

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Resistência das Leveduras

Kluyveromyces marxianus e *Saccharomyces cerevisiae*

ao Fungicida Benomyl®

Yasodhara Silva Lacerda

RECIFE

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Resistência das Leveduras

Kluyveromyces marxianus e *Saccharomyces cerevisiae*

ao Fungicida Benomyl®

Yasodhara Silva Lacerda

Orientador: Prof^o. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

Co-orientador: Prof^a. Dra. Maria Raquel de Moura Coimbra

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Genética.

RECIFE

2002

Lacerda, Yasodhara Silva

Resistência das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* ao fungicida Benomyl® / Yasodhara Silva Lacerda. – Recife : O Autor, 2002.

36 folhas : il., fig., tab., gráf., fotos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2002.

Inclui bibliografia.

1. Genética molecular – Leveduras – Mecanismos genéticos de resistência. 2. *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* – Resistência ao fungicida Benomyl®. I. Título.

577.21
574.88

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
BC2004-238

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

Yasodhara Silva Lacerda

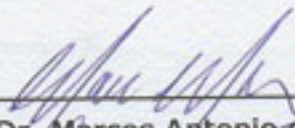
“Resistência das Leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* ao fungicida Benomyl®”


Área de Concentração: **GENÉTICA MOLECULAR**


A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera a candidata

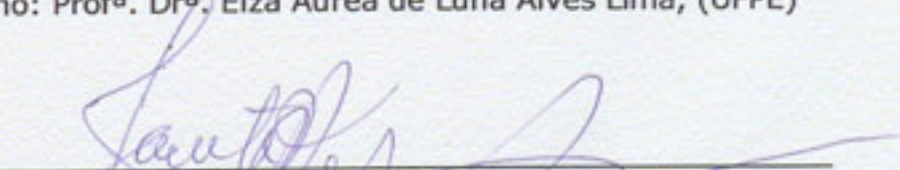
YASODHARA SILVA LACERDA como **aprovada**.

Recife, 29 de agosto de 2002.


Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Jr, (UFPE)


Membro Externo: Profª. Drª. Luzinete Acioli de Queiroz, (UFPE)


Membro Interno: Profª. Drª. Elza Áurea de Luna Alves Lima, (UFPE)


Membro Interno: Profª. Drª. Janete Magali de Araújo, (UFPE)


Coordenadora do Programa: Profª. Drª. Ana Maria Benko Iseppon, (UFPE)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	4 a
1- INTRODUÇÃO.....	5
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1-Biologia das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	7
2.2- Aspectos químicos do fungicida Benomyl®	9
2.3- Mecanismos de resistência ao Benomyl®.....	10
3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
4- MANUSCRITO.....	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Benomyl®	9
Figura 2. Função das proteínas transportadoras, na membrana plasmática de um fungo, durante o processo infeccioso de uma planta	12
Figura 3. Bombas de múltiplas drogas: transportadores das superfamílias ABC e MFS presentes na membrana plasmática da levedura.....	13
Figura 4. Curva de sobrevivência celular das linhagens <i>S. cerevisiae</i> CG379 e <i>K. marxianus</i> CBS6556 a diferentes concentrações do Benomyl®.....	27
Figura 5. Amplificação do gene <i>TUB2</i> a partir do DNA total das linhagens de levedura CG379 e CBS6556	27
Figura 6. Amplificação do gene <i>ICT1</i> a partir do DNA total das linhagens da levedura <i>S. cerevisiae</i> Itaiquara, Fleischmann, IA1238, CG379 e <i>K. marxianus</i> CBS6556.....	28
Figura 7. Amplificação do gene <i>ICT1</i> a partir do DNA total das linhagens industriais da levedura <i>S. cerevisiae</i> CR-1, AS-1, BG-1, MF68-1, MF18, IA1238, CG379, MF19-1, MF17-1, MF185 e MF181	29
Figura 8. Amplificação do gene <i>TUB2</i> a partir do DNA total das linhagens industriais da levedura <i>S. cerevisiae</i> CR-1, SA-1, BG-1, MF68-1, MF18, IA1238, MF17-1, MF181, MF185 e MF19-1	29
Figura 9. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de levedura cultivadas em meio YPD na presença de Benomyl® a 40 µg/ml	31
Figura 10. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de levedura cultivadas em meio YPD na presença de Benomyl® a 40 µg/ml	32
Figura 11. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de levedura cultivadas em meio YPD na ausência de Benomyl®.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações no gene <i>TUB2</i> em diferentes fungos resistentes ao Benomyl®	11
Tabela 2. Resultado da amplificação gênica específica a partir do DNA total das diferentes linhagens de levedura testadas para o crescimento celular na presença do fungicida Benomyl®.....	30

RESUMO

Investigações feitas com organismos que apresentam o fenótipo de resistência a compostos tóxicos são importantes nas áreas biotecnológica, clínica e agrícola. Neste trabalho, foi observada a correlação entre os níveis de resistência de células de levedura ao fungicida agrícola Benomyl® e a presença de determinados genes envolvidos com o processo. Uma linhagem selvagem da *K. marxianus* e várias linhagens industriais de *S. cerevisiae* foram testadas para a variação inter e intraespecífica desta resistência. A metodologia usada abordou os genes *TUB2* e *ICT1*. O gene *TUB2* codifica a proteína β -tubulina que está relacionada com a formação do citoesqueleto. Variações alélicas desta proteína estão relacionadas com a sensibilidade ao fungicida Benomyl®. O gene *ICT1* é componente do sistema MDR (*Multidrug Resistance*) de leveduras. Sua função é desconhecida, embora sua inativação parece promover sensibilidade as drogas. As análises da cinética do crescimento celular das linhagens testadas na presença de Benomyl®, juntamente com o perfil de amplificação gênica destes dois genes, sugerem um complexo mecanismo de defesa celular.

Palavras-chave: Resistência celular, leveduras, Benomyl®

ABSTRACT

Investigations on the toxic compound-resistant phenotypes by microorganisms are regarded as relevant within the bio-technological, clinic and farming fields. In this work, we aimed to identify the co-relation between the resistance levels of yeast cells to the fungicide Benomyl® and the presence of two yeast genes already related to have any influence in this response. A wild type strain of *K. marxianus* and several industrial strains of *S. cerevisiae* were surveyed for the inter and intraspecific variance of such resistance. The molecular approach included the detection of certain alleles of both *TUB2* and *ICT1* genes. The *TUB2* gene encodes the β -tubulin protein involved in cytoskeleton formation. Allele variation are involved in Benomyl® resistance phenotype. The *ICT1* gene is part of the MDR (*Multi-drug Resistance*) complex. Its biological function still unknown, although its inactivation causes drug sensitivity. The analysis on the cell growth kinetics, allied to the gene amplification profiles, suggested an intricate cell defense mechanism to this kind of drugs.

Key-words: Cell resistance, yeasts, Benomyl®

1- INTRODUÇÃO

Tem sido observado um significativo aumento no uso das leveduras como modelo de organismo eucarionte para o estudo de fenômenos celulares. Microrganismos classificados no Reino Fungi, os gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* possuem espécies de relevância para a aplicação humana. Pertencem ao filo Ascomycota, a classe Ascomycetes, a ordem Saccharomycetales e a família Saccharomycetaceae (Alexopoulos & Mims, 1996). As leveduras tem sido alvos de constantes investigações, principalmente a *S. cerevisiae*, devido a novos conhecimentos acerca do genoma e à facilidade de manipulação desse, gerando linhagens capazes de expressar uma determinada característica desejada.

