

LUCIANA PEREIRA RANGEL

Efeito de diferentes extratos de plantas sobre a  
atividade catalítica da proteína Pdr5p de  
*Saccharomyces cerevisiae*



**Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio  
de Janeiro (UFRJ) visando a obtenção do grau  
de Mestre em Ciências (Microbiologia)**

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

RANGEL, Luciana Pereira

Efeito de diferentes extratos de plantas sobre a atividade catalítica da proteína Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae*. Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro, 2005.

xiii, 71 p.,il.

Dissertação: Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

1. Resistência a múltiplas drogas
2. Pdr5p
3. Extratos etanólicos de plantas
4. *Saccharomyces cerevisiae*

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro - IMPPG

II. Título.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ, sob a orientação do Professor Antônio Ferreira Pereira.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço sinceramente a todos que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização deste trabalho.

*Dedico esta tese, o resultado de dois anos de trabalho, que tanto me fez amadurecer, à minha família, em especial a meus pais, tão fundamentais nesta minha escolha, e ao meu amor, Otacilio, pela inspiração para viver cada dia.*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. Resistência a múltiplas drogas	01
1.2. Transportadores ABC	03
1.2.1. Histórico	03
1.2.2. Definição	04
1.2.3. Mecanismo proposto para os transportadores ABC	07
1.2.3.1. Localização do sítio de ligação a drogas	09
1.2.3.2. Utilização do ATP	10
1.3. Resistência a múltiplas drogas em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
1.4. A proteína Pdr5p	13
1.4.1. Substratos e moduladores da Pdr5p	14
1.4.2. Cepas AD12345678 e AD1245678	16
1.5. Resistência a antifúngicos e a importância clínica da reversão deste fenótipo	17
1.5.1 A busca na natureza por novas substâncias re-sensibilizadoras	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1. Reagentes	23
3.2. Obtenção dos extratos etanólicos de plantas	23
3.6. Particionamento dos extratos etanólicos	23
3.7. Fracionamento das partições selecionadas	24
3.7.1. Partição em acetato de etila do extrato de <i>B. microstachya</i> var.	24

<i>massambabensis</i>	
3.7.2. Partição em acetato de etila do extrato de <i>Mabea fistulifera</i>	24
3.7.2.1. Cromatografia contra-corrente (primeiro fracionamento)	24
3.7.2.2. Segundo fracionamento da partição em acetato de etila do extrato de <i>Mabea fistulifera</i>	24
3.3. Crescimento do microrganismo	25
3.4. Isolamento de membranas plasmáticas de <i>S. cerevisiae</i>	25
3.5. Medida da atividade ATPásica da Pdr5p	26
3.8. Análises estatísticas	27
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
4.1. Efeito do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) sobre a atividade ATPásica da Pdr5p	28
4.2. Efeito dos extratos sobre a atividade ATPásica da Pdr5p	28
4.3. Curvas de inibição com os extratos selecionados	30
4.4. Particionamento dos extratos selecionados	34
4.5. Fracionamento das partições selecionadas	38
4.6. Inibição da Pdr5p em membranas pelo ácido gálico (ácido 3,4,5-triidróxibenzóico)	43
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>58</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>59</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>59</b>

## RESUMO

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um fenômeno cada vez mais freqüente no tratamento de fungos patogênicos, como *Candida* e *Aspergillus*, que dá origem a cepas altamente resistentes a diversas drogas. Isto é resultado da superexpressão de membros da família dos transportadores tipo ABC (do inglês ATP Binding Cassette). Mecanismos de MDR semelhantes foram descritos em diversos outros organismos, como mamíferos até parasitos (*Plasmodium* e *Schistosoma*) e bactérias patogênicas.

No genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, podem ser encontrados 31 genes de transportadores ABC, muitos dos quais responsáveis pelo fenômeno de resistência a múltiplas drogas. Destes transportadores, o mais bem caracterizado é a Pdr5p (do inglês Pleiotropic Drug Resistance). Esta proteína confere resistência a compostos como antifúngicos e drogas anticâncer, e possui grande homologia com outros transportadores de fungos patogênicos e com a glicoproteína-P de mamíferos.

Neste trabalho, avaliamos o efeito de 43 extratos de diferentes plantas da flora brasileira sobre a atividade ATPásica da Pdr5p. Os resultados obtidos mostram que compostos presentes em algumas das espécies de plantas testadas podem agir como inibidores da Pdr5p, uma vez que encontramos até 72% de inibição da atividade ATPásica da proteína Pdr5p quando utilizamos uma concentração de 200µg/mL de cada extrato. Os menores valores de atividade ATPásica na presença dos extratos foram obtidos, em porcentagem, com as seguintes plantas: *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* (27,87 ± 0,94) (Fabaceae), *Astronium fraxinifolium* (36,00 ± 5,71) (Anacardiaceae), *Croton foribundus* (36,88 ± 6,00) (Euphorbiaceae), *Brosimum guianense* (37,76 ± 1,97) (Moraceae), *Sparattosperma leucanthum* (37,82 ± 4,75) (Bignoniaceae), *Luehia grandiflora* (39,85 ± 5,23) (Tiliaceae), *Aparisthium cordatum* (43,01 ± 0,57) (Euphorbiaceae), *Pera heteranthera* (44,48 ± 2,57) (Euphorbiaceae), *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* (45,35 ± 2,89) (Fabaceae), *Dalbergia nigra* (45,74 ± 0,60) (Fabaceae), *Bathysa australis* (45,77 ± 5,33) (Rubiaceae), *Melanoxylon brauna* (45,77 ± 5,33) (Fabaceae), *Mabea fistulifera* (48,04 ± 1,17) (Euphorbiaceae) e *Virola oleifera* (51,20 ± 1,27) (Myristicaceae). Estes extratos foram então utilizados em curvas de dose-resposta de 0 a 400 µg/mL e cinco dos que apresentaram melhor IC<sub>50</sub>, que são: *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* (19,89 µg/mL)

(Fabaceae), *Virola oleifera* (22,80 µg/mL) (Myristicaceae), *Bathysa australis* (35,32 µg/mL) (Rubiaceae), *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* (40,21 µg/mL) (Fabaceae) e *Mabea fistulifera* (42,88 µg/mL), (Euphorbiaceae), passaram por um processo de particionamento com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Com exceção da partição em butanol do extrato de *Bathysa australis*, as obtidas partições tiveram um efeito inibitório igual ou superior ao dos seus extratos de origem. As partições em acetato de etila dos extratos de *Mabea fistulifera* e *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* foram fracionadas utilizando cromatografia contra-corrente ou colunas cromatográficas de sílica-gel, com o objetivo de isolar os compostos ativos. As frações obtidas foram testadas frente à atividade ATPásica da Pdr5p e selecionadas para novos fracionamentos. Foi possível isolar o ácido gálico (IC<sub>50</sub> ~ 185 µg/mL) do extrato de *Mabea fistulifera*, do qual não havia relato de ser um inibidor para a Pdr5p. Apesar de não poder ser utilizado na clínica, devido à sua conhecida toxicidade, este composto poderá ser utilizado no auxílio da elucidação estrutural e funcional da Pdr5p de leveduras, uma vez que o mecanismo de inibição é do tipo competitivo pelo sítio de ligação a nucleotídeos, segundo a nossa proposta, por produzir o efeito inibitório apresentando uma estrutura similar à da adenina presente na molécula da ATP.

