio completo a 37°C por 48 horas, foram coletados com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e suspensos em 10 ml de solução salina (0,8%)-tween (0,01%). Essa suspensão foi agitada para promover desagregação das cadeias de conídios e em seguida filtrada através de lã de vidro para remoção das hifas. Para uma suspensão mais densa e limpa, o volume total foi submetido a centrifugação por 5 minutos, a 3000 rpm e o precipitado foi ressuspensado em um volume menor de solução salina. O número de conídios por mililitro da suspensão foi estimado a partir de uma diluição a 10^{-2} , contando-os em hematómetro sob microscópio.

2.6.2 INDUÇÃO E SELEÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES À TERBINAFINA.

Os mutantes isolados para este trabalho, foram obtidos por meio do tratamento de conídios da linhagem *pabaA1* com uma luz ultravioleta durante 5 minutos, e inoculados em placas de Petri contendo meio completo sólido suplementado com várias concentrações de terbinafina, que inibem o crescimento da linhagem original (Martinez-Rossi e Azevedo, 1989). Estas placas foram incubadas por sete dias a 37°C.

2.7.- CARACTERIZAÇÃO DOS MUTANTES RESISTENTES À TERBINAFINA : CURVA DOSE-RESPOSTA

A atuação da terbinafina nas linhagens sensíveis e resistentes foi determinada pela medida do diâmetro das colônias. Os conídios foram inoculados por ponto no centro de placas de Petri, contendo meio completo e o antimicótico terbinafina em diferentes concentrações. Nas placas controle não foi adicionado o antimicótico. Para cada linhagem foram feitas 3 repetições e em cada uma das concentrações o diâmetro foi medido após 72 horas de crescimento a 37°C. A toxicidade relativa foi expressa como porcentagem do crescimento na presença do antimicótico e representado pelo ED₅₀ , que foi a concentração que causou 50% de redução no crescimento radial da colônia.

2.8 - ANÁLISE GENÉTICA

2.8.1 - OBTENÇÃO DE HETEROCÁRIOS

Os heterocários são um conjunto de hifas contendo núcleos geneticamente diferentes em citoplasma comum. Para a obtenção destes heterocários foi usado o método descrito por Pontecorvo *et al.* (1953).

Esta técnica consiste na inoculação em meio completo, por pontos alternados e distantes um do outro 5mm, de conídios de duas linhagens com auxotrofias complementares e coloração de conídios diferentes. As placas de petri foram inoculadas por 24 horas a 37°C para permitir um pequeno desenvolvimento dos conídios e assim possibilitar a anastomose das hifas. Após este período, as partes onde as duas colônias diferentes se juntam (interfaces) eram recortadas e enterradas em meio mínimo sólido, onde foram cultivadas a 37°C para que as hifas heterocarióticas se desenvolvessem.

2.8.2 - ISOLAMENTO DE DIPLÓIDES

Alguns núcleos de um heterocário podem se fundir para formar um núcleo diplóide. O isolamento destes diplóides heterozigotos pode ser feito plaqueando-se uma suspensão de conídios provenientes de uma região heterocariótica, entre duas camadas de meio mínimo (Tuyl, 1977). Os conídios foram coletados numa solução de salina contendo tween 80 (0,1%), filtrados em lã de vidro e semeados em placas de meio mínimo. Em seguida acrescentou-se mais 15 ml de meio mínimo (mantido a 45°C) sobre estas mesmas placas e então foram incubadas por um a dois dias a 37°C.

O reconhecimento de uma colônia diplóide foi realizado pela observação de seu crescimento e sua morfologia em meio mínimo, coloração e diâmetro do conídios.

2.8.3 - ANÁLISE MITÓTICA

A análise mitótica foi realizada baseada no ciclo parassexual de *A. nidulans*, considerando-se que o gene mutante pode ser relacionado aos

marcadores genéticos de um mesmo grupo de ligação, que segregam como uma unidade gênica.

A haploidização do diplóide heterozigoto se processa através de sua inoculação em quatro pontos equidistantes, em meio completo, contendo um agente haploidizante como cloroneb (20 μ g/ml de meio) (Azevedo e Santana, 1975) ou benomil (0,63 μ g/ml de meio) (Hastie, 1970).

Após sete dias de incubação a 37°C, ocorreu o surgimento de setores que foram purificados em meio completo para a obtenção de colônias isoladas ou segregantes.

Estes segregantes haplóides (segregantes mitóticos) foram inoculados um a um em 25 pontos prefixados mais o controle em placas de Petri contendo meio completo. Após aproximadamente 48 horas de incubação, cada placa serviu como mestra e foi repicada em placas de análise utilizando-se um replicador contendo 26 fios de níquel-cromo (Azevedo *et al.*, 1976).

Realizou-se a análise do genótipo de cada segregante mitótico através de placas contendo meio mínimo suplementado com todos os requisitos nutricionais de ambas as linhagens envolvidas no cruzamento, exceto aquele sob análise e em meio completo contendo o antimicótico em concentrações que variavam, dependendo do ED₅₀ de cada linhagem mutante. Realizou-se também análise em placas contendo soluções de galactose (1%) e de acetato de sódio (6 M, pH 7.0) como fontes de carbono, sendo ambas suplementadas com todos os requisitos nutricionais.

As análises das leituras das placas foram feitas após 24 e 48 horas de incubação, observando-se ou não o crescimento colonial.

2.8.4 - ANÁLISE MEIÓTICA

A análise meiótica foi realizada baseada no ciclo sexual de *A. nidulans*. Os segregantes meióticos foram obtidos através do cruzamento entre duas linhagens diferentes quanto a resistência, auxotrofia e a cor dos conídios. A interface deste cruzamento (heterocário) foi enterrada em placas contendo meio mínimo. Após um dia de incubação a 37°C, as placas de Petri foram seladas com fita crepe e colocadas novamente na estufa por 10 a 15 dias para a formação dos cleistotécios. Os cleistotécios maiores foram coletados sob lupa, limpos e rolados em meio mínimo sólido, para remoção de conídios e células de Hulle aderidas à sua parede. Cada cleistotécio isolado foi transferido para um tubo contendo 2ml de solução de salina (0,85%) e esmagado contra a parede deste tubo, para a liberação dos ascósporos. Uma alíquota de cada suspensão de ascósporos foi semeada, através de estrias, em placas contendo meio completo, para se certificar quais os cleistotécios continham ascósporos de diferentes colorações, o que indicava os cleistotécios híbridos. A suspensão de ascósporos de um cleistotécio híbrido escolhido foi então diluída e semeada em oito placas contendo meio completo sólido, de forma a obter cerca de 30 colônias isoladas por placa. Após 48 horas de incubação, os segregantes meióticos foram inoculados um a um em pontos prefixados junto com as linhagens parentais em placas contendo meio completo para a obtenção de placas mestras. Os segregantes meióticos foram analisados com relação a requisitos nutricionais, coloração, resistência e sensibilidade à droga terbinafina. Foram analisados aproximadamente 260 segregantes meióticos de cada cruzamento. Os valores de ligação genética foram calculados em função da porcentagem de recombinantes entre todos os segregantes meióticos analisados.

A base genética da herança da resistência ao antimicótico terbinafina foi verificada através da relação entre o número de ascósporos recombinantes e o número total de indivíduos analisados, provenientes de um cleistotécio híbrido.

2.8.5 - RELAÇÃO DE DOMINÂNCIA

A expressão das mutações para resistência de cada linhagem foi determinada em diploídes heterozigotos resultantes do cruzamento entre cada linhagem resistente e a MSF. Curvas dose-resposta foram construídas para os diploídes e para as linhagens haploídes parentais. Comparando-se as diferentes curvas é possível determinar se o caráter da mutação é dominante, codominante ou recessivo.

2.8.6- TESTE DE ALELISMO

O uso do teste de alelismo teve por objetivo verificar se as mutações mapeadas no mesmo grupo de ligação eram alélicas ou não. Foram cruzados dois segregantes mitóticos que continham os genes mutados para resistência e diferentes auxotrofias e coloração de conídeos.

2.9 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).

2.9.1 -CIM DAS LINHAGENS *pabaA1*, *terbA7* E DO DIPLÓIDE (MSF//*terbA7*).

Uma alíquota de 100µl de suspensão contendo 10^7 de conídios/ml da linhagem *pabaA1* (obtida conforme descrito no item 2.6.1) foi

inoculada e espalhada com a alça de Drigalski em meio completo suplementado com terbinafina nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 µg/ml.

O mesmo procedimento foi realizado para a suspensão de conídios das linhagens *terbA7* e do diplóide, porém, as concentrações utilizadas da droga foram de 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 12,0, 14,0, 18,0 e 20,0 µg/ml. Três experimentos independentes com três repetições de cada foram realizados e as placas foram incubadas a 37°C durante 3 dias.

A partir da observação dos resultados foi possível estabelecer o CIM de cada linhagem frente ao antimicótico, que é definido como a menor concentração da droga em que não se observa o crescimento macroscópico do fungo.

2.9.2 – CIM DA LINHAGEM H6 DE *T. rubrum*.

Uma alíquota de 100µl de suspensão contendo 5×10^5 de conídios/ml da linhagem H6 de *T. rubrum* foi inoculada e espalhada com a alça de Drigalski em meio Sabouraud suplementado com terbinafina nas concentrações de 0,01, 0,1, 0,5 e 1,0 µg/ml. As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C.