A espécie *K. marxianus* apresenta uma fisiologia mais favorável à aplicação industrial e acadêmica quando comparada a *S. cerevisiae*. Entretanto, suas vantagens fisiológicas requerem uma melhor caracterização o que representaria, principalmente para o setor industrial, um avanço tecnológico expressivo. Uma das alternativas para estudar a *K. marxianus* é a investigação dos mecanismos de resistência às diferentes drogas.

Vários microrganismos produzem compostos tóxicos que atuam como agentes anti-microbianos eliminando organismos competidores nos diferentes ecossistemas. É o caso dos antibióticos produzidos por bactérias e fungos filamentosos e dos fatores “killer” produzidos por leveduras. No entanto, os organismos produtores parecem ser imunes aos efeitos dessas substâncias. Tais características são fatores importantes para a vantagem competitiva desses seres nos ecossistemas. O mecanismo de resistência às drogas (MDR) envolve a atuação de várias proteínas da membrana plasmática relacionadas com o transporte de substâncias tóxicas através da mesma. Esse mecanismo está diretamente relacionado com o processo de sensibilidade ou resistência àqueles compostos, como ao antifúngico Benomyl®.

O Benomyl®, fungicida sistêmico intensamente usado no controle de importantes pragas agrícolas, pertence ao grupo dos benzimidazólicos e atua

como inibidor mitótico causando despolimerização dos microtúbulos das leveduras. Essas organelas, dentre outras funções, compõem o citoesqueleto e têm uma de suas subunidades proteicas, a β -tubulina, como principal alvo desse composto. A partir de estudos com diferentes espécies de fungos foi observado que a resistência para os benzimidazoles está relacionada com mutações no gene *TUB2* o qual codifica para a β -tubulina. Essas formas alélicas produzem proteínas que são insensíveis à ligação com a droga e, portanto, impedem a despolimerização dos microtúbulos. No entanto, a causa da resistência ao Benomyl® pode não ser apenas monogênica por mutações no gene *TUB2*. Dependendo do organismo estudado, a ausência de sensibilidade ao composto pode se dar por um processo poligênico envolvendo, por exemplo, proteínas que compõem o mecanismo de resistência às drogas (MDR). Genes envolvidos com o MDR como o *ICT1* da *S. cerevisiae* são superexpressos. As proteínas desse mecanismo atuam sob diferentes maneiras seletivas, agrupadas em famílias de acordo com as formas de transporte das drogas.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o nível de resistência ao antifúngico Benomyl® em diferentes linhagens das leveduras *S. cerevisiae* e da *K. marxianus*. Nesse contexto, os objetivos específicos foram: analisar a amplificação do gene *TUB2* das linhagens estudadas e a amplificação do gene *ICT1* como representante do sistema MDR, além disso determinar o nível de resistência celular ao fungicida.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biologia das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*

Presentes em praticamente todos os habitats da terra, as leveduras são fundamentais em processos biológicos como: decomposição de vegetais e animais, fermentação de carboidratos e ciclo de nutrientes. Microrganismos heterotróficos, sapróbios e parasitas são encontrados associados aos vegetais, aos insetos, ao húmus e a maioria dos substratos fornecedores de açúcar. Algumas espécies são patogênicas às plantas, aos animais e ao homem. Em florestas tropicais, as leveduras que fermentam frutas possuem uma distribuição de acordo com os seus recursos alimentares (Phaff, 1990). Características de crescimento, onde apenas poucos microrganismos podem desenvolver-se, além da sua existência em diferentes habitats, facilitam seu isolamento e sua manutenção em culturas (Phaff & Stamer, 1987).

As leveduras participam na alimentação do homem desde a época que vivia da coleta de frutas. Quando a prática agrícola se estabeleceu, as colheitas eram processadas em bebidas e alimentos, onde as leveduras constituíam parte essencial do processo. Modelos de panificadoras e casas de fermentação estão registrados em papiros e esculturas do Antigo Egito. Atualmente, as aplicações biotecnológicas das leveduras estão presentes na tecnologia ambiental (tratamentos e/ou remediação de resíduos como esgotos domésticos e lixo, utilização de subprodutos industriais, controle biológico e bioabsorção de metais). Como também nas pesquisas fundamentais (metabolismo de drogas, Biologia celular e molecular, Bioquímica e Genética), na indústria de fermentação (vinhos, saquê, cerveja, pão e bioetanol) e na produção de agentes farmacêuticos de importância para a saúde humana (Walker, 1998).

O conteúdo genético das leveduras encontra-se compartimentalizado em um núcleo bem definido, sendo a regulação da expressão gênica e os mecanismos de transcrição e tradução próprios de organismos eucariontes. Possuem cromossomos lineares com diferentes tamanhos, formados por cadeias

de dupla fita de DNA associadas às histonas H2, H3 e H4 com ausência da H1 (Perez-Ortin *et al.*,1989). Naturalmente, podem existir nas formas diplóide ou haplóide. Nas células diplóides, enquanto as condições estiverem favoráveis, o ciclo vital das leveduras é vegetativo. A reprodução vegetativa (assexuada) ocorre por mitose, fase em que novas células são formadas a partir da célula mãe pelo processo de brotamento ou fissão. O ciclo meiótico ocorre nas condições de estresse como, por exemplo, a escassez de nutrientes.

A *S. cerevisiae* possui cerca de seis mil genes distribuídos por dezesseis cromossomos, e os doze milhões de pares de bases do seu genoma estão sequenciadas (Goffeau *et al.*, 1996). Metade dos seus genes já possuem função biológica conhecida (Oliver, 1996). É a levedura com a biologia melhor conhecida, devido ao seu importante papel na preparação de vinhos, de cervejas, de queijos e de pães. Embora tenha sido menos estudada do que a *S.cerevisiae*, a *K. marxianus* possui características fisiológicas que favorecem o seu uso industrial. Ambas as espécies são classificadas como organismos *Generally recognized as safe* (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo esse um importante critério técnico para aplicações alimentícias e farmacêuticas (Van der Berg *et al.*,1990).

As características de rápida taxa específica de crescimento e utilização de vários carboidratos como fonte de carbono torna a *K. marxianus* útil em eficientes processos fermentativos. É usada, por exemplo, na produção do *Kefir*, bebida derivada do leite, fermentada, ácida, alcoólica e comercializada na América do Norte. Encontrada em grãos de *Kefir*, é responsável pela formação do etanol, do CO₂ e contribui para o sabor e o aroma característicos da bebida (Belem & Lee, 1998). A *K. marxianus* apresenta um alto grau de termotolerância e frequentemente fermenta a lactose, sendo indicada na redução do potencial poluente do soro de queijo e outros produtos descartados na indústria de laticínios (de Souza Jr. *et al.*, 2001; Rech *et al.*, 1999). Possui uma alta capacidade de secretar enzimas pectinolíticas, como a endopoligalacturonase sendo utilizada na clarificação de suco de frutas (Schwan *et al*, 1997).

A potencialização do uso dos microrganismos para que sejam melhor explorados, em atividades de interesse humano, está relacionada com o estudo de sua biologia. Uma das estratégias para a caracterização biológica de um organismo é o conhecimento dos mecanismos celulares de resistência às substâncias tóxicas.

2.2. Aspectos químicos do Benomyl®

Os compostos benzimidazólicos foram uns dos primeiros antifúngicos sistêmicos desenvolvidos e bastante efetivos no controle de importantes doenças vegetais. São usados como agentes anti-helmínticos e como fungicidas sistêmicos. Porém, em muitos casos a efetividade do benzimidazole é reduzida devido ao aparecimento de linhagens resistentes a esse composto (Davidse, 1986; Georgopoulos, 1987).