## ABSTRACT

Fungal resistance to drugs used in therapy is a very common problem, of which the most preoccupying is multidrug resistance. This kind of resistance is promoted by transporter proteins from the ABC (ATP Binding Cassette) superfamily. Similar mechanisms of MDR have been described for mammals, parasites (*Plasmodium* and *Schistosoma*) and bacteria.

In *Saccharomyces cerevisiae*, ABC protein family comprises 31 genes. The best characterized yeast ABC transporter is Pdr5p, which confers resistance to compounds like antifungals and anticancer drugs and is homologue to other transporters from pathogenic fungi, as well as mammalian P-glycoprotein.

In this work, we have evaluated the effect of 43 Brazilian plant extracts on Pdr5p ATPase activity. Plant extracts were obtained with ethanol, followed by solvent evaporation and solubilization in 20% dimethyl sulfoxide (DMSO). Our results indicate that some of the compounds present in the species tested may act as Pdr5p inhibitors, as we have found up to 72% of inhibition, depending on the plant extract used, with 200µg/mL of each extract. The best results on ATPase activity in the presence of plant extracts were obtained in percentual values, with the following plants: *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* (27,87 ± 0,94) (Fabaceae), *Astronium fraxinifolium* (36,00 ± 5,71) (Anacardiaceae), *Croton foribundus* (36,88 ± 6,00) (Euphorbiaceae), *Brosimum guianense* (37,76 ± 1,97) (Moraceae), *Sparattosperma leucanthum* (37,82 ± 4,75) (Bignoniaceae), *Luehia grandiflora* (39,85 ± 5,23) (Tiliaceae), *Aparisthium cordatum* (43,01 ± 0,57) (Euphorbiaceae), *Pera heteranthera* (44,48 ± 2,57) (Euphorbiaceae), *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* (45,35 ± 2,89) (Fabaceae), *Dalbergia nigra* (45,74 ± 0,60) (Fabaceae), *Bathysa australis* (45,77 ± 5,33) (Rubiaceae), *Melanoxylon brauna* (45,77 ± 5,33) (Fabaceae), *Mabea fistulifera* (48,04 ± 1,17) (Euphorbiaceae) and *Virola oleifera* (51,20 ± 1,27) (Myristicaceae). The selected extracts were used in dose-response curves, ranging from 0 to 400 µg/mL of which the IC<sub>50</sub> values were estimated. Five of the extracts with the lower IC<sub>50</sub> values, *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* (19,89 µg/mL) (Fabaceae), *Virola oleifera* (22,80 µg/mL) (Myristicaceae), *Bathysa australis* (35,32 µg/mL) (Rubiaceae), *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* (40,21 µg/mL) (Fabaceae) and *Mabea fistulifera* (42,88 µg/mL), were selected for a partitioning against solvents of growing polarities (hexane, dichloromethane, ethyl

acetate and butanol) and these new products were tested on Pdr5p ATPase activity. Except for the partition against butanol from *Bathysa australis* extract, all the other partitions presented lower or equal inhibition values to their ethanolic extracts. The ethyl acetate partitions of the *Mabea fistulifera* and *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* extracts were submitted to chromatographic techniques (Counter-current chromatography and silica-gel columns), in order to isolate the active compounds. The fractions obtained were tested against Pdr5p ATPase activity and selected for new purification steps. We were able to isolate from the *Mabea fistulifera* extract gallic acid ( $IC_{50} \sim 185\mu\text{g/mL}$ ), which was not known to inhibit the enzyme Pdr5p. Although not suitable for clinical use, for its known toxicity, this compound can be used for the elucidation of Pdr5p's structure and function, as it has been shown that its inhibition of ATPase activity occurs in a competitive way for the Nucleotide Binding Site (NBD). We propose that this substance is able to bind to NBD by "mimicking" ATP's adenine structure.

## ABREVIACÕES

- **<sup>1</sup>H-NMR** Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- **<sup>13</sup>C-NMR** Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
- **ADP** Adenosina 5'-difosfato
- **AIDS** Síndrome da imunodeficiência adquirida
- **ATP** Adenosina 5'-trifosfato
- **CCF** Cromatografia em camada fina
- **CTP** Citosina 5'-trifosfato
- **DMSO** Dimetilsulfóxido
- **EGTA** Ácido [etilenobis(oxietilenonitrila)] tetracético
- **GTP** Guanosina 5'-trifosfato
- **ITP** Inositol 1,4, 5- trifosfato
- **IC<sub>50</sub>** Concentração em que se atinge 50% de inibição
- **KCl** Cloreto de potássio
- **K<sub>D</sub>** Constante de dissociação
- **K<sub>I</sub>** Constante de inibição
- **MATE** do inglês, Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family
- **MDR** Resistência múltipla a drogas (do inglês multidrug resistance)
- **MFS** do inglês, Major Facilitator Superfamily
- **MIC** Concentração mínima inibitória (do inglês, Minimum Inhibitory Concentration)
- **MgCl<sub>2</sub>** Cloreto de magnésio
- **NBD** Domínio de Ligação de Nucleotídeos (do inglês, “Nucleotide Binding Domain”)
- **ORF** do inglês, Open Reading Frame
- **Pi** Fosfato inorgânico
- **Pdr5p** Produto do gene PDR5, de *Saccharomyces cerevisiae*
- **P-gp** Glicoproteína-P
- **PKC** Proteína cinase C
- **PMSF** Fluoreto de fenilmetilsulfonila

- **RND** do inglês, Resistance-nodulation-cell Division Family
- **SDS** Dodecil sulfato de sódio
- **SMR** do inglês, Small MDR superfamily
- **TFP** Trifluoperazina
- **TMS** Segmento Transmembranar (do inglês, “Transmembrane Segment”)
- **Tris** Tris (hidroximetil) aminometano
- **UTP** Uridina 5’ – trifosfato
- **YPD** Meio de crescimento composto por extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês, Yeast Extract, Peptone, Dextrose)

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Resistência a múltiplas drogas

A resistência a drogas na quimioterapia antifúngica, bem como na quimioterapia antimicrobiana e anticâncer, é a maior causa de falhas destes tratamentos. Os microrganismos patogênicos e as células cancerosas desenvolveram diversos mecanismos para escapar do ataque dos quimioterápicos, dentre os quais, um dos mais importantes e preocupantes é a resistência a múltiplas drogas (Lage, 2003).

A resistência a múltiplas drogas ou MDR (do inglês “Multidrug Resistance”) consiste na resistência celular a diversos quimioterápicos estrutural e funcionalmente diferentes, que apresentam, de forma geral, uma única característica em comum, que é o caráter hidrofóbico dessas moléculas. Este fenótipo caracteriza-se pela capacidade de expulsão de drogas presentes no interior da célula, ou ainda na membrana plasmática, com conseqüente redução de sua concentração no meio intracelular (Gottesman & Pastan 1993).

