

Patrícia Nunes

Área Eng. Alimentar
EST/UAIG

Resistência a múltiplas drogas em *Saccharomyces cerevisiae*

Resumo

Este trabalho pertenceu contribuir para a análise funcional do gene *QDR1* da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que codifica um presumível transportador da membrana plasmática. Este gene parece estar envolvido na resistência a múltiplas drogas, das quais se destacam a droga antimalária quinidina e os azóis, cetoconazole e fluconazole.

INTRODUÇÃO

A emergência, em diversos organismos, de estirpes resistentes a uma grande variedade de compostos citotóxicos, com estruturas não relacionadas e que actuam sobre diferentes alvos biológicos, tem constituído um obstáculo no tratamento de doenças infecciosas e de tumores.

A manipulação de organismos patogénicos envolve alguns riscos e, por isso, o fenómeno de resistência a múltiplas drogas (MDR) é muitas vezes examinado em modelos eucarióticos.

O genoma de *Saccharomyces cerevisiae* encontra-se completamente sequenciado o que possibilitou a identificação de mecanismos biológicos comuns a todos os eucariontes, incluindo o Homem, em particular os mecanismos envolvidos no fenómeno MDR.

A levedura possui sistemas de transporte activo dependentes da força protão-motriz pertencentes à Superfamília dos Facilitadores Maioritários (MFS) e prevê-se a existência de cerca de 23 proteínas pertencentes a esta superfamília, envolvidas na resistência a múltiplas drogas. No entanto, a função fisiológica destas proteínas não foi ainda esclarecida sendo necessário estudar o seu papel na levedura.

A sequência de nucleótidos do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* ficou disponível na Internet a partir de 1996 e foi necessário realizar a análise funcional dos seus 6000 genes previsíveis. Na Europa surgiu o Projecto EUROFAN (“European Functional Analysis Network”) com o objectivo de realizar a análise funcional dos cerca de 4400 genes cujo papel fisiológico era completamente desconhecido e que tinham escapado à abordagem clássica.

Neste trabalho pretendeu-se realizar a análise funcional de um dos genes de de *Saccharomyces cerevisiae*, o gene *QDR1*, que revelou estar envolvido na resistência em

levedura à droga antimalária quinidina e aos dois azóis fluconazole e cetoconazole.

Análise funcional do gene *QDR1* que confere resistência a quinidina

O gene *QDR1*, que codifica uma proteína pertencente à Superfamília de Facilitadores Maioritários envolvidos na resistência a múltiplas drogas (MFS-MDR), foi identificado como um determinante na resistência a cetoconazole e fluconazole, compostos que afectam a biossíntese de ergosterol presente na membrana plasmática, e à quinidina, droga antimalária e antiarrítmica. O crescimento da estirpe selvagem e da estirpe mutante no gene *QDR1* em presença destes compostos apresentaram diferenças significativas, sendo o crescimento da estirpe selvagem menos afectada pela presença destas drogas do que o crescimento da estirpe mutante de eliminação no gene *QDR1*. O gene de levedura em estudo foi denominado por *QDR1* devido à resistência a quinidina.

A quinidina é um agente antimalária usado no tratamento da malária, doença provocada pelo parasita *Plasmodium falciparum*, quando este organismo se revela resistente à droga antimalária cloroquina, frequentemente utilizada na sua eliminação.

Curiosamente, nem a quinidina nem os dois azóis, cetoconazole e fluconazole, se encontram presentes no ambiente a que a levedura *S. cerevisiae* naturalmente se encontra exposta. Aliás, a quinidina exerce o seu efeito antimalária no parasita através de processos fisiológicos que não existem na levedura, sendo a concentração de droga usada nos nossos estudos muito superior à necessária para afectar as células de *Plasmodium*. No entanto, a verdade é que a eliminação do gene aumenta a susceptibilidade da levedura a quinidina quando esta é subitamente exposta à droga, prolongando o tempo necessário à sua adaptação à quinidina. Contudo, após esse período de adaptação, o nível de expressão do gene mostrou ser irrelevante para a resistência da célula à droga.

A proteína Qdr1 foi localizada na membrana plasmática com base na observação microscópica da distribuição da fluorescência da proteína de fusão Qdr1-GFP superproduzida em células de levedura. A proteína de fusão foi construída a partir da fusão do gene *QDR1* com o gene

que codifica a proteína verde fluorescete de *Aequorea victoria*.

required for multidrug resistance.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(5), 1528-34.

Visto que a proteína em estudo foi localizada na membrana plasmática e pertence à família MFS-MDR, esperava-se que esta funcionasse como exportador da(s) forma(s) protonada(s) de quinidina (esta droga antimalária é uma base fraca com dois locais de protonação). No entanto, não foi possível confirmar esta função. As células adaptadas a quinidina do mutante nulo e do selvagem mostraram-se capazes de expulsar activamente a droga, marcada radioactivamente e pré-acumulada nessas células, após um pulso de glucose. Este fenómeno não foi detectado nas células não adaptadas ao crescimento com quinidina e usadas como inóculo. Consistente com a indução deste(s) transportadores de quinidina em células do mutante e do selvagem, após adaptação à droga, não se detectou qualquer diferença na susceptibilidade dessas duas estirpes à quinidina, no caso das células terem sido previamente adaptadas por crescimento em presença da droga. É provável que esses exportadores de quinidina, presumivelmente induzidos pela droga, pertençam às superfamílias ABC ou MFS-MDR, sendo de referir que, anteriormente, foi identificado um outro transportador envolvido na resistência a quinidina.

CONCLUSÕES

O papel fisiológico desempenhado pelo gene *QDR1* continua por esclarecer. Não foi possível saber se a proteína Qdr1 é um transportador de compostos tóxicos ou se a sua capacidade para transportar múltiplas drogas é apenas fortuita. Esta proteína poderá desempenhar outros papéis dentro da célula como seja o de remover toxinas ambientais.

A resistência a quinidina é mediada em levedura pela proteína Qdr1 e por um outro transportador também pertencente à família MFS-MDR.

O estudo ao nível molecular e bioquímico do fenómeno de resistência a drogas em levedura tem por objectivo compreender os mecanismos de resistência a drogas em outros eucariontes mais complexos, incluindo o Homem. Estes estudos poderão contribuir para desenvolver novas drogas mais eficazes no combate de doenças infecciosas, como são o caso da tuberculose e da malária cujo tratamento é dificultado pelo surgimento de estirpes de organismos resistentes às drogas utilizadas.

REFERÊNCIAS

Isabel Sá-Correia, Sandra Tenreiro, Patrícia Nunes, Cristina Viegas, Nuno Brôco e Paula Rosa (2000) Resistência a múltiplas drogas em *Saccharomyces cerevisiae*: uma abordagem pós-genómica. *Boletim de Biotecnologia* **67**, 8-17.

Nunes, P. A., Tenreiro, S. and Sá-Correia, I. “Resistance and adaptation to quinidine in *Saccharomyces cerevisiae*: role of *QDR1* gene (ORF *YIL120w*), encoding a plasma membrane transporter of the Major Facilitator Superfamily