O antimitótico Benomyl (metil 1-butilcarbamoil benzimidazol-2-ilcarbamate) é um composto da família dos benzimidazoles (Figura 1) usado como fungicida sistêmico agrícola (Brôco *et al.*, 1999). Atua como um inibidor mitótico ao se ligar com um sítio específico da β -tubulina causando a despolimerização dos microtúbulos (Gorman, 1992).



Figura 1. Estrutura química do Benomyl®

2.3. Mecanismos de resistência ao Benomyl®

A sobrevivência dos microrganismos no ecossistema é favorecida por fatores como a capacidade de produzirem compostos tóxicos para organismos competidores e o constante uso de fungicidas no controle de fitopatologias resultantes da contaminação por fungos.

Com o uso generalizado do Benomyl® surgiram diversas linhagens de fungos fitopatogênicos resistentes à droga, reduzindo a sua utilidade na proteção das culturas (Adams, 1997). O Benomyl® possui efeito sobre os microtúbulos que são estruturas celulares envolvidas no transporte de organelas, na mitose, na meiose e na morfogênese celular (Stearns *et al.*, 1990). A atividade dos benzimidazoles como inibidores de microtúbulos foi inicialmente observada em fungos (Davidse, 1986) e a resistência a essa droga está relacionada com a mudança na estrutura da β -tubulina (Osmani & Oakley, 1991).

Os microtúbulos são heterodímeros compostos de subunidades α , β e γ tubulina (Richards, 2000). O gene *TUB1* é o principal codificador da subunidade protéica α -tubulina, sendo fundamental para o processo de formação da tubulina. O gene *TUB3* também codifica para a subunidade α , entretanto é expresso em níveis mais baixos. O gene *TUB2* é o único que codifica para a β -tubulina em *S. cerevisiae*. Finalmente, o gene *TUB4* codifica para a γ -tubulina. A caracterização de linhagens mutantes em muitas espécies de fungos estabeleceu que a resistência para os benzimidazoles resulta de mutações nos genes da β -tubulina (Tabela 1). Essas mutações alteram a seqüência de aminoácidos, consequentemente desestabilizam a proteína (Li *et al.*, 1996) e reduzem a afinidade para os fungicidas (Cooley *et al.*, 1991). Desde que a β -tubulina tem sido identificada como alvo do Benomyl® em fungos, investigações da estrutura do gene *TUB2* de diferentes fungos vem tendo importância básica no estudo da resistência ao composto (Gafur *et al.*, 1998).

Tabela 1. Mutações no gene *TUB2* em diferentes fungos resistentes ao Benomyl®

Aminoácido			
Posição	Substituição	Organismo	Referência
6	His → Tyr	<i>Trichoderma viride</i>	Goldeman et al., 1993
50	Tyr → Asn	<i>Aspergillus nidulans</i>	Koenraad et al., 1992
134	Gln → Lys	<i>Aspergillus nidulans</i>	Koenraad et al., 1992
237	Thr → Ala	<i>Neurospora crassa</i>	Fujimura et al., 1992
241	Arg → His	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Thomas et al., 1985
200	Phe → Tyr	<i>Botrytis cinerea</i>	Yarden & Katan, 1993

Além das mutações no gene da β -tubulina, a resistência celular aos fungicidas pode estar relacionada à barreira de entrada ou ao sistema de efluxo celular desses produtos. Os organismos possuem mecanismos protéicos de transporte ativo pelos quais substâncias tóxicas endógenas e exógenas podem ser secretadas através da membrana plasmática. Em patógenos vegetais essas proteínas desempenham um papel essencial na proteção contra as defesas da planta durante a infecção. Podem transportar tanto fatores endógenos de patogenicidade quanto compostos externos de defesa da planta (Figura 2). Nas leveduras essas proteínas são uma das responsáveis pela sensibilidade e resistência a fungicidas (Jenkinson, 1996).

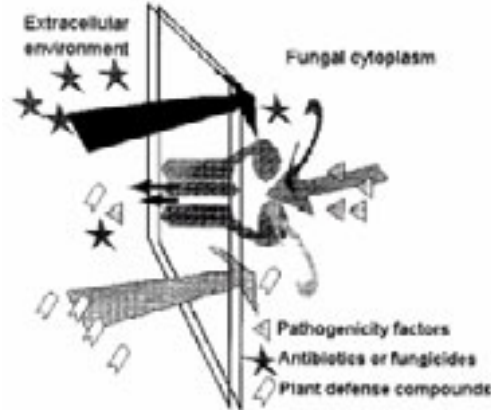


Figura 2. Função das proteínas transportadoras, na membrana plasmática de um fungo, durante o processo infeccioso de uma planta.

O fenômeno de *Multidrug Resistance* (MDR) é baseado na existência de mecanismos de fluxo ativo mediado por proteínas transportadoras específicas. Além disso, existe um sistema de compartimentalização ativa que resulta na diminuição da concentração dessas drogas tóxicas no citosol. São conhecidas cinco famílias de proteínas MDR e a maioria parece ter os cátions anfipáticos como substratos preferidos. As duas maiores famílias de proteínas da membrana plasmática com função de transportadores são a *ATP-Binding Cassete* (ABC, por apresentarem um módulo conservado de ligação ao ATP) e a *Major Facilitator Superfamily* (MFS) (Del Sorbo *et al.*, 2000). Os componentes da família SMS exportam apenas cátions anfipáticos, os das famílias RND e ABC possuem uma ampla especificidade, mas também possuem esses cátions como substratos preferidos. O mesmo é observado para as famílias MFS e MATE (Lewis, 2001). Fatores de regulação transcricional como as proteínas homólogas Pdr1 e Pdr2 participam na regulação desses transportadores MDR sendo reguladores da composição e propriedades da membrana plasmática das leveduras (Delahodde *et al.*, 2001; Tenreiro *et al.*, 2001).

Em leveduras e eucariontes superiores, os sistemas de efluxo de drogas desempenham um papel biológico crítico, aumentando a resistência da célula contra compostos tóxicos. Funcionam na dependência do consumo de energia e estão divididos em dois tipos como apresentados na Figura 3. O sistema de transporte ativo primário é composto por proteínas, como as da superfamília ABC que hidrolisam ATP e usam a energia gerada para transportar solutos através da membrana plasmática. O sistema de transporte ativo secundário, como os transportadores MFS, são energizados pelo gradiente eletroquímico transmembranar, ou seja, atuam pela diferença de concentração de H^+ e de carga entre os dois lados da membrana (Del Sorbo *et al.*, 2000).

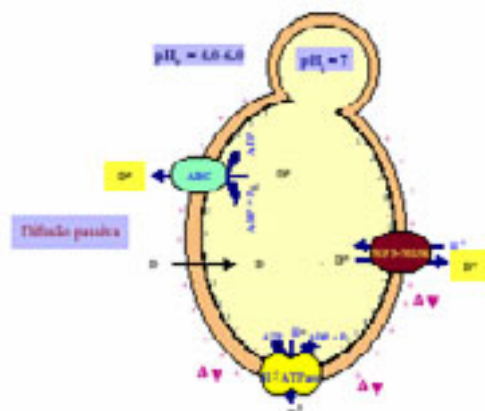


Figura 3. Bombas de múltiplas drogas: transportadores das superfamílias ABC e MFS presentes na membrana plasmática da levedura. As proteínas MDR catalisam o efluxo das formas não lipossolúveis (D^*) de substâncias tóxicas através da diferença de concentração de H^+ e de carga entre os dois lados da membrana.