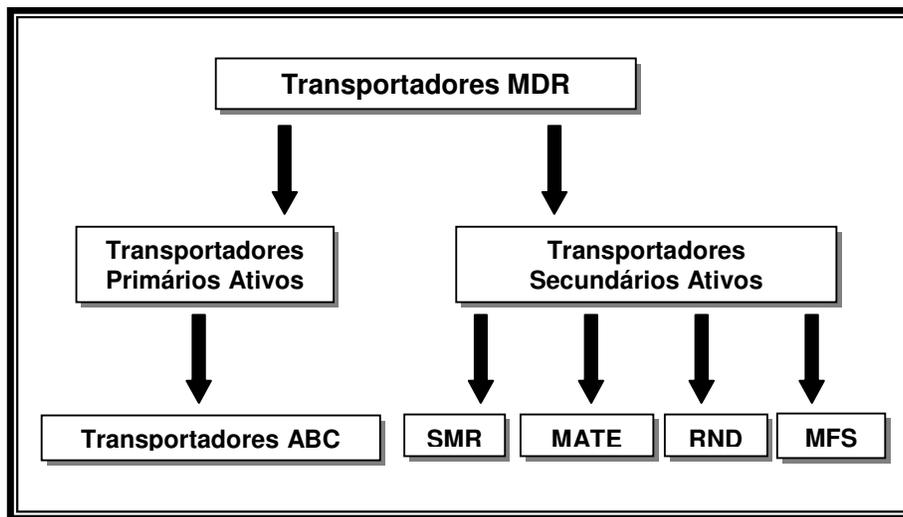
Este tipo de MDR, chamado de “clássico”, foi descrito primeiramente para células cancerosas, sendo promovido por uma proteína transportadora transmembranar, chamada de Glicoproteína-P (P-gp), codificada pelo gene MDR1 (Roninson *et al.*, 1986). A resistência promovida por esta proteína já está bem caracterizada, apresentando um perfil bem definido de substratos para seu transporte, bem como de inibidores, que podem também ser chamados de moduladores ou reguladores de MDR. Após sua descoberta, um grande número de proteínas homólogas foi descrito em diferentes organismos (Lage, 2003).

Estas proteínas pertencem à superfamília dos transportadores ABC (do inglês “ATP-binding cassette”), mas existem, como descrito na Figura 1, numa visão mais ampla, muitas

outras famílias de transportadores de múltiplas drogas. Todas essas famílias são responsáveis pelos fenótipos de MDR em microrganismos patogênicos, assim como em células cancerosas.

Estes sistemas transportadores estão presentes em todos os organismos estudados e podem ser divididos em duas classes majoritárias (Figura 1). A primeira classe é composta de proteínas capazes de realizar transporte ativo primário, utilizando como energia a hidrólise de ATP. Estes transportadores representam a superfamília dos transportadores ABC.

A segunda classe é composta de proteínas capazes de realizar transporte ativo secundário, acoplado a um gradiente de íons, como sódio ou prótons, através de simporte ou antiporte. Os membros desta classes são as SMR (do inglês “Small MDR Superfamily”), MATE (“Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family”), RND (“Resistance-nodulation-cell Division Family”) e MFS (“Major Facilitator Superfamily”) (Putman *et al.*, 2000).



**Figura 1 – Visão geral das famílias de transportadores de múltiplas drogas (MDR).**

SMR: do inglês, Small MDR superfamily; MATE: Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family; RND: Resistance-nodulation-cell Division Family; MFS: Major Facilitator Superfamily (Adaptado de Lage, 2003).

## 1.2. Os Transportadores ABC

### 1.2.1. Histórico

O estudo dos transportadores ABC teve início na década de 1970. Este tipo de transportador foi descrito inicialmente em bactérias, e estes foram os primeiros a serem identificados e caracterizados (revisto por Higgins, 2001). Berger & Heppel, em 1974, descreveram uma classe de sistemas transportadores, capaz de realizar transporte primário, sensível ao choque osmótico e energizado diretamente pela hidrólise de ATP. Estes transportadores descritos eram sensíveis ao choque osmótico devido à perda da sua proteína de ligação ao substrato. Com o seqüenciamento de genes e a caracterização desses sistemas de transporte bacterianos, observou-se após a conclusão do seqüenciamento de OppD (um transportador de oligopeptídeos de *Salmonella typhimurium*) (Higgins *et al.*, 1982), que essas proteínas apresentavam uma região de ligação a nucleotídeos bastante conservada, encontrada também em outras proteínas, como ATP sintase, miosina e adenilato cinase (Walker *et al.*, 1982). Isso levou à sugestão de que esses domínios estariam envolvidos no acoplamento da hidrólise do ATP à função realizada pela proteína e que esses transportadores pertenceriam a uma mesma família (Mimmack *et al.*, 1989).

A primeira proteína desta família foi descrita em eucariotos em 1986. Tratava-se da glicoproteína-P de mamíferos (Gros *et al.*, 1986), envolvida na resistência de células cancerosas à quimioterapia. Neste mesmo ano, foi proposto que estes transportadores estariam organizados em quatro domínios principais. Porém notou-se que nem todos os membros desta superfamília apresentavam a função de transporte, podendo estar acoplados a outros processos biológicos (Higgins *et al.*, 1986). O nome ABC (do inglês “ATP binding

cassette”) foi proposto em 1990 por Hyde e colaboradores, reconhecendo a importância desta origem evolucionária comum entre proteínas com funções tão diversas.

### 1.2.2. Definição

Os transportadores ABC podem ser encontrados em todos os filamentos e compõem uma das maiores famílias de proteínas, que estão envolvidas nos mais diversos processos bioquímicos. Esses processos vão desde doenças genéticas, como a fibrose cística, até a resistência a múltiplas drogas em microrganismos e no câncer (Higgins *et al.*, 1992).