2.10 MÉTODO DE DETECÇÃO DE MUTAÇÕES INDUZIDAS.

2.10.1 –EFEITO DO ANTIMICÓTICO TERBINAFINA NA SOBREVIVÊNCIA E FREQUÊNCIA DE REVERSÃO DA LINHAGEM *biA1mthG1* PARA INDEPENDÊNCIA DE METIONINA

Este método (Lilly, 1965), tem por finalidade verificar a frequência com que linhagens auxotróficas para metionina se tornam espontaneamente prototróficas, devido a mutações em vários *loci* supressores. Estes supressores se constituem em diferentes morfologias, sendo três deles bem distintos (*Su meth1A*, *su meth1B* e *Su meth1C*, abreviados com A, B e C). Em meio sem metionina, o tipo A apresenta colônias essencialmente normais, o tipo B colônias com pouco conídios e pigmento marrom e o tipo C colônias que conidiam densamente e contém um halo hialino. Um outro tipo de revertente (tipo D), constituído de colônias brancas compactas, também foi considerado no presente trabalho.

Conídios da linhagem *biA1 methG1*, cultivados por 5-7 dias foram transferidos para um solução salina (0,8%) e agitados em um Vortex para a obtenção de conídios desagregados. Esta suspensão foi filtrada em lã de vidro esterilizada, para eliminação dos micélios e sua densidade estimada através de câmara de Neubauer. Os seguintes meios foram utilizados nos ensaios destes conídios:

a) Meio mínimo suplementado com biotina e metionina. Diluições adequadas da suspensão original de conídios foram inoculadas com o objetivo de obter o título da suspensão conidial (nº de conídios viáveis/ml da suspensão original).

Meio mínimo suplementado com biotina. A suspensão original, sem diluições, foi inoculada com objetivo de obter a frequência de mutação espontânea (de metionina-dependente para metionina-independente).

A leitura das placas foi feita após 4 dias de incubação a 37°C.

Instituto de Microbiologia
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

b) Meio mínimo suplementado com biotina e com a terbinafina, na seguintes concentrações da droga: 0,005, 0,01 e 0,02 µg/ml. A suspensão original de conídios foi inoculada com o objetivo de obter a frequência de mutação induzida (de metionina-dependente para metionina-independente).

c) Meio mínimo suplementado com biotina, metionina e a terbinafina, nas mesma concentrações citadas acima. Diluições adequadas da suspensão original de conídios foram inoculadas com o objetivo de obter a porcentagem de sobrevivência da linhagem *biA1 methG1* frente a terbinafina.

Após 5 dias de incubação a 37°C foram realizadas a contagem dos vários tipos de colônias mutantes ou sobreviventes.

2.10.2 – INDUÇÃO DE SETORES EM LINHAGENS HAPLÓIDES E DIPLÓIDES DE *A. nidulans*.

As setorizações das linhagens haplóides e diplóides foram realizadas através de inóculo por ponto em meio completo contendo o antimicótico terbinafina em várias concentrações.

2.10.3 - PRODUÇÃO DE CLEISTOTÉCIO

Suspensão de conídios da linhagem *terbA7* (obtida conforme o item 2.6.1) foram inoculadas em meio completo suplementado com terbinafina e incubadas por 10 dias a 37°C.

2.11 – EXPERIMENTOS EM BIOLOGIA MOLECULAR

Os experimentos em Biologia Molecular tiveram como objetivo a complementação heteróloga de função entre *A. nidulans* e *T. rubrum*, por transformação.

2.11.1 – SOLUÇÕES PARA OBTENÇÃO DE PROTOPLASTOS E OBTENÇÃO DE *T. rubrum*.

2.11.1.1 – SOLUÇÃO CT

Sulfato de amônio.....	0,4M
Sacarose.....	1%
Ácido cítrico.....	0,05M pH6,0

2.11.1.2 – SOLUÇÃO DT

KCl.....	0,6M
CaCl ₂	0,1M
Tris-HCl.....	0,01M pH7,5

2.11.1.3 – SOLUÇÃO ET

KCl.....	0,6M
CaCl ₂	0,1M
Tris-HCl.....	0,01M pH7,5
PEG 8000.....	25% (m/v)

A solução ET foi filtrada em membrana de Millipore e as demais foram autoclavadas.

2.11.2 – MEIOS DE REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTO

2.11.2.1 – MEIO MÍNIMO COM SACAROSE (MMS)

Solução de sais.....	20ml
Glicose(1%).....	10g
Sacarose (1M).....	342 g
Água destilada (q.s.p)	1000ml

O pH do meio foi ajustado em 5,5 e em seguida autoclavado a 1 atm durante 20 minutos. Foi utilizado ágar (1,5%) para o meio plaqueado e 0,8% para o meio a ser misturado com os protoplastos (top ágar). A solução de Nitrato de sódio (70mM), como fonte de nitrogênio e solução de glicina 0,1M foram acrescentadas ao meio quando utilizado.

2.11.3 – EXTRAÇÃO DE DNA DA LINHAGEM *terbA7* DE

A. nidulans.

Foram inoculados 1×10^7 conídios da linhagem *terbA7* de *A. nidulans* em meio completo líquido, e incubados sob constante agitação por 24 h a 37°C.

Após a obtenção do crescimento micelial da linhagem *terbA7*, a cultura foi filtrada através de um funil de Buchner e o micélio resultante foi prensado entre duas folhas de papel filtro para remoção do excesso de umidade e em seguida pesado. O micélio foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido até que o micélio se tornasse um pó.

Ao micélio em pó (4g) foi acrescentado 20ml do tampão de extração TSE (100mM de EDTA, 10mM de Tris-HCl e 2% de SDS, pH 8,0) e 20 ml de fenol equilibrado em tampão Tris-HCl, pH 8,0., pré-aquecidos a 65°C em banho maria. Esta solução foi mantida em banho maria a 65°C sob suave agitação durante 20 minutos e centrifugada a 15000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante e acrescentado 20 ml de fenol à temperatura ambiente e novamente centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. Uma mistura de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 foi adicionada ao sobrenadante coletado e em seguida centrifugado a 15000 rpm durante 15 minutos. Um volume da mistura clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foi acrescentado ao sobrenadante coletado e centrifugado a 15000 rpm durante 5 minutos. Após a extração do sobrenadante, adicionou-se 0,6 volumes de isopropanol e em seguida o DNA foi pescado e transferido para um eppendorf estéril. O restante da solução foi centrifugado a 15000 rpm durante 5 minutos. Os pellets foram ressuspendidos em TE e incubados a 37°C, no tempo necessário para dissolver o DNA.

Em seguida o DNA foi quantificado em um gel de eletroforese (agarose 0,8%).

2.11.4- EXTRAÇÃO DE DNA DA LINHAGEM H6 *T.rubrum*

Três placas inoculadas por pontos da linhagem H6 foram cultivadas por 15 dias e em seguida estas colônias foram transferidas para um meio líquido Sabouraud a 28°C durante 4 dias para que ocorresse o crescimento micelial do fungo. Após o crescimento micelial as culturas foram coletadas e filtradas através de um funil de Buchner.

A extração de DNA do micélio resultante do filtrado foi realizada conforme está descrito no item 2.11.3.

2.11.5– CLIVAGEM DE DNA DA LINHAGEM *terbA7* de *A. nidulans* COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO

Clivagens parciais de DNA da linhagem *terbA7*, executadas pela enzima de restrição EcoRI em intervalos de 15, 30, 45 e 60 minutos, resultou nos fragmentos que fazem parte da biblioteca instantânea da linhagem *terbA7*, que foi utilizada na transformação inter-específica. A clivagem do DNA por enzimas de restrição foi realizada nos tampões e condições descritas pelo fabricante (Pharmacia Biotech®). A reação foi interrompida por inativação térmica (65°C) e resolvida em gel de agarose.

2.11.6– OBTENÇÃO DE PROTOPLASTO DE *T.rubrum*

Uma aliquota 100µl de suspensão de conídios de concentração 10^7 conídios/ml da linhagem H6 de *T.rubrum* foram inoculados em 300 ml de meio Sabouraud líquido e cultivados por 23 horas a 28°C.

À massa micelial obtida, após a centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos foram adicionados 20 ml de KCl 0,6 M, 10 mg de mutanase e por último 0,4 ml de MgSO₄. Em seguida esta mistura foi incubada por 4 horas a 32°C em agitação de 60 rpm, para a obtenção dos protoplastos.

A solução de protoplastos foi centrifugada por três vezes, sendo que, na primeira vez por 10 minutos e ressuspensa em 20 ml de solução CT, na segunda vez por 5 minutos e ressuspensa em 20 ml de DTe por último, por 5 minutos ressuspensa em 500 µl da solução DT.

2.11.7- TRANSFORMAÇÃO INTER-ESPECÍFICA

(May *et al* 1989, Vollmer e Yanofsky 1986)

A uma alíquota de 100µl da solução de protoplastos da linhagem H6 de *T. rubrum*, contendo cerca de 10^7 protoplasto/ml em solução DT foram adicionados 1,0µg de DNA digerido da linhagem *terbA7* de *A. nidulans*, 0,7µg do plasmídeo autoreplicativo pAB4-Rp1 e 50µl de tampão ET. Esta mistura foi incubada em banho de gelo por 20 minutos, em seguida acrescentou-se 1ml de solução ET e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. À solução dos protoplastos transformados foram acrescentados 5ml de solução de meio de regeneração MMS com ágar (0,8%), pré-aquecidos a 47°C e a mistura foi espalhada em placas de Petri contendo o mesmo meio de regeneração MMS com ágar (1,5%) suplementado com terbinafina (1,0 µg/ml). As placas foram incubadas a 28°C por cerca de 7 dias para a obtenção de colônias transformantes. O controle se constituiu de placas contendo todos os componentes citados acima, menos o DNA transformante da linhagem *terbA7* de *A. nidulans*. Após a obtenção das colônias transformantes de *T. rubrum*, estas foram transferidas para o meio Sabouraud sólido contendo 1,0µg/ml de terbinafina.