Vários transportadores em diferentes organismos têm sido identificados e aparentemente atuam sobre uma vasta gama de compostos estruturalmente diferentes que apresentam também alvos biológicos de diversas ações. Atualmente, o sistema de efluxo ativo de drogas melhor caracterizado e de enorme relevância para a saúde humana é o da P-glicoproteína (Pgp) que é codificada em mamíferos pelo gene MDR1. Essa proteína é um transportador de várias drogas, pertencente a família ABC e atua como principal responsável pelo desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos. Células tumorais resistentes

às drogas são uma das principais causas no fracasso em processos quimioterápicos. A exposição contínua aos agentes citotóxicos, quimicamente não relacionados, seleciona células cancerígenas resistentes (Rumjanek *et al.*, 2001). Proteínas homólogas da P-glicoproteína (Pgp), da superfamília ABC, estão relacionadas com a multirresistência do parasito *Plasmodium falciparum* às drogas antimalária, bem como a resistência das bactérias patogênicas aos antibióticos e a de fungos fitopatogênicos aos fungicidas, utilizados na agricultura (Hayes and Wolf, 1997).

Alguns genes como o *ICT1* (YLR099c) envolvidos com a resistência ao Benomyl® são superexpressos quando submetidos ao fungicida (Launhardt *et al.*, 1998) e estão relacionados com o estresse celular (Miura *et al.*, 2000). O *ICT1* é um gene com 1185 pares de bases, localizado no cromossomo XII de *S. cerevisiae*, com função molecular desconhecida. A proteína codificada por esse gene é uma possível esterase de 394 aminoácidos com ação sobre compostos aromáticos (DeRisi *et al.*, 2000).

Portanto, o conhecimento do MDR, assim como de outros mecanismos de resistência celular aos compostos tóxicos, são importantes para a medicina, devido ao impacto sobre o tratamento por quimioterapia e antibióticos. Além disso, na agricultura com a resistência aos herbicidas e aos fungicidas; como também na aplicação das leveduras em processos biotecnológicos industriais sujeitos aos fatores de agressão ambiental.

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams DJ (1997) Drug and Pesticide resistance in fungi. In *Molecular Genetics of Drug Resistance* (Haynes JD and Wolf CR), Harwood Academic, Amsterdam. pp. 31-80

Alexopoulos JC and Mims CW (1996) *Introductory Mycology*. 4^o Edi. John Wiley, New York. 284 pp.

Belem MAF and Lee BH (1998) Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: na alternative. *Critic. Rev in food Science and nutrition* 38:565-598.

Brôco N, Tenreiro S, Viegas C A and Sa Correia I (1999) FLR1 gene (ORF008c) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on Pdr3 transcriptional regulator. *Yeast* 15:1595–1608.

Cooley RN, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ and Caten CE (1991) Isolation of a Benomyl®-resistant allele of the β -tubulin gene from *Septoria nodorum* and its use as a dominant selectable marker. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2085-2091.

Davidse LC (1986) Benzimidazole fungicides: mecanismo of action and biological impact. *Annu Ver Phytopathol* 24: 43-65.

Delahodde A, Pandjaitan R, Debrinski-Corral M and Jacq C (2001) Pse1/Kap121- dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Mol. Biol.* 39(2):304-312.

- Del Sorbo G, Schoonbeek H and De Waard M A** (2000) Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. *Fungal Genet. Biol.* 30:1–15.
- DeRisi J , van den Hazel B, Marc P, Balzi E, Brown P, Jacq C and Gogoffeau A** (2000) Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.* 470:156-160.
- De Souza Jr CG, Ledingham WM and Morais Jr** (2001) Utilization of cheese whey as an alternative growth medium for recombinant strains of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 23(17): 1413-1416.
- Fujimura M, Oeda K, Inoue H and Kato T** (1992) A single amino-acid substitution of the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both caarbendazim resistance and diethorfencarb sensity. *Curr. Genet.* 21:399-404.
- Gafur A, Tanaka C, Ouchi S and Tsuda M** (1998) Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus* β -tubulin gene and its possible rolr in conferring resistance to Benomyl®. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:217-223.
- Georgopoulos SG** (1987) Development of funcicide resistance. In: wolfe MS, Caten CE (ed) *Populations of plant pathogens: their dynamics and genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 239-251.
- Gorman JA** (1992) Genetic approaches to antifungal drug discovery. In Fernandes PB, *New approaches for Antifungal Drugs*. Birkhauser, Boston, pp.143-154

Goldman GH, Temmerman W, Jacobs D, Contreras R, Van Montagu M and Herrera-Estrela A (1993) A nucleotide substitution in one of β -tubulin genes of *Tricoderma viride* confers resistance to the antimitotic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate. *Mol.Gen.Genet.* 240:73-80

Hayes JD and Wolf CR (1997) *Molecular Genetics of Drug Resistance*, Harwood Academic Publishers, U.K.

Jacobs CW, Adams AEM, Staniszlo PJ and Pringle JR (1988) Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 107:1409-1426.

Jenkinson H F (1996) Ins and outs of antimicrobial resistance: era of the drug pumps. *J. Dent. Res.* 75:736-742.

Koenraadt H, Somerville SC and Jones AL (1992) Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl resistant field strain of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathol.* 82:1348-1354.

Laloux O, Cassart, JP, Deucour J, Van Beeumen J and Vandenhoute J (1991) Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Lett.* 289:64-68.

Launhardt H, Hinnen A and Munder T (1998) Drug-induced phenotypes provide a tool for the functional analysis of yeast genes. *Yeast* 14(10):935-42.

Lewis K (2001) In search of Natural Substrates and Inhibitors of MDR Pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(2):247-254.

- Li J, Katiyar SK and Edilind TD** (1996) Site- directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* β -tubulin: Intereaction between residue 167 and benzimidazole compounds. FEBS Lett. 385:7-10.
- Miura S, Zou W, Ueda M and Tanaka A** (2000) Screening of genes involved in isooctane tolerance in *saccharomyces cerevisiae* by using mRNA differential display Appl Environ Microbiol 66(11):4883-9
- Oliver, SG** (1996) From DNA sequence to biological function. Nature 379: 597-600.
- Osmani SA and Oakley BR** (1991) Cell cycle and tubulin mutation: filamentous fungi. In: Bennett J.W.; Lasure L.L. (eds) More manipulations in Fungi. Academic Press, San Diego. pp. 107-125.
- Perez-Ortin JE, Matallana E and Franco L** (1989) Cromatin structure of Yest genes. Yeast 5:219-238.
- Phaff, HJ** (1990) Isolation of yeast from natural sources. In: Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. Labeda (ed), US Mc- Graw-Hill Inc. pp. 53-59.
- Phaff, H.J. and Stamer, W.T.** (1987). Yeast associated with plants, insects and soil. In: *The Yeast*. London Academic Press. 1:123-180
- Prakash SP, Sung P and Prakash L** (1993) DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Ann. Rev Gen. 27:33-70.
- Rech R, Cassini CF, Secchi A and Ayub MAS** (1999) Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. J.Indust.Microbiol.Biotechnol. 23:91-96.

Richards, KL, Anders, KR, Nogales, E, Schwartz, K, Downing, KH and Botstein, D (2000) Structure–Function Relationships in Yeast Tubulins. *Mol. Biol. Cell* 11:1887–1903

Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, Meletti-de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC and Capella MAM (2000) Multidrug resistance in tumour cells: characterisation of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. *An. Acad. Bras. Ci.* 73(1):57-69.

Schwan RF, Cooper RM and Wheals AE (1997) Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 21:234-244.

Stearns T, Hoyt MA and Botstein D (1990) Yeast mutants sensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function. *Genetics* 124:251-262.

Tenreiro S, Fernandes AR and Sá-Correia I (2001) Transcriptional Activation of *FLR1* gene during *Saccharomyces cerevisiae* Adaptation to Grow with Benomyl: Role of Yap1p and Pdr3p. *Biol. Bioph. Resear. Commun.* 280:216-222.