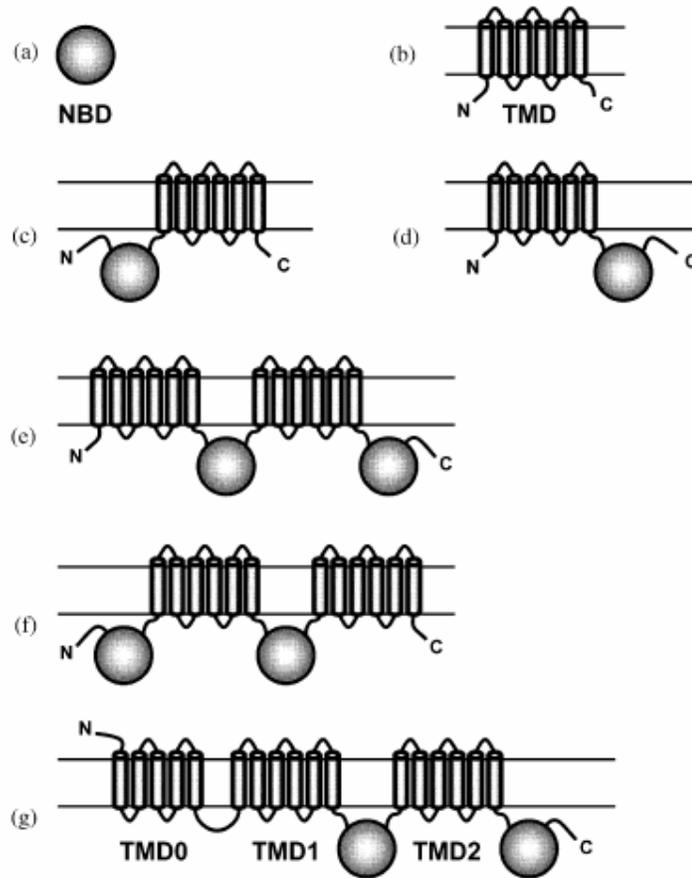
Todas as proteínas da superfamília ABC apresentam uma sequência altamente conservada de aproximadamente 215 aminoácidos denominada de ABC ou de NBD (domínio de ligação a nucleotídeos). Este domínio contém dois segmentos peptídicos curtos chamados de “Walker A” e “Walker B” (Walker *et al.*, 1982). O segmento “Walker A” é uma região rica em glicina e “Walker B” é uma sequência hidrofóbica. Ambos estão envolvidos na ligação de ATP e estão frequentemente presentes em todas as proteínas ligadoras de nucleotídeos. Uma terceira sequência consenso (“LSGGQ”) é conhecida como “assinatura” ABC e é exclusiva dos domínios ABC (Hyde *et al.*, 1990).

Os transportadores ABC apresentam uma organização estrutural comum, na qual, associado ao sítio de ligação a nucleotídeos, temos um domínio transmembranar (TMD), geralmente composto de seis alfa-hélices que atravessam a membrana (revisto por Endicott & Ling, 1989).

Para que um transportador ABC tenha atividade biológica, acredita-se que a estrutura mínima seja de dois sítios de ligação a nucleotídeos associados a dois domínios transmembranares. Em geral, os transportadores de organismos eucarióticos se apresentam

sob a forma de transportadores completos, que consiste em um único polipeptídeo, apresentando uma topologia [TMD-NBD]<sub>2</sub> ou [NBD-TMD]<sub>2</sub>, chamada de configuração invertida (Figura 2). Por outro lado, os transportadores de procariotos costumam ter seus domínios expressos como subunidades separadas, contendo um NBD ligado a um TMD, que, para serem ativos, em geral, apresentam-se sob a forma de dímeros, podendo ser homo (duas cadeias de proteínas codificadas pelo mesmo gene) ou heterodímeros (compostos de duas proteínas diferentes). Apesar de os NBDs apresentarem grande homologia nos transportadores ABC de todas as origens filogenéticas, os segmentos transmembranares costumam apresentar grande variabilidade em suas seqüências e, por isso, acredita-se que nestas regiões estejam localizados os sítios de ligação de drogas (para revisão, ver Altenberg, 2003).

A superfamília dos transportadores ABC divide-se em diversas subfamílias, dentre elas a MRP (do inglês “Multidrug Resistance Protein”), caracterizada pelo transporte de substâncias geralmente conjugadas à glutationa, a MDR, na qual se incluem os genes que codificam as glicoproteínas-P de humanos e mamíferos em geral, e a PDR (do inglês “Pleitopic Drug Resistance”), a família mais bem caracterizada em *Saccharomyces cerevisiae*, cujos membros são encontrados também em outros fungos, como *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, entre outros (Del Sorbo, Schoonbeek & De Waard, 2000).

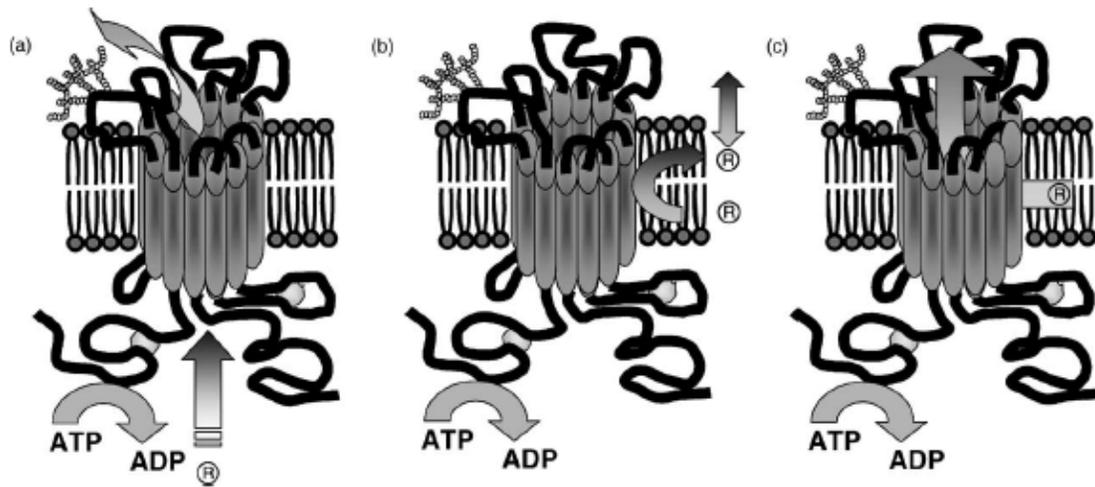


**Figura 2 – Possíveis topologias e configurações para os domínios transmembranares e de ligação a nucleotídeos dos transportadores ABC.** (a) NBD, domínio de ligação a nucleotídeos. (b) TMD, domínio transmembranar. (c) monômero com a configuração [NBD-TMD]. (d) monômero com a configuração [TMD-NBD]. (e) dímero com a configuração [TMD-NBD]<sub>2</sub>. (f) dímero com a configuração [NBD-TMD]<sub>2</sub>. (g) transportador que apresenta um domínio transmembranar adicional, encontrado na família MRP (do inglês, multidrug resistance protein).

### 1.2.3. Mecanismo proposto para os Transportadores ABC

Acredita-se que os transportadores ABC envolvidos na resistência a múltiplas drogas tenham um mecanismo molecular de transporte comum. Diversos modelos foram sugeridos para explicar sua ampla especificidade por compostos quimicamente tão diferentes (Varma *et al.*, 2003).

Três modelos são atualmente propostos para descrever o funcionamento dos transportadores ABC (Figura 3). São eles: o modelo de poro, o de aspirador hidrofóbico e o de flipase. O modelo de poro, também chamado de transporte convencional, é caracterizado pela remoção da droga após sua ligação ao transportador diretamente no citoplasma, passando por um poro aquoso (Altenberg *et al.*, 1994). No modelo de aspirador hidrofóbico, ocorreria a ligação da droga ao transportador na folha interna da membrana plasmática e sua condução, através do interior do poro, ao meio extracelular (Raviv *et al.*, 1990). No terceiro modelo proposto, a droga passaria da camada interna para a camada externa da membrana plasmática, através de ligações e/ou interações com os lipídios da membrana, sendo eliminada em seguida. Este mecanismo é chamado de flipase (Higgins *et al.*, 1992).