3. RESULTADOS

3.1 – ISOLAMENTO DOS MUTANTES RESISTENTES AO ANTIMICÓTICO TERBINAFINA.

A curva de sobrevivência da linhagem *pabaA1* à luz ultra violeta (Cuadros,1996) mostrou que o intervalo de tempo ideal para a obtenção de mutantes (com sobrevivência de 5%) foi ao redor de 5 minutos de irradiação (Figura 3).

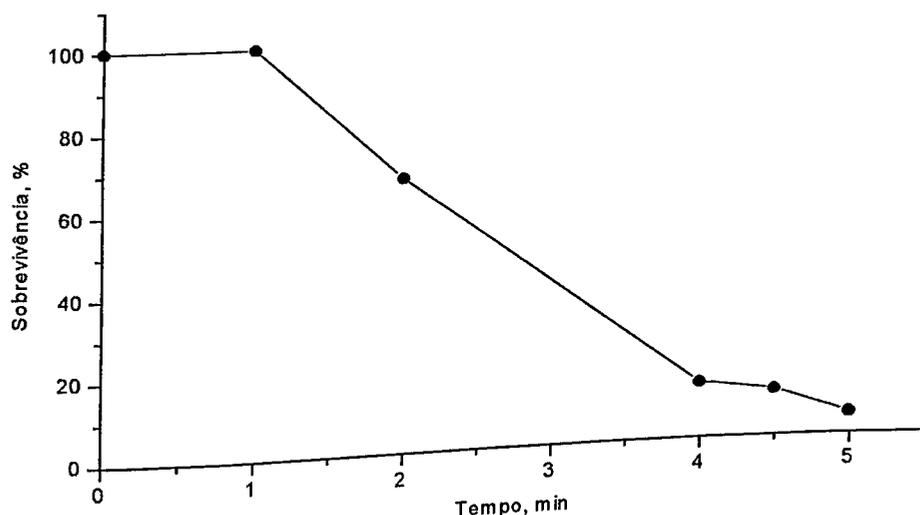


Figura 3 – Curva de sobrevivência da linhagem *pabaA1* de *A. nidulans* em relação ao tempo de irradiação com luz ultravioleta (Cuadros,1996).

Utilizando-se 5 minutos de irradiação com luz ultravioleta, nas condições descritas no item 2.6.2, obteve-se várias colônias, em meio completo suplementado com terbinafina (1,0-2,5µg/ml). Quatro colônias foram isoladas e caracterizadas, quanto ao nível de resistência à terbinafina. Duas destas foram analisadas geneticamente (Figura 4).

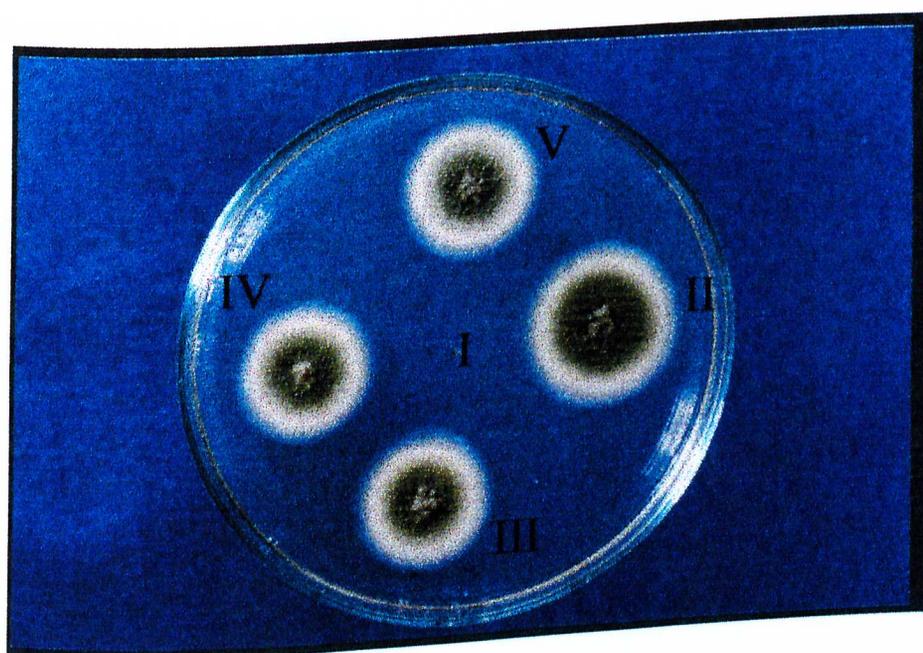


Figura 4- Mutantes obtidos da linhagem *pabaA1* por irradiação com luz ultravioleta, cultivados em meio completo na presença da terbinafina 1,0 $\mu\text{g/ml}$. I-*pabaA1*, II-*terbA7*, III- *terbA8*, IV- *terbA9* e V- *terbA10*.

3.2 – CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES RESISTENTES À TERBINAFINA: CURVA DOSE RESPOSTA

Após o isolamento dos quatro mutantes denominados *terbA7*, *terbA8*, *terbA9*, *terbA10*, foi possível caracterizá-los frente ao antimicótico terbinafina, pela medida dos diâmetros de suas colônias, quando cultivados em meio completo suplementado com várias concentrações desta droga.

A figura 5 mostra as curvas dose-resposta dos mutantes e segregantes resistentes à terbinafina comparadas com a da linhagem controle *pabaA1*. A partir destas curvas calculou-se a dose efetiva que causa 50% de redução no diâmetro das colônias de cada linhagem (ED_{50}) (Tabela 1). Pode-se verificar que os segregantes n^{os} 1 e 2, provenientes do cruzamento *terbA7* x MSF, apresentam altos níveis de resistência, comparados com os mutantes *terbA7*, *terbA8*, *terbA9*, *terbA10*. Foi também observado que o perfil de resistência à terbinafina dos 4 mutantes são semelhantes (Figura 5).

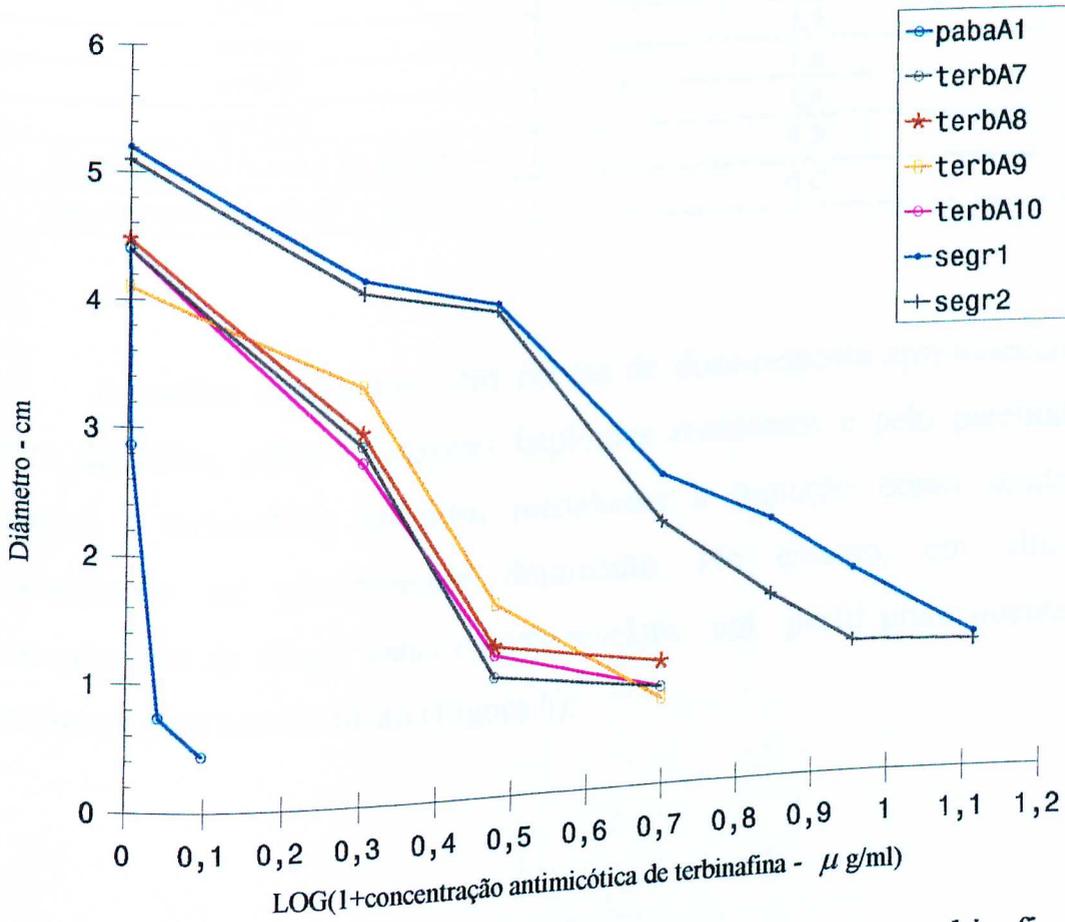


Figura 5- Curvas dose resposta frente ao antimicótico terbinafina. Linhagens cultivadas em meio completo suplementadas ou não com terbinafina. Cada ponto corresponde a média de 3 repetições.

Tabela 1– ED50 da terbinafina para as linhagens *pabaA1*, *terbA7*, *terbA8*, *terbA9*, *terbA10*, *segregante1* e *segregante2*.