Thomas JH, Neff NF and Botstein D (1985) Isolation and characterization of mutation in the β -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 112:715-734.

Van der Berg JA, van der laken KJ, van ooyen Renniers TCHM, Rietveld K, Schaap A, Brake AJ, Bishop RJ, Schultz K, Meyer D, Richman M and Schuster JL (1990) *Kluyveromyces* as host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnol* 8:135-139.

Yarden O and Katen T (1993) Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathol.* 83:1478-1483.

Walker GM (1998) *Yeast physiology and Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd. England pp 350

4- MANUSCRITO

**Resistência das Leveduras *Kluyveromyces marxianus* e
Saccharomyces cerevisiae ao Fungicida Benomyl®**

**Yasodhara Silva Lacerda, Maria Raquel de Moura Coimbra
& Marcos Antonio de Morais Jr.**

Departamento de Genética e Setor de Biologia Molecular/LIKA, Universidade Federal
de Pernambuco. Av. Moraes Rego, s/n. CEP 50670-901, Recife, PE. Brasil

Fone: (81) 32718484 fax: (81) 32718485

morais@lika.ufpe.br virus68@hotmail.com.br

Manuscrito a ser submetido à Revista *Fungal Genetics and Biology* (Academic Press, San Diego. USA).

RESUMO

Neste estudo, foi observada uma distinta sensibilidade ao Benomyl® apresentada por linhagens das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. A metodologia usada abordou os genes *TUB2* e *ICT1*. O gene *TUB2* codifica a proteína β -tubulina que está relacionada à sensibilidade ao Benomyl® e o gene *ICT1* é componente do sistema MDR (*Multidrug Resistance*). As conclusões obtidas permitiram ampliar os conhecimentos a respeito do processo de resistência às drogas nessas leveduras.

Palavras-chave: Resistência celular, leveduras, Benomyl®

INTRODUÇÃO

Os organismos estão constantemente submetidos às pressões seletivas tanto de ordem natural quanto as exercidas pela ação antrópica sobre o meio ambiente. No nível celular, são diversos os mecanismos mantenedores da homeostase do organismo como um todo. Ao longo da evolução dos seres vivos, genes que expressam proteínas responsáveis pela redução de compostos tóxicos comprometedores da sua funcionalidade, devem ter sido selecionados como provedores de maior aptidão para a ocupação de nichos ecológicos.

Foi demonstrado que mutações no gene que codifica a β -tubulina, subunidade estrutural dos microtúbulos, conferem resistência aos compostos benzimidazólicos. Essas substâncias se ligam à proteína β -tubulina selvagem e consequentemente desestabilizam sua estrutura (Li *et al.*, 1996). Aquelas mutações promovem mudanças da seqüência de aminoácidos que levam à redução da afinidade pelos fungicidas (Cooley *et al.*, 1991). Desde que a β -tubulina foi identificada como alvo do Benomyl® em fungos, a investigação da estrutura do gene *TUB2* de diferentes fungos tem importância básica no estudo da resistência ao Benomyl® (Gafur *et al.*, 1998).

O mecanismo de resistência celular aos fungicidas pode estar relacionado ao chamado fenômeno de resistência às drogas (*Multidrug Resistance*, MDR). O sistema MDR baseia-se na existência de mecanismos de efluxo ativo mediados por proteínas transportadoras específicas. Essas proteínas têm ligação com a barreira de entrada ou com o sistema de efluxo celular desses compostos, através da membrana plasmática (Jenkinson, 1996). São conhecidas cinco famílias de proteínas MDR e a maioria parece ter os cátions anfipáticos como substratos preferidos. Os componentes da família SMS exportam apenas cátions anfipáticos, os das famílias RND e ABC possuem uma ampla especificidade, mas também possuem os cátions anfipáticos como substratos preferidos. O mesmo é observado para as famílias MFS e MATE (Lewis, 2001).

No meio ambiente, as células das leveduras sofrem a ação de drogas como os fungicidas. Em atividades humanas como a fermentação, os

microrganismos presentes no caldo da cana, nos equipamentos e no ar são continuamente trazidos aos procedimentos técnicos tornando necessário o uso de antibióticos para controle da microbiota. Portanto, as linhagens industriais selvagens de leveduras que provavelmente são submetidas às pressões seletivas do meio foram usadas, neste trabalho, como organismos modelos para análise da presença dos genes *TUB2* e *ICT1* envolvidos na defesa celular especificamente contra o antifúngico Benomyl®.

O comportamento de resistência da *S. cerevisiae* e da *K. marxianus* quando expostas ao Benomyl® foi analisado através da correlação entre a cinética de crescimento e as PCRs do DNA total das leveduras, feitas com *primers* específicos para os genes *TUB2* e *ICT1*. Essa correlação indicou o possível envolvimento de vários genes pertencentes às diversas rotas metabólicas ligadas à defesa celular contra o acúmulo de substâncias tóxicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhagens e meios de cultivo

Foram utilizadas as linhagens de coleção *K. marxianus* CBS6556 e *S. cerevisiae* CG379, as linhagens de *S. cerevisiae* comerciais da Fleischmann Co. (Fleischmann), da Itaiquara Ltda (Itaiquara) e da Lallemand Co. (CR-1, SA-1 e BG-1) e as linhagens selvagens provenientes da Destilaria Japungu Agroindustrial Ltda (IA1238, MF17-1, MF18, MF19-1, MF68-1, MF181 e MF185). A linhagem bacteriana *E. coli* XL1-BLUE foi utilizada nos experimentos de manipulação plasmidial. Os meios ricos utilizados para o cultivo das células de bactéria e de leveduras foram o LB e o YPD, respectivamente.

Amplificação dos genes TUB2 e ICT1

Foram coletadas as seqüências do gene *TUB2* de diferentes fungos na base de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas seqüências foram

editadas através do programa de computação *EditSeq* (DNAS*t*ar Inc., USA) e submetidas a uma análise das homologias de DNA e das proteínas através do programa *Megaling* (DNAS*t*ar Inc., USA). Os *primers* específicos para as regiões 5' e 3' da seqüência codificadora do gene foram desenhados com o uso do programa *Primer Select* (DNAS*t*ar Inc., USA) a partir das seqüências consenso para as regiões 5' e 3' do gene. As condições de amplificação pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para o gene *TUB2* foram 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 50°C e 3 minutos a 72°C, com 15 minutos a 72°C como extensão final.

A seqüência de nucleotídeos do gene *ICT1* de *S. cerevisiae* foi coletada no *Saccharomyces Genome Database* (SGD) e os *primers* para amplificação foram desenhados segundo a ferramenta *Primer design* do próprio banco de dados acima citado. As condições de amplificação do gene *ICT1* foram as mesmas acima, apenas diminuindo a temperatura de anelamento para 45°C. Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador UV após eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e coloração com brometo de etídeo.

Ensaio biológico de resistência ao Benomyl®

As células de levedura foram cultivadas em meio YPD líquido por uma noite a 30°C sob agitação constante. A concentração celular foi determinada por contagem microscópica em câmara de Neubaer, a suspensão celular foi diluída para 2×10^3 células/ml e semeada em placas de meio YPD contendo diferentes concentrações de Benomyl®. A fração de células sobreviventes foi avaliada pelo número de colônias em cada concentração dividido pelo número de colônias nas placas controle (sem Benomyl®).