**Figura 3 – Modelos propostos para o mecanismo dos Transportadores da Superfamília ABC.** (a) No modelo de poro, a droga se ligaria à proteína no citoplasma, sendo expulsa da célula através de um canal. No modelo de flipase (b), a droga presente na folha interna da membrana plasmática seria translocada para a folha externa após a ligação à proteína, passando em seguida por difusão passiva para o meio extracelular, enquanto que no modelo de aspirador hidrofóbico (c), a droga, ainda na camada interna da membrana plasmática, seria captada pela proteína e expulsa através do canal (extraído de Varma *et al.*, 2003).

### 1.2.3.1. Localização do sítio de ligação a drogas

Muito estudo foi dedicado, sem que ainda se possa confirmar a localização precisa e o número de sítios de ligação a drogas dos transportadores ABC. Para a Pdr5p, uma proteína que confere resistência a diversas substâncias em *S. cerevisiae*, inicialmente, Wolfger e colaboradores (2001) indicaram que a região de ligação a drogas estaria localizada nos segmentos transmembranares, uma vez que mutações pontuais nestes segmentos geraram mutantes com a especificidade alterada pelo substrato (droga). Desses mutantes produzidos, o que foi considerado mais interessante apresentava uma mutação S1360F (a troca de um aminoácido serina na posição 1360 por uma fenilalanina) no segmento transmembranar de número 10 (TMS10), que conferia especificidade diminuída por cetozonazol, bem como uma mínima resistência a itraconazol e cicloheximida. Além disso, a proteína mutante deixava de ser susceptível ao inibidor FK506, que inibe o transporte de certas drogas. Entretanto, se a troca do aminoácido serina fosse por uma alanina em vez de uma fenilalanina, ocorria um aumento na sensibilidade da proteína ao inibidor (Egner *et al.*, 1998). Isto poderia sugerir que o TMS10 controla tanto a especificidade de alguns substratos, quanto a susceptibilidade a alguns inibidores.

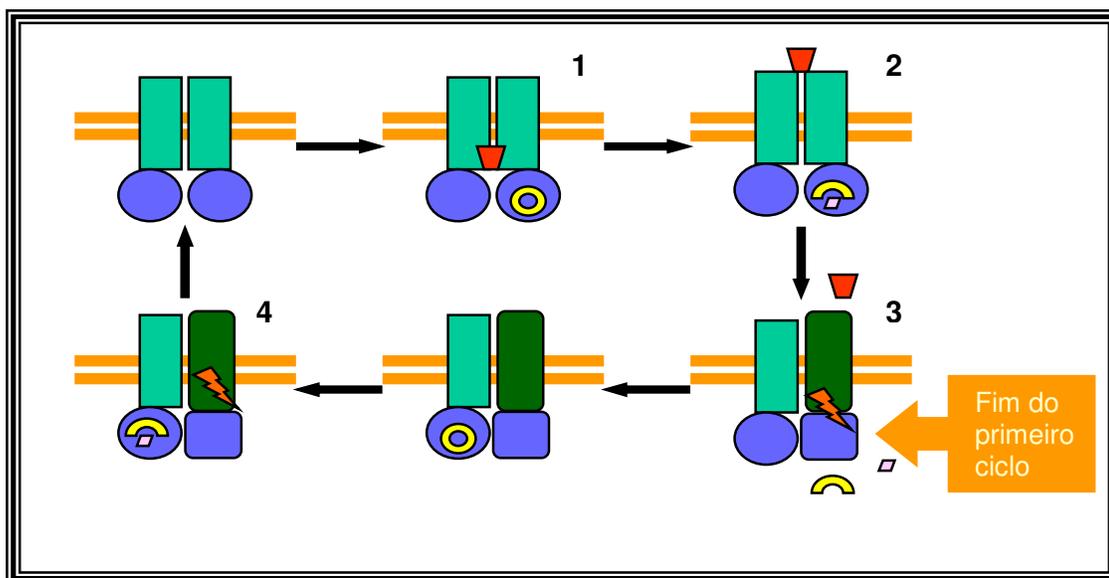
Em 2003, Golin e colaboradores propuseram a existência de pelo menos três sítios de ligação a drogas na Pdr5p. Estes diferem em comportamento com o modelo proposto para a P-gp, no que diz respeito ao tipo de interação entre os substratos e seus sítios de ligação, podendo alguns substratos interagir com mais de um sítio, o que indica uma sobreposição entre os mesmos. Além disso, foi demonstrado que, apesar de a ionização dos substratos não ser necessária para que ocorra o transporte, como sugerido anteriormente (Golin *et al.*, 2000), e de ter sido sugerido que apenas um dos sítios utilize interações hidrofóbicas como forma de

seleção para a ligação de substratos, existe uma dependência de tamanho (200-225 Å) para que ocorra o transporte em todos os sítios de ligação descritos.

### **1.2.3.2. Utilização do ATP**

A ligação do ATP e sua hidrólise são essenciais para o funcionamento dos transportadores ABC, sendo a estequiometria desta reação de uma molécula da droga transportada para cada duas moléculas de ATP hidrolisadas (Gottesman & Pastan, 1993). A reação global da P-gp de humanos foi proposta inicialmente por Senior e colaboradores (1995) e revista recentemente por Sauna e colaboradores (2001). Neste modelo, a reação é composta de dois ciclos, nos quais os sítios de ligação de ATP e drogas interagem de forma coordenada, para que a droga seja transportada para o exterior, num processo dependente de ATP (Figura 4).

A droga e a primeira molécula de ATP se ligam à proteína em seus respectivos sítios. Em seguida, ocorre a hidrólise do ATP em ADP + Pi, fornecendo energia para o transporte da droga. A liberação do ADP do sítio de ligação a nucleotídeos encerra o primeiro ciclo, que é seguido de uma mudança conformacional da proteína, capaz de reduzir a afinidade tanto pelo nucleotídeo, quanto pela droga. O segundo ciclo teria início com a hidrólise de outra molécula de ATP, realizada pelo outro sítio de ligação a nucleotídeos, sendo esta energia liberada necessária para devolver a proteína a sua conformação original. A posterior liberação do ADP concluiria o segundo ciclo, tornando a P-gp capaz de iniciar um novo ciclo de transporte da droga.



**Figura 4 – Ciclo catalítico proposto para os transportadores ABC.** (Senior *et al.*, 1995, Sauna *et al.*, 2001). (1) A droga e a primeira molécula de ATP ligam-se à proteína em seus respectivos sítios. (2) Hidrólise do ATP em ADP + Pi, que fornece energia para o transporte da droga. (3) Fim do primeiro ciclo - liberação do ADP do sítio de ligação a nucleotídeos, com concomitante mudança conformacional gerada pela liberação do ADP que reduz a afinidade pelo nucleotídeo e pela droga. (4) Ligação de outra molécula de ATP, iniciando o segundo ciclo – a energia liberada é utilizada para devolver a proteína a sua conformação original. A posterior liberação do ADP conclui o segundo ciclo, fazendo com que a P-gp possa iniciar um novo ciclo catalítico.