Linhagem	ED ₅₀ (µg/ml)
<i>pabaA1</i>	0,03
<i>terbA7</i>	1,5
<i>terbA8</i>	1,5
<i>terbA9</i>	1,8
<i>terbA10</i>	1,4
<i>Segregante1(terbA7x MSF)</i>	4,5
<i>Segregante2(terbA7 x MSF)</i>	4.0

A análise comparativa das curvas de dose-resposta apresentadas pelos diplóides, pelas linhagens haplóides resistentes e pelo parental sensível à terbinafina, permitiu reconhecer a mutação como sendo codominante ou parcialmente dominante. No entanto, em altas concentrações da droga, estas curvas revelam um perfil praticamente dominante para esta mutação (Figura 6).

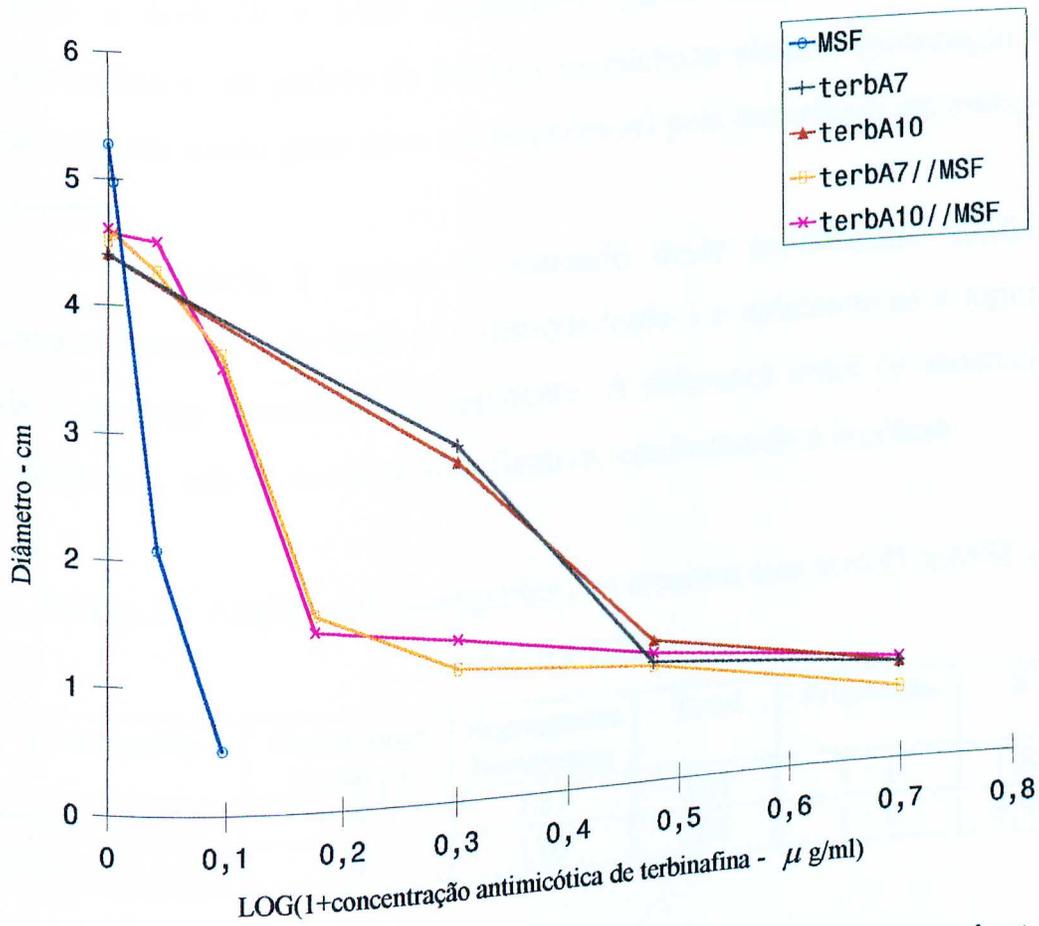


Figura 6- Curvas dose-resposta das linhagens diplóides heterozigotos (*terbA7//MSF*) e (*terbA10//MSF*) e suas respectivas linhagens parentais haplóides (resistentes) *terbA7* e *terbA10* e do parental (sensível) MSF.

3.3 – ANÁLISE GENÉTICA

3.3.1 – DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE LOCI ENVOLVIDO NA RESISTÊNCIA DE CADA LINHAGEM.

O resultado da segregação meiótica dos cruzamentos *terbA7* x MSF e *terbA10* x MSF mostraram que a marca da resistência à terbinafina é um padrão de herança mendeliana simples (proporção 1:1) ou seja, um único gene deve ser responsável pela resistência em ambos os mutantes.

A Tabela 2 mostra o resultado deste experimento analisado estatisticamente pelo teste χ^2 (qui-quadrado) e aplicando-se a hipótese da proporção 1 sensível : 1 resistente. A diferença entre os sensíveis e resistentes, não se mostrou significativa, confirmando a hipótese.

Tabela 2 – Análise dos segregantes dos cruzamentos *terbA7* x MSF e *terbA10* x MSF

Cruzamento	Segregantes Sensíveis	Segregantes Resistentes	Total	Proporção	χ^2
<i>terbA7</i> x MSF	137	127	264	1 : 1	1,89
<i>terbA10</i> x MSF	148	116	264	1 : 1	3,90

3.3.2 – LOCALIZAÇÃO DO CROMOSSOMO QUE CONTÉM O GENE DE RESISTÊNCIA À TERBINAFINA

A análise dos segregantes mitóticos provenientes dos cruzamentos *terbA7* x MSF e *terbA10* x MSF mostrou que o gene responsável pela resistência à terbinafina está localizado no grupo de ligação IV, pois entre os 20 segregantes analisados de cada cruzamento, não houve qualquer

recombinação entre os marcadores *pyroA4*, presente no cromossomo IV, e o de resistência à terbinafina (tabelas 3 e 4 e Figura 7).

Tabela 3 – Análise mitótica dos segregantes haplóides do cruzamento *terbA7* x MSF quanto à segregação da marca de resistência à terbinafina.

Marcadores Genéticos	Grupo de ligação	Segregantes	
		Sensíveis	Resistentes
<i>pabaA</i> ⁺	I	4	5
<i>pabaA</i>		6	5
<i>acrA</i> ⁺	II	4	5
<i>acrA</i> ⁻		7	4
<i>galA</i> ⁺	III	6	3
<i>galA</i> ⁻		5	6
<i>pyroA</i> ⁺	IV	0	12
<i>pyroA</i> ⁻		8	0
<i>facA</i> ⁺	V	6	0
<i>facA</i> ⁻		5	9
<i>sBA</i> ⁺	VI	3	4
<i>sBA</i> ⁻		8	5
<i>nicA</i> ⁺	VII	5	5
<i>nicA</i> ⁻		6	4
<i>riboA</i> ⁺	VIII	3	4
<i>riboA</i> ⁻		8	5

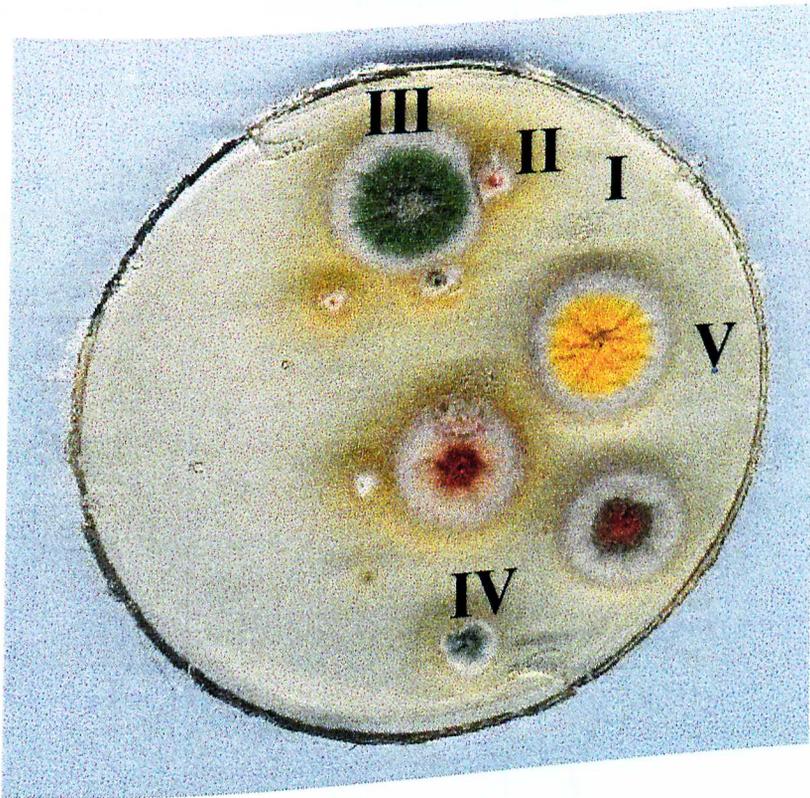


Figura 7 – Segregantes mitóticos do cruzamento *terbA10* x MSF, cultivados em meio completo na presença da terbinafina 1,0 $\mu\text{g/ml}$, por 3 dias. I- Segregante sensível; II- Segregante resistente; III- Segregante hiper-resistente; IV- *terbA10* e V- MSF

Tabela 4 – Análise mitótica dos segregantes haplóides do cruzamento *terbA10* x MSF quanto à segregação da marca de resistência à terbinafina.