As curvas de crescimento das diferentes linhagens de levedura foram cultivadas em meio YPD na presença de Benomyl a 40 µg/ml durante uma noite. Posteriormente, essa cultura foi diluída para densidade óptica (600 nm) entre 0,1 e 0,3 em novo meio YPD contendo o fungicida na concentração acima descrita. As amostras foram tomadas a cada duas horas durante o intervalo total de oito

horas e avaliadas para a variação da densidade óptica (600 nm) das culturas no espectrofotômetro .

Clonagem por complementação da resistência ao Benomyl de S. cerevisiae

A biblioteca de *K. marxianus* utilizada, constitui-se de fragmentos genômicos de 3 a 4 kilobases clonados no plasmídeo episomal de *S. cerevisiae* YEp351. Essa biblioteca foi mantida na bactéria XL1-BLUE a partir da transformação bacteriana pela técnica de CaCl₂ e seleção em placas LB contendo ampicilina 100 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). As células transformantes foram coletadas em conjunto e cultivada em meio líquido LB + amp e o DNA plasmidial foi extraído segundo a metodologia de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). A preparação plasmidial foi, então, utilizada para transformar células da levedura *S. cerevisiae* CG379, utilizando-se o procedimento de acetato de lítio (Johnston, 1998). As colônias transformantes foram semeadas em meio contendo Benomyl na concentração de 40 µg/ml.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das curvas de sobrevivência das linhagens CG379 da *S. cerevisiae* e CBS6556 da *K. marxianus* mostrados na Figura 4 sugeriram uma maior resistência da *K. marxianus* ao Benomyl® quando comparada a linhagem CG379 de *S. cerevisiae* (Lacerda & Morais, 1999). A concentração de 40 µg/ml do composto foi adotada nos ensaios de resistência celular e como critério de seleção nos experimentos de clonagem, após a constatação da sensibilidade da *K. marxianus* (níveis de sobrevivência inferior a 10%) e resistência da *S. cerevisiae* a essa dosagem. A sensibilidade celular pode ser revertida quando as células tratadas são lavadas em água destilada e estéril na ausência do fungicida, em três repetições. Isso significa que o efeito citotóxico do Benomyl® é reversível quando ele é removido do meio (dados não mostrados). Essa característica tem grande importância na aplicação do Benomyl® como fungicida sistêmico, já que pode ser lixiviado do ambiente tanto por ação pluviométrica como por processos de irrigação.

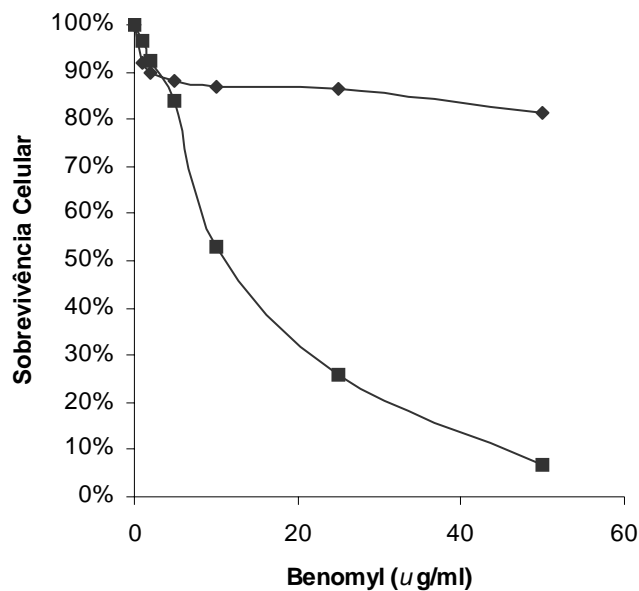


Figura 4. Curva de sobrevivência das linhagens *S. cerevisiae* CG379 (◆) e *K. marxianus* CBS6556 (■) a diferentes concentrações do Benomyl®.

O resultado apresentado pelas curvas de sobrevivência pode ter ligação tanto com diferenças estruturais das moléculas de β -tubulina quanto com os mecanismos de resistência às drogas apresentado pelas células. Para testar o possível envolvimento com a molécula de β -tubulina foram feitas amplificações com os primers *TUB2*. As bandas obtidas foram específicas para o DNA da *S. cerevisiae* CG379. Porém, as amplificações com a *K. marxianus* CBS6556 foram inespecíficas indicando uma baixa homologia entre os genes *TUB2* das duas leveduras (Figura 5). Pode-se, portanto, inferir que existem diferenças nas seqüências de nucleotídeos entre os dois genes, pelo menos nas regiões de anelamento dos primers.

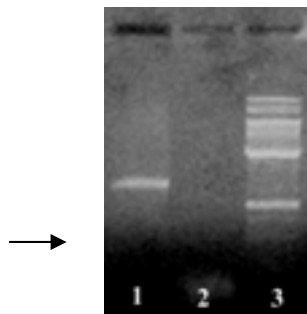


Figura 5. Amplificação do gene *TUB2* a partir do DNA total das linhagens de *S. cerevisiae* CG379 (linha 1) e *K. marxianus* CBS6556 (linha 2). Marcador de peso molecular λ HindIII.

Para a verificação da possível resistência monogênica envolvendo o gene *TUB2* foram feitas transformações da CG379 com o banco genômico da *K. marxianus* clonado no plasmídeo YEp351. As células transformantes foram semeadas em placas seletivas para o fungicida e para a marca auxotrófica do aminoácido leucina, como controle da eficiência de transformação. Apesar dos vários experimentos de transformação terem sido feitos com a eficiência esperada, nenhuma colônia resistente foi observada nas placas com meio seletivo contendo Benomyl (dados não mostrados). O resultado indicou que provavelmente a resistência não deve ser monogênica e pode estar envolvida com a atividade do sistema MDR na levedura *K. marxianus*.

As análises da atuação do sistema MDR nas leveduras *K. marxianus* e *S. cerevisiae* foram feitas através das amplificações do gene *ICT1* que codifica para uma possível esterase com ação sobre compostos aromáticos (DeRisi *et al.*, 2000). A superexpressão do gene está ligada à resistência ao Benomyl (Launhardt *et al.*, 1998). As reações de amplificação com o DNA da CBS6556 serviram para comprovar a presença do gene *ICT1* e, conseqüentemente, desse componente do sistema MDR. As amplificações das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* geraram um fragmento de 1000 pares de base correspondente ao tamanho esperado do gene. Entretanto, a amplificação do DNA da *K. marxianus* gerou um fragmento maior, com aproximadamente 2000 pares de bases, além de um fragmento de 1000 pares de bases e outro de tamanho intermediário (Figura 6). O resultado demonstra uma possível variação do tamanho do gene homólogo *ICT1* em *K. marxianus*, evidenciando uma provável diferença na estrutura e função da proteína codificada nessa levedura.

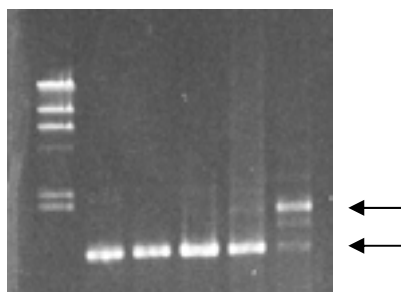


Figura 6. Amplificação do gene *ICT1* a partir do DNA total de *S. cerevisiae* Itaiquara (linha 2), Fleischmann (linha 3), IA1238 (linha 4), CG379 (linha 5) e *K. marxianus* CBS6556 (linha 6). Marcador de peso molecular λ *HindIII*.