▼ Droga; ● ATP; ◐ ADP+Pi; ⚡ Energia; == Membrana plasmática;  
 ■ Sítio de ligação de ATP com alta afinidade; ● Sítio de ligação de ATP com baixa afinidade; ■ Sítio de ligação a drogas com alta afinidade; ■ Sítio de ligação a drogas com baixa afinidade.

### 1.3. Resistência a múltiplas drogas em *Saccharomyces cerevisiae*

Nos fungos, as duas maiores classes de transportadores envolvidos na resistência a múltiplas drogas são os transportadores ABC e membros da família MFS, que apresentam doze domínios transmembranares e utilizam como energia para o transporte a força próton motriz (Lage, 2003).

Duas diferentes análises do genoma das leveduras revelaram a presença de 30 (Taglicht & Michaelis, 1998) ou 29 (Decottignies & Goffeau, 1997) “Open Reading Frames” (ORFs) de possíveis proteínas ABC. Destes, até a presente data, apenas cinco já tiveram função relacionada a resistência à múltiplas drogas, e são: Pdr5p, Snq2p, Pdr12p, Yor1p e Ycfp1, sendo que os três primeiros apresentam topologia [NBD-TMS<sub>6</sub>]<sub>2</sub>, ou seja, uma topologia invertida (Balzi *et al.*, 1994; Bissinger & Kuchler, 1994).

Dois genes, PDR1 e PDR3, codificam fatores de transcrição pertencentes à família Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>, que regulam a expressão dos genes PDR5, SNQ2 e YOR1 (Decottignies *et al.*, 2001). Mutações do tipo “ganho de função” conferem a esses fatores de transcrição a capacidade de induzir a superexpressão das proteínas Pdr5p, Snq2p e Yor1p em membranas plasmáticas. De forma geral, a expressão dos transportadores ABC em *S. cerevisiae* está sob o controle de uma complexa rede de regulação que envolve, além dos fatores de transcrição Pdr1p e Pdr3p, outros fatores reguladores da resposta ao stress (Kolaczowska & Goffeau, 1999).

Já foi observada uma sobreposição nos perfis de substratos dos produtos dos genes PDR5, SNQ2 e YOR1. Isto é observado em casos em que a sensibilidade total de uma cepa a um determinado composto só é obtida quando se faz dupla ou tripla deleção desses genes (Kolaczowski *et al.*, 1998). Para algumas drogas, as cepas deletadas em PDR1 e PDR3 são mais sensíveis que as cepas deletadas nos três genes de transportadores ABC, indicando que

possam existir outros genes regulados por Pdr1p e Pdr3p, além dos genes estudados envolvidos na resistência a múltiplas drogas em leveduras.

O papel fisiológico desses transportadores ainda não está bem definido, mas foi sugerido por Mamnun, Schüller & Kuchler (2004) uma função para a Pdr5p no efluxo de produtos de catabolismo na fase de crescimento exponencial da levedura *S. cerevisiae*. Um transportador de *S. cerevisiae*, que apresenta função bem definida, é o produto do gene STE6, que apresenta grande homologia com a P-gp de mamíferos e os transportadores da família PDR. Esta proteína não está envolvida no transporte de drogas, mas sim no efluxo do feromônio sexual **a** (Kuchler *et al.*, 1989).

#### **1.4. A proteína Pdr5p**

A Pdr5p é um transportador da superfamília ABC, homóloga à P-gp de mamíferos, que apresenta alta massa molecular (~160 kDa) e topologia invertida ([NBD-TMS<sub>6</sub>]<sub>2</sub>). Seu gene foi inicialmente identificado como sendo capaz de conferir resistência à cicloheximida, sulfometiluron e outras drogas, quando amplificada por um plasmídeo multicópias (Leppert *et al.*, 1990). A Pdr5p e a P-gp são homólogos funcionais, ou seja, apesar da topologia invertida e da homologia na seqüência de aminoácidos limitada, as duas compartilham um grande número de substratos e inibidores, o que torna a Pdr5p um ótimo modelo para estudos na busca de inibidores para a P-gp, assim como para transportadores homólogos de microrganismos patogênicos, como Cdr1p, presente em cepas resistentes a azóis de *Candida glabrata* (Sanglard *et al.*, 1999).

Em estudos com mutantes que superexpressam a Pdr5p, foi demonstrado que esta é capaz de hidrolisar outros nucleotídeos trifosfatados além do ATP, como o UTP,

apresentando os melhores níveis de atividade ATPásica e UTPásica em pH 7,5 (Decottignies *et al.*, 1994).

Entretanto, no transporte de rodamina, uma sonda fluorescente hidrofóbica, o único nucleotídeo trifosfatado capaz de promover o processo é o ATP, o que poderia indicar que, apesar de ser capaz de hidrolisar todo tipo de nucleotídeo trifosfatado (ATP, UTP, GTP, CTP, ITP) em velocidades comparáveis, apenas o ATP seria capaz de interagir adequadamente com o sítio de ligação a droga, induzindo a mudança de conformação necessária para o transporte do substrato (Kolaczowski *et al.*, 1996).

#### **1.4.1. Substratos e moduladores da Pdr5p**

Já foi demonstrado que a Pdr5p compartilha diversos substratos com a P-gp, entre eles, drogas utilizadas na quimioterapia anticâncer, peptídeos ionóforos e esteróides (Kolaczowski *et al.*, 1996). Além disso, a Pdr5p é capaz de conferir resistência a diversos azóis, polienos, herbicidas, além de outras classes de drogas (Kolaczowski *et al.*, 1998), com espectros que se sobrepõem aos de outros transportadores ABC de leveduras (Snq2p e Yor1p, por exemplo). No entanto, a Pdr5p é o único transportador capaz de conferir resistência celular à cicloheximida, benomil, fluxilazol, nuarimal, fenapromil e sorafen (Decottignies *et al.*, 2001).

Em alguns casos, a Pdr5p é capaz de conferir resistência *in vivo* a determinados compostos, porém estes se apresentam como potentes inibidores da ligação de rodamina 6G, que, por sua vez, também é transportada em células intactas. Como exemplo, temos a oligomicina, que é um excelente inibidor da Pdr5p, apresentando um IC<sub>50</sub> próximo a 82 nM

para o transporte de drogas, mas que não é capaz de inibir o crescimento das células (Kolaczkowski *et al.*, 1996).

Conseil e colaboradores (2003) demonstraram que um derivado de estradiol, RU49953, apresentou grande poder de inibição da Pdr5p, com um IC<sub>50</sub> próximo a 0,083 µM para a ligação de rodamina 6G, porém a capacidade de inibição da atividade UTPásica da proteína foi 400 vezes maior, indicando que a inibição (que foi caracterizada como competitiva) estaria ocorrendo no sítio de ligação a drogas, e não no sítio de ligação de nucleotídeos.