Marcadores Genéticos	Grupo de ligação	Segregantes	
		Sensíveis	Resistentes
<i>pabaA</i> ⁺	I	2	5
<i>pabaA</i> ⁻		5	8
<i>acrA</i> ⁺	II	5	4
<i>acrA</i> ⁻		2	9
<i>galA</i> ⁺	III	5	7
<i>galA</i> ⁻		2	6
<i>pyroA</i> ⁺	IV	0	13
<i>pyroA</i> ⁻		7	0
<i>facA</i> ⁺	V	4	7
<i>facA</i> ⁻		3	6
<i>sBA</i> ⁺	VI	5	7
<i>sBA</i> ⁻		2	6
<i>nicA</i> ⁺	VII	5	6
<i>nicA</i> ⁻		2	7
<i>riboA</i> ⁺	VIII	3	5
<i>riboA</i> ⁻		4	8

3.3.3 – MAPEAMENTO DOS LOCI MUTANTES EM SEUS CROMOSSOMOS

A localização do *locus* que confere resistência à terbinafina foi definida através da análise meiótica, conforme descrito no item 2.8.4. O resultado desta análise confirma que a mutação que confere resistência à terbinafina no mutante *terbA7* está localizada no cromossomo número IV, a uma distância de cerca de 34,09 Unidades de Recombinação do

marcador *pyroA4*, também presente no grupo de ligação IV de *A. nidulans*. O cálculo da distância gênica foi realizado pela relação entre o número de indivíduos recombinantes e o número de indivíduos analisados. A distância gênica entre *pyroA4* e a mutação, *terbA10* foi de 31,06 unidades de recombinação (Tabelas 5 e 6 e Figura 8).

Tabela 5 – Análise meiótica do cruzamento *terbA7* x MSF.

Marcador Genético do cromossomo IV	Segregantes Resistentes	Segregantes Sensíveis	Porcentagem de recombinantes (unidades de mapa)
<i>pyroA</i> ⁺	99	31	34,09 %
<i>pyroA</i> ⁻	59	75	
Total	158	106	264

Tabela 6 – Análise meiótica do cruzamento *terbA10* x MSF.

Marcador Genético do cromossomo IV	Segregantes Resistentes	Segregantes Sensíveis	Porcentagem de recombinantes (unidades de mapa)
<i>pyroA</i> ⁺	83	28	31,06 %
<i>pyroA</i> ⁻	54	99	
Total	137	127	264

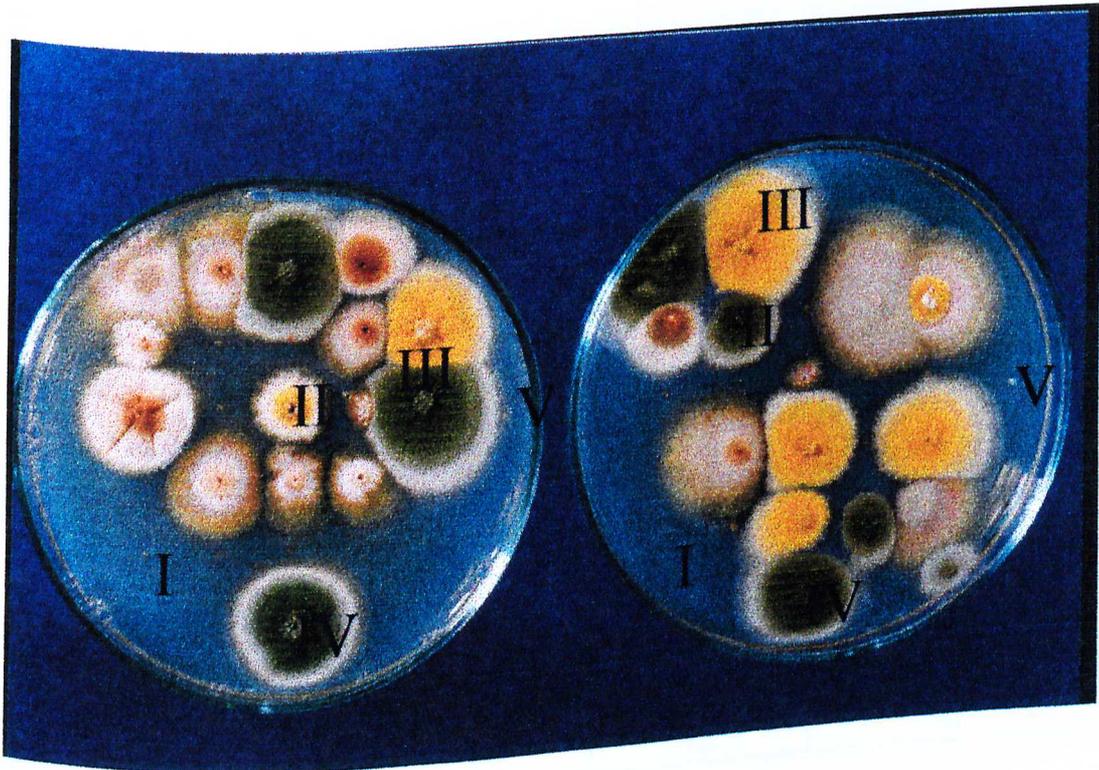


Figura 8- Segregantes meióticos do cruzamento *terA10* x *MSF*, cultivados em meio completo na presença da Terbinafina 1,0 μ l/ml. I- Segregante sensível, II- Segregante resistente, III- Segregante hiper-resistente, IV- *terbA10* e V- *MSF*.

3.3.4 – TESTE DE ALELISMO

Para determinar se as mutações que conferem resistência à terbinafina mapeadas no mesmo cromossomo, são alélicas ou não, foi realizado um cruzamento entre dois segregantes mitóticos *terbA7(6)* x *terbA10(9)*.

A análise dos segregantes meióticos deste cruzamento mostrou alelismo entre os genes *terbA7* e *terbA10*, pois 100% das colônias segregantes deste cruzamento se mostraram resistentes à terbinafina (1,0 µg/ml). Os resultados podem ser vistos na tabela 7.

Tabela 7 – Análise meiótica do cruzamento *terbA7(6)* x *terbA10(9)*.

Cruzamento	Segregantes Sensíveis	Segregantes resistentes	Porcentagem de recombinantes
<i>terbA7(6)</i> x <i>terbA10(9)</i> .	0	72	0

3.4 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CIM) PARA A TERBINAFINA

Os valores da concentração mínima inibitória (CIM) da terbinafina para a linhagem H6 de *T. rubrum* e para as linhagens *pabaA1*, *terbA7* e diplóide de *A. nidulans* estão mostrados na tabela 8.

Tabela 8 - Valores da concentração Inibitória (CIM) de terbinafina para linhagem H6 de *T. rubrum*, e para as linhagens *pabaA1*, *terbA7* e diplóide (*terbA7*//MSF) de *A. nidulans*.

CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
Linhagens	Terbinafina
H6	0,1
<i>pabaA1</i>	0,1
<i>terbA7</i>	>20,0
<i>terbA7</i> //MSF	>20,0

3.5-MÉTODO DE DETECÇÃO DE MUTAÇÕES INDUZIDAS

3.5.1 -EFEITO DO ANTIMICÓTICO TERBINAFINA NA SOBREVIVÊNCIA E FREQUÊNCIA DE REVERSÃO DA LINHAGEM *biA1methG1* PARA INDEPENDÊNCIA DE METIONINA

Os resultados mostraram que a terbinafina aumentou a frequência de aparecimento de revertentes metionina-independente quando comparada com a reversão espontânea (Tabela 9).

3.5.2 - INDUÇÃO DE SETORES EM LINHAGENS HAPLÓIDES E DIPLÓIDES DE *A. nidulans*.

Linhagens analisadas (resistentes e sensíveis) mostraram um alto índice de setorização na presença da droga terbinafina, como mostrados na Figura 9 e Tabela 10. Na Tabela 10 pode-se verificar que a frequência do aparecimento de setores depende da concentração da droga e também da linhagem analisada.

Tabela 9- Efeito do antimicótico terbinafina na sobrevivência e frequência de reversão da linhagem *biAlmthG1* para independência de metionina.

Concentração de Terbinafina (µg/ml)	Nº de conídios viáveis X 10 ⁶	nº de conídios sobreviventes X 10 ⁶	% sobre-viventes	nº e tipo de revertentes*				Revertentes/10 ⁶ sobreviventes				FRT/FRE**					
				A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D		
0	7.2	7.2	100	46	92	35	4	6.4	12.8	4.9	0.6						
0,005	7.2	4.6	63.3	39	87	21	7	8.5	18.2	4.6	1.5	1,32	1,42	0,93	2,5		
0,01	8.1	2.5	31.1	30	101	16	16	12.0	40.4	6.4	6.4	1,87	3,15	1,30	10,66		
0,02	9.0	2.1	23.3	39	66	4	27	18.2	31.2	1.9	12.8	2,84	2,43	0,38	22,33		

* A: colônias normais; B: colônias marrons com poucos conídios; C: colônias com halo hialino; e D: colônias brancas compactas.

**FRT: frequência de reversão após tratamento; FRE: frequência de reversão espontânea



Figura 9- Produção de setores em linhagens diplóides e haplóides de *A. nidulans*. I- Diplóide em meio completo; II- Setores do diplóide em meio completo suplementado com terbinafina (0,1 $\mu\text{g/ml}$); III- Setores da linhagem *biA1methiG1* em meio completo suplementado com terbinafina (0,03 $\mu\text{g/ml}$); IV- Setores da linhagem *terbA7* em meio completo suplemento com terbinafina (6,0 $\mu\text{g/ml}$)

Tabela 10- Número de setores das linhagens haploídes e diploídes de *A. nidulans* obtidos em meio completo suplementado com terbinafina

Conc. da droga ($\mu\text{g/ml}$)	N ^{os} de setores*										
	<i>pabaA1</i>	<i>terbA7</i>	<i>terbA8</i>	<i>terbA9</i>	<i>terbA10</i>	<i>terbA7//MSF</i>	<i>terbA10//MSF</i>				
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
0,1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0,25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8
1,0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	10	11
2,0	0	8	4	4	5	14	14	5	7	14	12
4,0	0	1	9	8	7	inúmeros	inúmeros	7	7	inúmeros	inúmeros

* Setores obtidos de 3 colônias após o cultivo por 72h a 37°C.