No seu hábitat natural, as leveduras são encontradas em ambientes diversos, como em alimentos, no solo e em plantas. Em procedimentos como a produção de álcool combustível que se constitui em uma fermentação alcoólica aberta, não controlada, verifica-se uma substituição gradativa do inóculo puro inicial submetidos aos antibióticos, por linhagens selvagens que tendem a ser mais adaptadas à produção de etanol (Wheals *et al.*, 1999). Uma das explicações sugeridas para o fato reside na adaptabilidade das diversas linhagens à contínua exposição aos diferentes tipos de estresse ambiental. Dentre eles, estão a utilização de compostos anti-microbianos tanto no ambiente como no controle do processo fermentativo. Isso pode levar a instalação de leveduras mais resistentes ao longo do processo. O DNA total das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório e isolados selvagens industriais foram testadas quanto à amplificação dos genes *ICT1* e *TUB2* (Figuras 7 e 8).



Figura 7. Amplificação do gene *ICT1* a partir do DNA total das linhagens de *S. cerevisiae* CR-1 (linha 2), SA-1 (linha 3), BG-1 (linha 4), MF68(1) (linha 5), MF18 (linha 6), IA1238 (linha 7), CG379 (linha 8), MF19(1) (linha 9), MF17(1) (linha 10), MF185 (linha 11) e MF181 (linha 12). Marcador de peso molecular λ *HindIII*

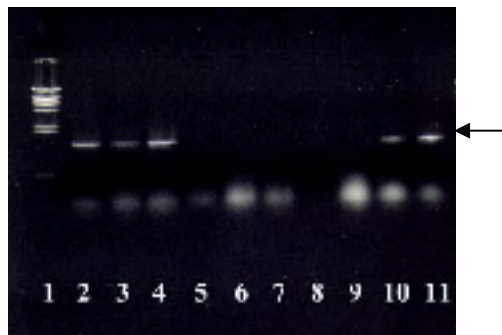


Figura 8. Amplificação do gene *TUB2* a partir do DNA total das linhagens de *S. cerevisiae* CR-1 (linha 2), SA-1 (linha 3), BG-1 (linha 4), MF68(1) (linha 5), MF18 (linha 6), IA1238 (linha 7), MF17(1) (linha 8), MF181 (linha 9), MF185 (linha 10) e MF19(1) (linha 11). Marcador de peso

Os resultados demonstraram que os DNA das linhagens de *S. cerevisiae* MF68-1, MF18, IA1238 e MF17-1 não amplificaram para o gene *TUB2*, mas produziram o fragmento esperado para o gene *ICT1*. Por outro lado, o DNA da linhagem MF19-1 não amplificou para o gene *ICT1*, porém produziu o fragmento correspondente ao gene *TUB2*. Finalmente, o DNA da linhagem MF181 não amplificou para nenhum dos dois genes testados. Essa linhagem foi isolada do processo fermentativo como uma *S. cerevisiae*, entretanto os dados cariotípicos demonstraram, apenas, a presença de três cromossomos (Lucena, 2002). Juntos, os dados comprometem a sua classificação como pertencente ao gênero *Saccharomyces*. O polimorfismo encontrado na amplificação dos genes está resumido na Tabela 2 e foi testado para a correlação fenotípica em relação à resistência celular ao Benomyl®.

Tabela 2. Resultados da amplificação gênica a partir do DNA total das diferentes linhagens de levedura testadas para o crescimento celular na presença do fungicida Benomyl®.

Linhagens	Gene	
	TUB2	ICT1
CBS6556	-	+
CG379	+	+
CR-1	+	+
SA-1	+	+
BG-1	+	+
IA1238	-	+
MF17-1	-	+
MF18	-	+
MF19-1	+	-
MF68-1	-	+
MF181	-	-

Linhagens	Gene
MF185	+ +

(-) ausência de amplificação; (+) presença de amplificação

A linhagem da *K. marxianus* CBS6556 e as fermentativas de *S. cerevisiae*, cujos DNA amplificaram para os *primers ICT1* e *TUB2*, foram cultivadas na presença do Benomyl® nas concentrações de 0, 2, 10 e 40 µg/ml e apresentaram suas curvas de crescimento estabelecidas. Os resultados demonstraram que diferenças significativas em termos de diminuição do crescimento celular foram observadas para a concentração de 40µg/ml (Figura 9).

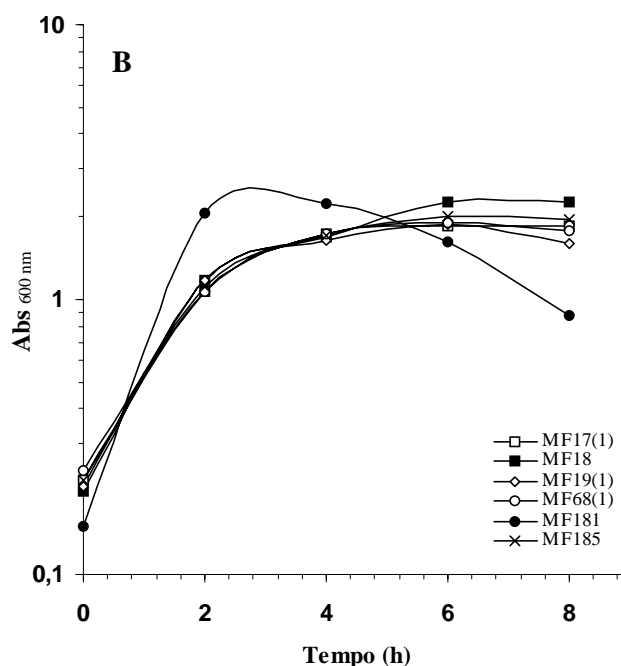


Figura 9. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de leveduras cultivadas em meio YPD na presença do Benomyl® a 40 µg/ml.

A linhagem CG379 foi sensível à presença do fungicida, enquanto que a CBS6556 apresentou-se resistente como demonstrado anteriormente (Figura 4). A linhagem SA-1 mostrou uma cinética de crescimento semelhante a da CBS6556 e amplificou para os dois genes. Isso indica que os alelos do gene *TUB2*

presentes nas duas leveduras não devem ser responsáveis pelo mecanismo de resistência.

As linhagens IA1238, BG-1 e CR-1 apresentaram semelhante resistência ao Benomyl®, durante o crescimento celular, quando comparadas entre si e com a CBS6556, entretanto mostraram-se sensíveis à presença do fungicida durante a fase estacionária (Figura 10). A ausência de amplificação do gene *TUB2* na IA1238, juntamente com a amplificação desse gene nas linhagens BG-1 e CR-1 (Tabela 2), reforçam a hipótese de que os alelos envolvidos não são responsáveis pela resistência ao fungicida.