Como a P-gp e outros transportadores homólogos possuem uma região passível de fosforilação por proteínas cinases, foi proposto que esta região estaria envolvida no controle do efluxo de drogas, já que foi demonstrado que a P-gp era capaz de ser fosforilada tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e que inibidores de proteína cinase C (PKC) eram capazes de inibir tanto a fosforilação, quanto a atividade da P-gp. Entretanto, foram realizadas mutações em todos os resíduos passíveis de fosforilação da P-gp e não se observou alteração na resistência a drogas. Assim, Conseil e colaboradores (2001) demonstraram que inibidores de PKC, como derivados da estaurosporina, são capazes de se ligar diretamente a transportadores como P-gp, Pdr5p e *ltmdr1* (de *Leishmania tropica*). A inibição do processo de efluxo de drogas afetava tanto a ligação de rodamina 6G, como a hidrólise de nucleotídeos de forma não competitiva, sugerindo que este efeito estaria relacionado a uma interferência na transdução de sinal entre a hidrólise do nucleotídeo e a interação com a droga, e não à inibição da fosforilação desta proteína, o que é compatível com os resultados obtidos para a P-gp.

Conseil e colaboradores (2000) descreveram também o efeito de diversos prenilflavonóides sobre a Pdr5p. Nesse trabalho, observou-se que esta nova classe de inibidores da enzima em questão liga-se com alta afinidade à mesma. Este efeito foi correlacionado à capacidade de inibição da ligação de rodamina 6G ao(s) sítio(s) de ligação a drogas da

proteína. Esta inibição demonstrou ser competitiva pelo sítio de ligação a drogas, o que foi confirmado pelo fato de que a hidrólise tanto de ATP como de UTP ocorreu em concentrações muito mais altas. Dos derivados de flavonóides testados, o que demonstrou ser mais eficiente foi a 6-(3,3-dimetilalil)-galangina, com uma constante de inibição ( $K_i$ ) de  $0,18\mu\text{M}$  para a ligação de rodamina 6G.

#### **1.4.2. Cepas AD12345678 e AD1245678**

Os diversos transportadores da família ABC de leveduras apresentam sobreposições em seus espectros de ação. Além disso, estes são normalmente expressos em quantidades muito baixas em cepas selvagens, o que gera um grande problema aos estudos bioquímico e fisiológico dessas proteínas (Decottignies *et al.*, 2001).

Com o objetivo de construir cepas mutantes que proporcionassem o estudo bioquímico desses transportadores, foram deletados os genes de diversos transportadores ABC de leveduras, como YOR1, SNQ2, PDR5, PDR10, YCF1, PDR11 e PDR15, em diferentes combinações. Foram realizadas mutações do tipo “ganho de função” nos genes PDR1 E PDR3, capazes de aumentar em grandes proporções a expressão dos seus genes-alvo (Decottignies *et al.*, 1998). Assim, a cepa AD1245678 expressa grandes quantidades da proteína Pdr5p selvagem, ativa e funcional, o que torna esta cepa naturalmente resistente a múltiplas drogas. Com esta superexpressão, que se deve também ao forte promotor do gene PDR5, os níveis expressos de Pdr5p são comparáveis aos da  $\text{H}^+$ -ATPase, que é a proteína que se apresenta de forma majoritária (10 a 20% do conteúdo de proteínas) na membrana plasmática de leveduras, codificada pelo gene PMA1, e sem a qual a célula se torna metabolicamente inviável (Decottignies *et al.*, 1998).

A cepa AD12345678 apresenta todos os genes anteriormente mencionados deletados, e pode servir como controle para ensaios com células intactas e ser utilizada como cepa hipersensível a diversos compostos que serviriam como substratos para os transportadores ABC (Decottignies *et al.*, 2001).

Ferreira-Pereira e colaboradores (2003) utilizaram a cepa AD12345678 para expressar um alelo do gene PDR5 que apresenta um “tag” de histidina. Este procedimento teve como objetivo facilitar a purificação desta proteína a partir de fragmentos de membrana plasmática, utilizando uma coluna de níquel-NTA, o que proporcionou uma grande quantidade de proteína pura, para ser utilizada em diversos tipos de experimentos, como o estudo de inibidores.

## **1.5. Resistência a antifúngicos e importância clínica da reversão deste fenótipo**

A incidência de infecções fúngicas cresceu consideravelmente após o aparecimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), do uso de imunossupressores e da terapia anticâncer. Os azóis fluconazol, itraconazol e cetoconazol estão entre os poucos agentes adequados ao tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, que são geralmente fatais. Apesar de o número de agentes antifúngicos ter aumentado significativamente nos últimos 25 anos, apenas três classes de antifúngicos, além dos azóis, são adequadas ao tratamento das infecções sistêmicas. Estas são os polienos (anfotericina B), os análogos de nucleosídeos (fluorocitosina) (Kolaczowski *et al.*, 2003) e as equinocandinas (Bartizal *et al.*, 1997). Apesar disso, a anfotericina B apresenta uso limitado por seus efeitos colaterais, a fluorocitosina não é recomendada como monoterapia devido à grande incidência de casos de

resistência e as equinocandinas têm seu uso limitado devido a seu alto custo. O uso de triazóis fungistáticos, como o fluconazol é geralmente preferido, por causa de seus efeitos colaterais mais amenos, sendo uma droga mais bem-tolerada. Pela mesma razão, esta também é a droga de escolha nos tratamentos profiláticos de longa duração de pacientes imunocomprometidos. Entretanto, já existem diversos microrganismos resistentes a esta classe de antifúngicos

Novas classes de antifúngicos estão em desenvolvimento, como é o caso das aurobasidinas, que inibem a biossíntese de esfingolipídeos. Porém, seus alvos são intracelulares, o que torna essas drogas susceptíveis aos mecanismos de detoxificação celular ou de efluxo, que poderiam levar à resistência a essas drogas (Kuroda *et al.*, 1999).

Uma tentativa de se superar estes problemas é a busca por substâncias re-sensibilizadoras, compostos capazes de potencializar a eficácia dos antifúngicos já existentes. Como exemplo de drogas capazes de ter essa ação, temos os imunossupressores FK506 (Maesaki *et al.*, 1998) e a ciclosporina A (Marchetti, Entenza *et al.*, 2000). Del Poeta e colaboradores (2000) demonstraram que, além de potencializar o efeito do fluconazol, o sinergismo entre este e FK506 age como fungicida, em vez de fungistático, frente a *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. O mecanismo pelo qual ocorre este sinergismo ainda é desconhecido, embora saiba-se que o FK506 é capaz de inibir a função de transportadores como a Pdr5p, ligando-se a um de seus domínios transmembranares. Apesar destes resultados excelentes, o uso na clínica desta combinação para tratamento de pacientes imunocomprometidos não é viável, uma vez que ambas as drogas são imunossupressoras.