5.3 – INDUÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE CLEISTOTÉCIO

A terbinafina se mostrou capaz de estimular a produção de cleistotécio nas linhagens haplóides *terbA7* e *biA1methG1* e também em diplóides, quanto cultivados em meio completo. O aparecimento destas estruturas na linhagem *terbA7* ocorreu em várias concentrações de terbinafina (4,0-12,0 $\mu\text{g/ml}$). A Figura 10 mostra a linhagem *terbA7* inoculada por suspensão de conídios em meio completo suplementado com terbinafina. Observa-se a formação de "anéis" de cleistotécios durante o desenvolvimento das colônias.

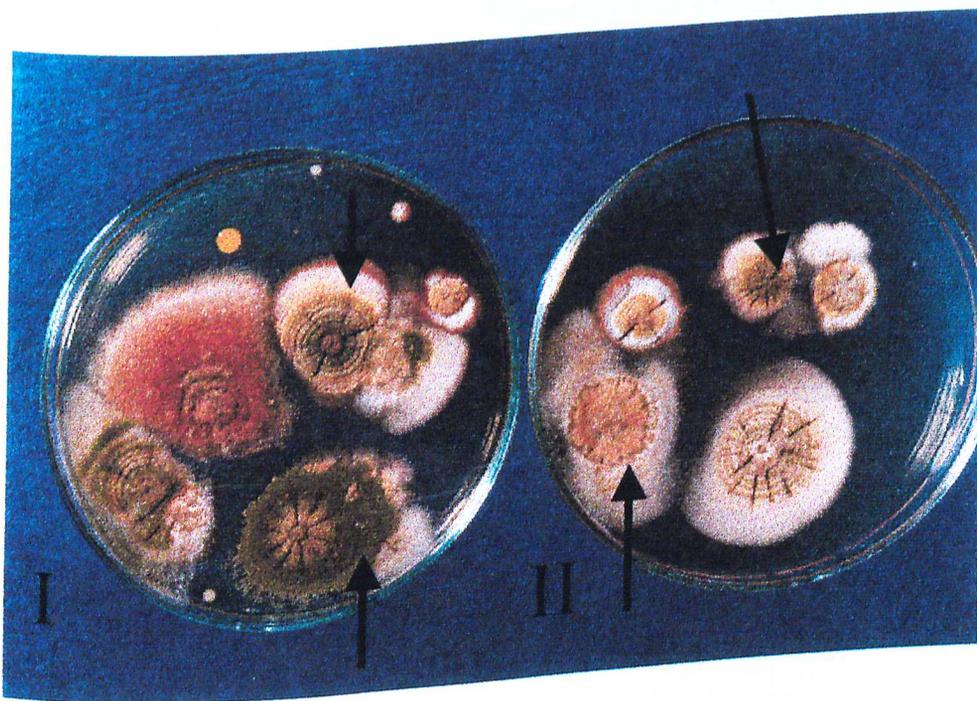


Figura 10- Produção de cleistotécio pela linhagem *terbA7* de *A. nidulans* na presença terbinafina (6,0 $\mu\text{g/ml}$) (I) e (12,0 $\mu\text{g/ml}$) (II)

3.6 – OBTENÇÃO DE TRANSFORMANTES DE *T. rubrum*

A Tabela 8 nos mostra que os resultados dos CIMs (concentrações mínimas inibitórias) da terbinafina foi de 0,1 µg/ml tanto para a linhagem *pabaA1* de *A. nidulans*, quanto para a H6 de *T. rubrum*, e de >20,0 µg/ml para as linhagens *terbA7* e *terbA7//MSF*. Para obtenção do transformante de *T. rubrum* utilizamos como meio seletivo 1,0 µg/ml de terbinafina, concentração deduzida dos resultados citados acima. A figura 11 mostra uma colônia transformante de *T. rubrum* com o DNA da linhagem *terbA7* de *A. nidulans*. Verifica-se que este transformante é pelo menos 10 vezes mais resistente à terbinafina que a linhagem receptora H6. Não foi avaliada a viabilidade deste transformante em concentrações maiores que 1 µg/ml de terbinafina. Como pode ser verificado na Figura 11 a morfologia da colônia transformante é um pouco diferente da linhagem original H6 cultivada em Sabouraud. Outro fato observado neste transformante foi a presença de uma pigmentação esverdeada no reverso da colônia. Esta pigmentação é comum no gênero *Trichophyton*, mas é ausente na linhagem H6, que foi utilizada como receptora neste experimento.



Figura 11- - Linhagem H6 de *T. rubrum* em meio Sabouraud (I);
Transformante em meio Sabouraud com terbinafina (1,0 µg/ml) (II).

4 – DISCUSSÃO

4.1-ANÁLISE GENÉTICA

A análise genética dos mutantes *terbA7* e *terbA10* mostrou que, em ambas as linhagens, um único gene, localizado no cromossomo IV, estava envolvido com a resistência à terbinafina e que estas mutações são alelos (Tabelas 2,3,4 e 7). Além disso, os dados da tabela 1 e da figura 5 mostram que os mutantes *terbA7*, *terbA8*, *terbA10* possuem valores de ED50 muito próximos. Este resultado sugere que a mutação que confere resistência à terbinafina aos mutantes poderia ter ocorrido em único gene.

Também foi observado que os diplóides provenientes dos cruzamentos *terbA7* x MSF e *terbA10* x MSF, em baixa e médias concentrações de terbinafina possuíam um caráter codominante ou de dominância parcial, mas em altas concentrações comportavam-se como dominante (Figura 6).

É provável que este caráter dominante da resistência nos diplóides, quando em altas concentrações da droga, seja devido a uma interação entre o gene de resistência à terbinafina com o gene *acrA1*, que confere resistência à acriflavina (Roper e Kafer, 1957), presente no cromossomo II. Segregantes mitóticos e meióticos dos cruzamentos das linhagens *terbA7* e *terbA10* com a MSF que possuíam esta interação mostraram ser mais resistentes à esta droga que os segregantes que possuíam apenas o gene de resistência à terbinafina. Além disso, os diâmetros destas colônias eram maiores que das linhagens resistentes que possuíam apenas o gene *acrA1* e a linhagem MSF se mostraram tão sensíveis à terbinafina quanto a linhagem controle *pabaA1* (sensível à terbinafina e à acriflavina).

Duas colônias hiper-resistentes, provenientes do cruzamento *terbA7* x MSF, foram caracterizadas quando ao ED50 e denominadas de segregantes 1 e 2. Estes segregantes tiveram um perfil de ED50 muito semelhante entre si e comprovaram a alta resistência conferida pela interação gênica (Tabela 1 e Figura 5).

Quando mais de um loco confere resistência à uma determinada droga, efeitos aditivos podem ser observados nas linhagens recombinantes que carregam mais que uma mutação (Tuyl, 1977). Tal interação positiva nos recombinantes é conhecido para ciclohexamida em *S. cerevisiae* (Wilkie e Lee, 1965) para benomil em *A. nidulans* (Martinez-Rossi e Azevedo, 1989), entre outros.

No entanto, neste caso específico o alelo *acrA1*, como já mencionado, não confere resistência à terbinafina nas linhagens que possuem o alelo *terbA* selvagem. O fenômeno difere portanto, de interações gênicas clássicas.

A interação entre os genes de resistência à terbinafina e à acriflavina, que ocorrem nos segregantes 1 e 2, ainda não está esclarecido. Várias hipóteses podem ser levantadas para explicá-la, por exemplo a de que o gene da resistência à acriflavina está de algum modo beneficiando o gene ou produto gênico que confere a resistência à terbinafina. Uma outra hipótese é a de que os genes *terbA* e *acrA* estejam envolvidos com transportadores de multidrogas tipo ABC ou à reguladores da transcrição do mecanismo de resposta ao estresse provocado por drogas.

A hipótese de que os produtos dos genes *terbA* e *acrA* sejam transportadores de multidrogas é suportada primeiramente pelos resultados de Sanglard *et al.* (1995, 1996, 1997) que descrevem em *C. albicans* um gene que promove resistência a vários inibidores, inclusive à terbinafina. Além disso, alelos mutantes que conferem resistência à acriflavina e simultaneamente

promovem resistência à azóis foram descritos em *N. crassa* (Akiyama e Nakashima, 1996) e para o próprio alelo *acrA1* de *A. nidulans* (Pereira, 1997).

Portanto, tanto o *acrA* quanto o *terbA* são genes relevante para os fungos e devem ser abordados, futuramente, sob o ponto de vista molecular e fisiológico para melhor compreendermos suas funções nas células.

4.2 – SETORIZAÇÃO, MUTAGENICIDADE E PRODUÇÃO DE CLEISTOTÉCIO

As linhagens resistentes e sensíveis de *A. nidulans* analisadas neste trabalho mostraram um alto índice de setorização em determinadas concentrações de terbinafina (Tabela 10). Partindo desta observação foi realizado um teste para verificar se a terbinafina possuía atividade mutagênica, utilizando-se para isto o sistema de reversão para independência de metionina em *A. nidulans*, que determina mutação do tipo pontual (Lilly, 1965). A vantagem da utilização deste sistema de reversão para metionina para se detectar a atividade mutagênica de uma droga é que vários marcadores genéticos são simultaneamente ensaiados. Os resultados mostraram que a terbinafina aumentou a frequência de aparecimento de revertentes, quando comparada com frequência de reversão espontânea (Tabela 9). A terbinafina também, se mostrou capaz de induzir o surgimento de setores em linhagens haplóides e diplóides em *A. nidulans* (Figura 9). Estes resultados sugerem, portanto, que a terbinafina além de inibidor enzimático possui direta ou indiretamente um efeito mutagênico em *A. nidulans*.