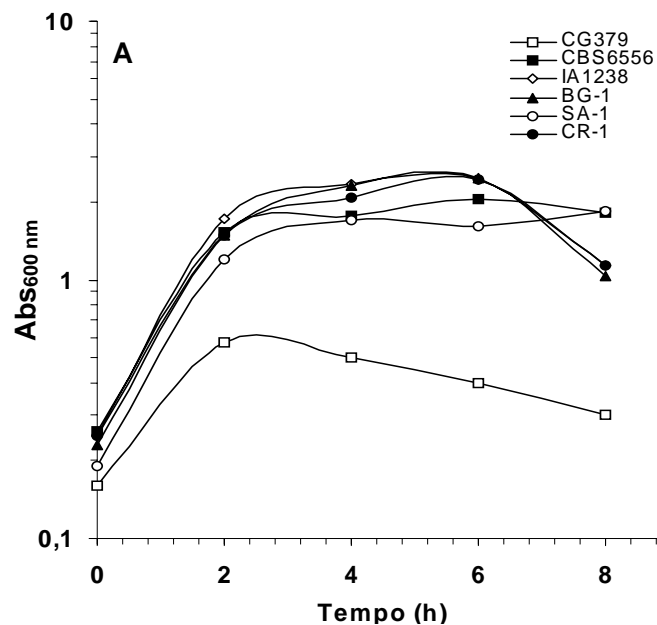


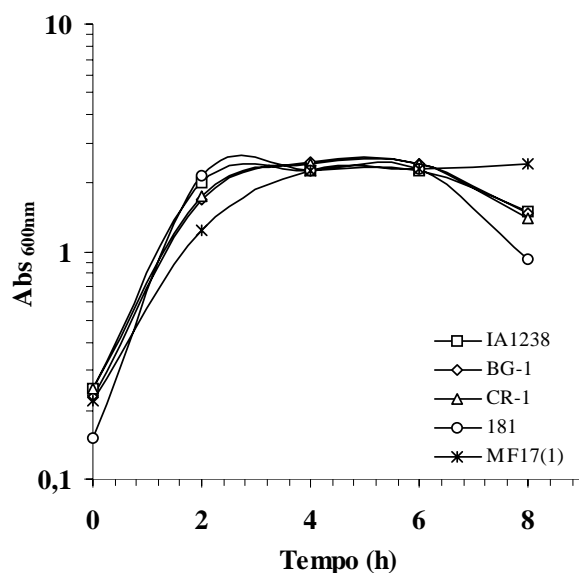
Figura 10. Curvas de crescimento das diferentes linhagens de leveduras cultivadas em meio YPD na presença do Benomyl® a 40 µg/ml, conforme descrito na Figura 9.

As linhagens MF17-1, MF18, MF19-1, MF68-1 e MF185 apresentaram comportamento de crescimento similar ao da SA-1 e ao da CBS6556 (Figura 10). Dessas, apenas a MF19-1 não amplificou para o gene *ICT1*. Nesse grupo de linhagens a MF19-1 e a MF185 amplificaram o gene *TUB2* (Tabela 2). A ausência de envolvimento na resistência ao Benomyl® pelos alelos *TUB2* presentes nas diferentes linhagens fica bem evidenciada pelos resultados. A falta de amplificação do gene *ICT1* pela MF19-1 demonstra que a ausência do alelo não interfere na sua resistência celular.

A MF181 (Figura 9) apresentou um comportamento de crescimento na presença do Benomyl semelhante ao observado para a IA1238, BG-1 e CR-1 (Figura 10). Essa linhagem não amplificou para os dois genes considerados (Tabela 2). Mais uma vez não se observa relação entre a presença ou ausência dos alelos analisados e a resposta de resistência celular ao Benomyl®.

A similaridade entre a cinética de crescimento em contradição aos diferentes tipos de genes amplificados indica que os mecanismos de resistência podem ser diferentes para linhagens da mesma espécie e entre espécies diferentes. As linhagens BG-1, CR-1, IA1238 e MF181 apresentaram resistência inicial ao Benomyl® e sofreram decréscimo na cinética de crescimento na fase estacionária quando comparadas à CBS6556 (Figura 10). Tanto a BG-1 quanto a CR-1 amplificaram para os dois genes, ao contrário da MF181 (Tabela 2). A resistência da MF181 pode ter ligação com mutações no gene *TUB2* que conferem resistência ao Benomyl®. A sequência correspondente ao gene *ICT1* pode ser de baixa homologia com o seu alelo na linhagem MF181.

O resultado pode estar envolvido com a própria sensibilidade celular na fase estacionária, portanto, independente dos efeitos do fungicida. Para testar essa hipótese, as células das linhagens foram cultivadas na ausência do Benomyl da mesma forma como descrito para os experimentos da Figura 9. Os resultados demonstraram que as quatro linhagens celulares, sofreram uma perda de viabilidade celular durante a fase estacionária em comparação à MF17-1, comprovando que a sensibilidade observada tem relação com a própria fisiologia das células (Figura 11).



Fatores de transcrição específicos tornam a célula resistente ao estresse químico e nutricional de maneira diferente do sistema de efluxo de drogas. Genes como o *ICT1* são superexpressos na presença de altas concentrações intracelulares do Benomyl e as proteínas produzidas atuam reduzindo a acumulação do composto. Enzimas envolvidas na síntese de lipídios e no metabolismo da parede celular também pode modificar o acesso de drogas para a membrana plasmática (DeRisi *et al.*, 2000).

CONCLUSÕES

Os mecanismos de resistência às drogas podem ser diferentes entre linhagens da mesma espécie e entre espécies diferentes.

A sensibilidade das linhagens de *S. cerevisiae* IA1238, BG-1, CR-1 e MF181 ao Benomyl®, na fase estacionária de crescimento, está relacionada com a fisiologia das leveduras.

A linhagem de *S. cerevisiae* MF181 não amplificou para os dois genes testados e sua resistência pode ter ligação com mutações ou seqüências de baixa homologia.

A correlação entre o perfil de amplificação gênica e a cinética de crescimento, demonstrou que a presença dos alelos *TUB2* e *ICT1* não é essencial para a defesa celular contra o acúmulo do Benomyl®, nas linhagens analisadas.

Portanto, ficou constatado que apesar do gene *TUB2* ser conservado nas leveduras (Richards, 2000) e do sistema MDR estar presente nas diversas classificações dos organismos, a resistência às drogas pode estar envolvida a um mecanismo regulatório com vários genes diferencialmente expressos de acordo com a bagagem genética de cada linhagem.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES, CNPq e FACEPE.

BIBLIOGRAFIA

- Cooley, R.N., van Gorcom, R.F.M., van den Hondel, C.A.M.J.J., Caten, C.E. 1991. Isolation of a Benomyl®-resistant allele of the β -tubulin gene from *Septoria nodorum* and its use as a dominant selectable marker. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2085-2091.
- De Risi, J. , van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C., Gogoffeau, A. 2000. Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Letters* **470**:156-160
- Gafur, A, Tanaka, C., Ouchi, S., Tsuda, M. 1998. Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus* β -tubulin gene and its possible rolr in conferring resistance to Benomyl®. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**:217-223.
- Jenkinson, H. F. 1996. Ins and outs of antimicrobial resistance: era of the drug pumps. *J. Dent. Res.* **75**:736–742.
- Johnston, J.R. 1988. Yeast genetics, molecular aspects. *Yeast a Practical Approach.* **Cap.5**, pp. 107-121.
- Lacerda, Y.S. 1999. Isolamento de mutantes e resistência das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* ao antifúngico Benomyl ®. *Monografia de Bacharelado.* Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. pp 22.

- Launhardt, H., Hinnen, A., Munder, T. 1998. Drug-induced phenotypes provide a tool for the functional analysis of yeast genes. *Yeast* **14**(10):935-42.
- Lewis, K. 2001. In search of Natural Substrates and Inhibitors of MDR Pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2):247-254.
- Li, J., Katiyar, S. K., Edilind, T.D. 1996. Site- directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* β -tubulin: Intereaction between residue 167 and benzimidazole compounds. *FEBS Letters* **385**:7-10.
- Lucena, B.T.L. 2002. Cariotipagem molecular de leveduras de fermentação alcoólica. *Monografia de Bacharelado*. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. pp. 31.
- Richards, K.L., Anders, K.R., Nogales, E., Schwartz, K., Downing, K.H., Botstein, D. 2000. Structure–Function Relationships in Yeast Tubulins. *Molecular Biology of the Cell* **11**:1887–1903
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F and Maniatis, T. 1989. Extraction and Purification of Plasmid DNA. Ligation Reactions. *Molecular cloning*. **Vol.1**, pp. 1.25; 1.40; 1.68.
- Wheals A.E., Basso L.C., Alves D.M.G., Amorim H.V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology* **17**: 482-487.