Embora a mutagenicidade de uma substância possa ser facilmente identificada em sistemas procariontes, foi sugerido que normas para sua

utilização fossem elaboradas somente quando a sua atividade mutagênica tivesse sido ensaiada em pelo menos dois sistemas eucariontes (Sobels, 1977).

No entanto, sabe-se que o ergosterol está envolvido na distribuição dos cromossomos durante a divisão celular mitótica e que os inibidores da biossíntese do ergosterol, como por exemplo os derivados do imidazol e os triazóis, podem de alguma forma interferir nesta distribuição cromossômica e determinar a não-disjunção dos cromossomos durante a fase da divisão celular mitótica (Bellicampi *et al.*, 1980). Como a terbinafina também atua na biossíntese do ergosterol é provável que ela interfira na distribuição dos cromossomos na mitose. Isto parece ser verdade quando se observa a presença de setores em linhagens haplóides e diplóides na presença desta droga (Figura 9 e Tabela 10).

Além disso, foi observado o aparecimento de uma estrutura de reprodução sexual chamada cleistotécio nas linhagens haplóides *terbA7*, *pabaA1*, *biA1methG1* e diplóides, em meio completo na presença da droga terbinafina (Figura 10). Em fungos filamentosos não é bem compreendida a morfogênese do cleistotécio, mas sabe-se que seu desenvolvimento é a partir de uma estrutura filamentosa chamada de conidióforo (Champe *et al.*, 1987).

Na espécie *A. nidulans* a limitação nutricional induz enzimas proteolíticas, imprescindíveis na hidrólise de parte das hifas, assegurando a sobrevivência destas formas de esporos latentes (Cohen, 1977).

Zonneveld (1974) observou que durante a transformação morfológica da estrutura filamentosa (conidióforo) em estrutura esférica (cleistotécio), ocorria o aparecimento da enzima α glucanase que hidrolisa α (1-3)-glucana da parede celular da hifa. Durante a catálise enzimática são liberadas moléculas de glicose que serão utilizadas como fonte de carbono e energia necessária para a formação da biomassa do cleistotécio. Mutantes deficientes

para esta enzima são mutantes para a formação dos cleistotécios (Martinelli e Bainbrige, 1974 e Polacheck e Rosenberger, 1977).

A terbinafina é um inibidor da biossíntese do ergosterol. A conseqüente ausência do ergosterol e o acúmulo de esqualeno provocados por esta inibição afetam a estrutura da membrana plasmática. A má formação da estrutura da membrana e conseqüentemente da parede celular poderia ser um sinal para as enzimas proteolíticas iniciarem o processo de degradação das hifas e conseqüentemente a formação de cleistotécio.

4.3 – TRANSFORMAÇÃO

Muitos fungos patogênicos e de interesse econômico são pouco caracterizados geneticamente, o que dificulta o estudo de seus genes. Organismos modelos tais como *S. cerevisiae*, *N. crassa* e *A. nidulans* são, portanto, valiosos instrumentos para o conhecimento da estrutura e função gênica nestes fungos.

Genes clonados de fungos modelos podem ser utilizados para identificar e isolar genes correlatos em fungos patogênicos, assumindo-se a conservação de seqüência e de função (Agnan *et al.*, 1997).

Neste estudo, foi utilizado o genoma tal de uma linhagem de *A. nidulans* resistente, à terbinafina para complementar uma linhagem de *T. rubrum* sensível a esta droga. Esta abordagem foi possível porque o alelo mutante *terbA7* se mostrou codominante quando em diplóide heterozigoto. Neste caso a linhagem receptora deve ter o alelo recessivo para ser complementada pelo alelo dominante.

Embora não exista um sistema de transformação em *T. rubrum*, com outro marcador seletivo além da sensibilidade à terbinafina, obtivemos algumas colônias que se desenvolveram muito bem em meio de cultivo suplementado com esta droga.

O transformante analisado manteve a morfologia característica da linhagem receptora H6, mas apresentou-se pigmentado no lado reverso da colônia (Figura 11).

O isolamento do fragmento de DNA de *A. nidulans*, inserido no *T. rubrum*, que provavelmente se encontra integrado no plasmídio autoreplicativo pAB4-ARp1, deve ocorrer em experimentos de transformação da bactéria *E. coli* DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *thi1*, *relA1*], sensível a ampicilina.

Complementação heteróloga é mais provável ocorrer entre organismos relacionados filogeneticamente. No entanto, genes clonados por complementação de função podem ser um supressor da função ou o próprio gene correspondente àquela função.

De qualquer modo, a protoplastização e a transformação em *T. rubrum* são inéditos e podem contribuir seguramente para desvendar o genoma deste importante patógeno humano.

5 – RESUMO

A terbinafina é um droga que vem sendo muito utilizada em humanos no tratamento de infecções causadas por fungos. Este antimicótico, pertencente ao grupo das alilaminas, atua bloqueando a biossíntese do ergosterol, o principal esterol do fungos, inibindo a enzima esqualeno epoxidase. Com objetivo de melhor compreender o mecanismo da resistência a esta droga, linhagens mutantes resistentes, obtidas após irradiação com luz ultravioleta, foram isoladas em *Aspergillus nidulans* e estudadas do ponto de vista genético e fisiológico. Dois destes mutantes (*terbA7* e *terbA10*), que possuem um alto nível de resistência, foram cruzados com a linhagem Master F (MSF). A análise genética revelou que em ambos os mutantes um único gene é responsável pela resistência à terbinafina. Estes genes são alelos e estão localizados no cromossomo IV, a cerca de 34 unidades de recombinação do marcador *pyroA4*. A análise do nível de resistência à terbinafina das linhagens diplóides *terbA7 // MSF* e *terbA10 // MSF* revelou que os alelos responsáveis pela tolerância a esta droga nos mutantes *terbA7* e *terbA10* têm um caráter codominante ou de dominância parcial, embora se comportem praticamente como dominantes em altas concentrações de terbinafina. Além disto, alguns segregantes mitóticos e meióticos apresentaram uma hiper-resistência à droga devido a interação entre o gene que confere resistência à terbinafina com o gene que confere resistência à acriflavina, o *acrA1*, presente no cromossomo II da linhagem MSF.

Linhagens analisadas (resistentes e sensíveis) mostraram um alto índice de setorização em determinadas concentrações da droga. Para verificar se a terbinafina possui atividade mutagênica, utilizamos o sistema de reversão para independência de metionina em *A. nidulans*. Os resultados indicaram

que a droga aumentou a frequência de aparecimento de revertentes quando comparada com a reversão espontânea. A terbinafina ainda se mostrou capaz de induzir o surgimento de setores em linhagens diplóides deste fungo. Estes resultados sugerem, portanto, que a terbinafina, além de inibidor enzimático, possui efeito mutagênico em *A. nidulans*. A terbinafina também se mostrou capaz de induzir a produção de cleistotécios durante o crescimento vegetativo deste fungo.

Experimentos de transformação, que tiveram como objetivo verificar a existência de recombinação heteróloga de função da resistência à terbinafina de *A. nidulans* no dermatófito *Trichophyton rubrum*, mostraram-se positivos. Os resultados preliminares indicaram que os transformantes de *T. rubrum*, obtidos com o uso de uma biblioteca instantânea do DNA de um mutante resistente à terbinafina de *A. nidulans*, apresentaram alta resistência à terbinafina quando comparado com a linhagem receptora, sugerindo uma expressão da função de resistência.

6- SUMMARY

Terbinafine is a drug extensively used for the treatment of fungal infections in humans. This antimycotic agent, belonging to the alilamine group, acts by blocking the biosynthesis of ergosterol, the major esterol of fungi, by inhibiting the enzyme squalene epoxidase. To better understand the mechanism of resistance to this drug, resistant mutant strains obtained after irradiation with ultraviolet light were isolated from *Aspergillus nidulans* and studied from genetic and physiological viewpoints. Two of these mutants (*terbA7* and *terbA10*), which are highly resistant, were crossed with the Master strain F (MSF). Genetic analysis revealed that a single gene is responsible for resistance to terbinafine in both mutants. These genes are alleles and are located in chromosome IV at about 34 recombination units from the *pyroA4* marker. Analysis of the level of resistance to terbinafine by the diploid strains *terbA7* // MSF and *terbA10* // MSF revealed that the alleles responsible for tolerance to this drug in the *terbA7* and *terbA10* mutants are of a parcial dominance or a codominant nature although they practically behave as dominant genes at high terbinafine concentrations. Furthermore, some mitotic and meiotic segregants presented hiper-resistance to the drug due to the interaction between the gene that confers resistance to terbinafine and the gene that confers resistance to acriflavin, *acrA1*, present in chromosome II of the MSF strain.

The resistant and sensitive strains analyzed showed a high index of sectorization at high concentrations of the drug. To determine whether terbinafine has mutagenic activity, we used the reversal system for methionine independence in *A. nidulans*. The results indicated that the drug increased the frequency of appearance of revertants compared to spontaneous reversal.

Terbinafine also showed the ability to induce the appearance of sectors in diploid strains of this fungus. Thus, these results suggest that terbinafine, in addition to being an enzyme inhibitor, has a mutagenic effect on *A. nidulans*. Terbinafine also proved to be able to induce the production of cleistothecia during the vegetative growth of this fungus.

Transformation experiments carried out in order to determine the existence of heterologous complementations of the function of resistance to terbinafine by *A. nidulans* in the dermatophyte *Trichophyton rubrum* yielded positive results. Preliminary data indicate that the transformants of *T. rubrum* obtained with the use of an instantaneous DNA library from an *A. nidulans* mutant resistant to terbinafine showed high resistance to terbinafine compared to the receptor strain, suggesting an expression of function.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGNAN, J., KORCH, C. e SELITRENNIKOFF, C. 1997. Cloning heterologous genes: problems and approaches. *Fungal Genetics and Biology* **212**:292-301.
- AKIYAMA, M., e NAKASHIMA, H. 1996. Molecular cloning of the *acr-2* gene which controls acriflavine sensivity in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Acta* **1307**:187-192.
- AZEVEDO, J. L. e SANTANA E. P. 1975. The use of cloroneb to obtain haploid segregants from heterozygous diploids of *Apergillus nidulans*. *Aspergillus News Letter* **13**:6.
- AOKI, Y.; YOSHIHARA, F. KONDOH, M. NAKAYAMA, N. e ARRISAWA, M. 1993. Ro 09-1470 is a selective inhibitor of P-450 lanosterol C-14 demethylase of fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**:2662-2667.
- AZEVEDO, J. L., OLIVEIRA A. e ROCHA CAMPOS A. J. 1976. Replicador multifio para transferência de esporos de fungos filamentosos. *Summa Phytologica* **237**-241.
- BADILLET, G. 1991. Les dermathophytes. Atlas clinique et biologique. Ed. Varia, Paris.

- BEGGS, J. D. 1978. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature (London)* **275**:104-109.
- BELICAMPI, D.; GUALANDI, G.; LA MONICA, E.; POLEY, C. e MORPURGO, G. P. 1980. Membrane-damaging agents cause mitotic non-disjunction in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Research* **79**: 169-172
- BRADLEY, G.; JURANKA, P. F. e LING, V. 1988. Mechanism of multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Acta* **945**:87-128.
- BROACH, J. R. 1981. The yeast plasmid 2 μ circle, p. 445-476. In J. N.° Strathern, E. W. Jones, and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- CASE, M. E.; SCHWEIZER M.; KUSGNER S.R. e GILES N.H. 1979. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:5259-5263.
- CLARK, F. S.; PARKISON, T.; HITCHOCK, C. A. e GOW, N. A. R. 1996. Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species. Possible role for drug efflux in drug resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**:419-425.

- CHAMPE, S. P.; RAO, P. e CHANG, A. W. 1987. An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* **133**:1383-1387.
- COHEN, B. L. 1977. The proteases of *Aspergillus*. In: *Genetics and Physiology of Aspergillus*. (SMITH, J.E. e PATERMAN, J.A., Eds), Academic Press, London, pp. 281-292.
- CUADROS, S. C. 1996. Caracterização genética-bioquímica da resposta adaptativa ao pH extracelular ao fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. Monografia apresentada à FFCLRP/USP para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. 50ps.
- DE BIÈVRE, C. DAUGUET, C. NGUYEN, VH. E IBRAHIM-GRANET, O 1987. Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolantes from clinical specimens. *Ann Instit Pasteur Microbial*. **138**: 719-727.
- DEL SORBO, G.; ANDRADE, A. C.; VAN NISTELROOY, J. G. M.; VAN KAN, J.A.L.; BALZI E. e DE WAARD, M. A. 1997. Multidrug resistance in *Aspergillus nidulans* involves novel ATP-binding cassette transporters. *Molecular General Genetics* **254**: 417-426.
- FINCHAM, J. R. S. 1989. Transformation in Fungi. *Microbiological Reviews* **53**:148-170.

GEORDOPAPADOKOU, N. H. e WALSH, T. J. 1996. Antifungal agents: chemoterapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 279-291.

GEORDOPAPADOKOU, N. H. e WALSH, T.J. 1994. Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **268**:371-373.

GONZALEZ, R., FERRER S., BUESA J., e RAMON D. 1989. Transformation of the dermatophyte *Thichophyton mentagrophytes* to Hygromycin B resistance. *Infection and Immunity* **57**:2923-2925.

GUPTA, K. A.; e SHEAR, H. N. 1997. Terbinafine: An update. *Journal of American Academy Dermatology* **37**:979-988.

HASTIE A. C. 1970. Benlate induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*: **226**:771.

HITCHOCK, C. A.; BARRET, K. J. e RUSSEL, N. J. 1986. The lipid composition of azole sensitive and azole-resistant strains of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* **132**:2421-2431.

HITCHOCK, C. A.; BARRET, K. J. e RUSSEL, N. J. 1987. The lipid and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant

mutant of *Candida albicans*. Journal of Medical and Veterinary Mycology **25**:29-37.

KELLY, S. L.; KENNA, S.; BLIGH, H. F. J.; WATSON, P. F.; KELLY, D. E.; STANSFIELD, I.; e ELLIS, S. W. 1990. Lanosterol to ergosterol enzymology. Inhibition and Genetics. I: KHUN, P. J.; TRINCI, A. P. S.; JUNG, M. J.; GOOSEY, M. W. e COPPING EDS, L. G. Biochemistry of walls and membranes in fungi. Springer – Verlag. Berlin. Heidelberg (Germany). pp 224-239.

KWON-CHUNG, K. J. e BENNET, J. E. 1992. Medical Mycology. Ed. Lea & Fediger, USA. pp 105-161.

LILLY, L. J. 1965. An investigation of the suitability of the suppressors of *meh-1* in *Aspergillus nidulans* for the study of induced and spontaneous mutation. Mutation research **2**:192-195.

MARTINELLI, S. D. e BAINBRIDGE, B. W. 1974. Phenoloxidases of *Aspergillus nidulans*. Transactions of the British Mycological Society **63**:361-370.

MARTINEZ-ROSSI, N. M. 1995. Agentes antimicóticos. Mecanismos de ação e resistência. Tese de livre-docência apresentada ao Departamento de Genética e Matemática aplicada a Biologia da Faculdade de Medicina de Riberão Preto, 118 pp.

- MARTINEZ-ROSSI, N. M. e AZEVEDO, J. L. 1989. Additive effect involving a new locus of benomyl resistance in *Aspergillus nidulans*. Mutation Research **96**:31-39.
- MARICHAL, P. e BOSSCHE, J. V. 1995 Mechanisms of resistance to azole antifungals. Acta Biochem. Pol. 42(4): 509-516.
- MAY, G., WARING, R. B. ; OSMANI, S. A.; MORRIS, N. R. e DIMESION, S. H. 1989. The coming of age of Molecular Biology in *Aspergillus nidulans*. Proceeding of the EMBO, ed. by H. Nevalainen and M. Pentilla, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research., **6**:11-20.
- MEDOFF, G.; NÁDASY, M E ANDRISHA V. 1988. Pesticide chemistry Studies in Environmental Science. Vol. 32. Elsevier 786pp.
- MISHRA, N. C.; SZABO G. e TANTUM, E. L. 1973. Nucleic acid induced genetic changes in Neurospora.. In M. C. Neu and S. J. Segal (ed.) The role of RNA in reproduction and development. Elsevier/North Holland Publishing Co., Amsterdam. p. 259-268.
- MISHRA, N. C. e TANTUM, E. L. 1973. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in Neurospora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**:3875-3879.

- NEYFAKH, A. A.; BIDNENKO, V. E. e CHEN, L. B. 1991. Eflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Biochemistry* **88**:4781-4785.
- PEREIRA, M. 1997. Efeitos pleitrópicos de marcadores genéticos em *Aspergillus nidulans*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, 83 pp.
- POLACHECK, I. e ROSENBERGER, R. F. 1977. *Aspergillus nidulans* mutant lacking α -(113)glucan, melanin, e cleistothecia. *Journal of Bacteriology* **132**:650-656.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MacDONALD, K. D. e BULTON, A. W. J. 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**: 141-238.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. e RITTER, J. M. 1997. *Farmacologia*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogon S. A, pp 15-20.
- ROPER, J. A., e KÄFER, E. 1957. Acriflavine-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **16**:660-667.
- RYDER, N. H. 1992. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. *Br. J. Dermatol.* **39**:2-7.

- RYDER, N. H. e BERTRAND F. 1997 Differential inhibition of fungal and mammalian squalene epoxidases by the benzylamine SDZSBA586 in comparison with the allylamine terbinafine. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **340**(2):265-269.
- RYDER, N. H., WAGNER, S. e LEITNER, I. 1998. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**:1057-1061.
- SANGLARD, D.; KUCHLER K.; ISCHER F.; PAGANI, J. L.; MONOD, M. e BILLE, J. 1995. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **39**:2378-2386.
- SANGLARD, D.; ISCHER F.; MONOD, M. e BILLEY, J. 1996. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transport mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrobial Agents e Chemother* **40**: 2300-2305.
- SANGLARD, D.; ISCHER F.; MONOD M. e BILLE, J. 1997. Cloning of *Candida albicans* genes fungal conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* **143**:405-416.

- SCHIRALD, G. F.; CÍCERO, S. L.; COLOMBO, M. D.; ROSSATO, D.; FERRARESE, M. e SORESI, E. 1996. Refractory pulmonary aspergillosis: compassionate trial with terbinafine. *Br. J. Dermatol* **46**:25-26.
- SOBELS, F.H. 1977. Some problems associated with the testing for environmental mutagens and perspective for studies in "comparative mutagenesis". *Mutation Research*, **46**:245-260.
- TILBURN, J., SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G. G.; ZABICKY-ZISSIMA, J. H.; LOCKINGTON, R. A. e DAVIS, R. W. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**:205-221.
- TIMBERLAKE, W. E. e MARSHALL, M. A. 1988. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* **4**:162-69.
- TRABULSI, L. R. 1986, *Microbiologia*. Rio de Janeiro, Ed. Atheneu, pp. 250-253.
- TUYL, J. M. van. 1977. Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. *Nederland Mededelingem Landbouwhogeschool Wageningen* **77**:136.