A descoberta e o desenvolvimento de novas substâncias re-sensibilizadoras, que aumentem a potência de antifúngicos como o fluconazol pode oferecer uma alternativa no combate a infecções fúngicas e aumentar a vida comercial destas drogas (Niimi *et al.*, 2004).

### 1.5.1 A busca na natureza por novas substâncias re-sensibilizadoras

Os vegetais produzem uma grande variedade de metabólitos secundários e sabe-se que uma parte significativa desses compostos é utilizada como um mecanismo intrínseco na proteção contra microrganismos patogênicos. Algumas dessas substâncias são produzidas constantemente, enquanto outras têm seus níveis aumentados quando ocorre uma invasão microbiana. Existem espécies de plantas que se apresentam bastante resistentes à invasão ou infecção por patógenos (Dixon, 2001).

Em alguns casos, substâncias isoladas de plantas resistentes a invasões por microrganismos são avaliadas *in vitro* quanto a seu poder antimicrobiano, mas não apresentam eficácia comparável aos antimicrobianos isolados de algumas espécies de bactérias ou fungos, como é o caso da eritromicina ou da penicilina, sendo os valores de concentração mínima inibitória (MIC) 10 a 100 vezes maiores. Entretanto, esta situação se explicou através do isolamento de antimicrobianos da mesma planta em que substâncias que potencializam seu efeito foram obtidas. É o caso do sinergismo observado por Stermitz e colaboradores (2000) entre dois compostos isolados da planta *Berberis*, a berberina, um antimicrobiano, e 5'-metoxihidnocarpina, que é um inibidor de transportadores de múltiplas drogas. Esta hipótese é confirmada por Tegos e colaboradores (2002), em um trabalho que demonstra que as atividades antimicrobianas de diversas substâncias isoladas de plantas, mas que apresentavam eficiência relativamente baixa, são potencializadas com a utilização concomitante de inibidores de transportadores de múltiplas drogas.

Diversos grupos estão atualmente buscando na flora possíveis agentes inibidores de transportadores ABC. Além disso, estão sendo testados os efeitos de substâncias como flavonóides (Kuntz *et al.*, 1999), diterpenos (Corea *et al.*, 2003), polimetoxiflavonas

(Ikegawa *et al.*, 2000), entre outras, sobre células cancerosas que apresentam o fenótipo MDR.

Conseil e colaboradores (1998) descrevem a utilização de domínios citoplasmáticos recombinantes da P-gp de camundongos em testes de novos inibidores para esta proteína. Foram utilizados alguns flavonóides e, através deste estudo, foi possível propor a localização do sítio de ligação dos flavonóides na proteína. Observou-se que os flavonóides são moduladores bifuncionais, ou seja, estes são capazes de inibir a ligação do ATP, bem como a ligação dos esteróides, o que leva à conclusão de que o sítio de ligação dos flavonóides se sobrepõe parcialmente ao sítio de ligação de ATP e ao sítio de ligação de esteróides, que são adjacentes e estão presentes no domínio citoplasmático da proteína. Além disso, dando continuidade a este estudo, Boumendjel e colaboradores (2002) ampliaram este trabalho e estabeleceram relações entre a estrutura dos flavonóides e sua atividade sobre o sítio de ligação a nucleotídeos 2 (NBD2) da P-gp. Isto foi feito através da medição da afinidade entre eles, quantificada por uma constante de dissociação ( $K_D$ ). Foram utilizadas as estruturas básicas de flavonóides e seus derivados, produzidos através de mudanças nos padrões de substituição. Observou-se que o fato de alguns flavonóides serem capazes de antagonizar a ligação do ATP, bem como do seu derivado fluorescente MANT-ATP (como é o caso das flavonas), estaria relacionado a sua capacidade de mimetizar o grupamento adenina do ATP. Também foi observado que aqueles flavonóis que apresentavam uma cadeia lateral que aumentasse sua lipofilicidade tinham incrementada a interação com regiões que vão além do sítio de ligação a nucleotídeos, provavelmente a região hidrofóbica de ligação a esteróides, adjacente a este.

Com base nestes achados, e no fato de que existem diversas classes de compostos produzidos pelos vegetais, como flavonóides, alcalóides ou terpenóides, estes tornam-se uma

fonte inesgotável de novas substâncias com efeitos sobre sistemas biológicos ainda a serem descobertos.

Desta forma, nesta tese, pretendemos demonstrar o efeito de diferentes extratos de plantas encontradas na flora brasileira sobre a Pdr5p, visando a descoberta de novos inibidores para esta proteína e suas homólogas. Estes inibidores poderiam também ser utilizados na tentativa de elucidação dos mecanismos de inibição desta proteína, bem como na terapia anticâncer e antifúngica, promovendo a reversão do fenótipo de resistência das células que expressam esses transportadores. Assim, os quimioterápicos atualmente disponíveis poderiam voltar a ser ativos e utilizados no tratamento em que se detecta este tipo de resistência.

É importante ressaltar que, até o presente momento, não há qualquer atividade biológica descrita para a maioria das espécies utilizadas neste estudo, embora existam trabalhos que citam atividades apenas para gênero, o que se deve à grande biodiversidade de nossa flora, que ainda não é totalmente conhecida.

## **2. OBJETIVOS**

- 1. Estudar os efeitos de extratos de algumas plantas encontradas na flora brasileira sobre a atividade enzimática da Pdr5p presente em membranas plasmáticas de *S.cerevisiae*.**
- 2. Iniciar o isolamento de substâncias, a partir dos extratos que se mostraram ativos, que possam agir como inibidores da enzima Pdr5p.**
- 3. Utilizando estes novos inibidores de origem natural, aprofundar os estudos do mecanismo de inibição da atividade catalítica da Prd5p.**

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram do mais alto grau de pureza.

### **3.2. Obtenção dos extratos etanólicos de plantas**

Os extratos foram obtidos a partir das folhas trituradas, das diferentes espécies de plantas, por extração com etanol comercial 96°GL em percolador até que o líquido obtido fosse incolor. O solvente foi evaporado posteriormente em rotavapor. No momento de sua utilização, os extratos eram dissolvidos em solução dimetilsulfóxido/água a 20% (v/v) para os ensaios de inibição da atividade ATPásica.

### **3.3. Particionamento dos etanólicos**

Os extratos etanólicos foram dissolvidos em uma solução de metanol/água a 10% (v/v), realizando-se em seguida uma extração com solventes orgânicos imiscíveis. Os solventes utilizados apresentam polaridades crescentes (hexano < diclorometano < acetato de etila < butanol). As partições obtidas foram novamente secas em rotavapor, com eliminação total do solvente e dissolvidas em solução de dimetilsulfóxido/água a 20% (v/v), como descrito anteriormente.

### **3.4. Fracionamento das partições selecionadas**

#### **3.4.1. Partição em Acetato de Etila do Extrato de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis***

A partição em acetato de etila do extrato de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* foi fracionada através de cromatografia em coluna de gel de sílica (diâmetro  $\emptyset = 3,5$  cm, h = 67 cm) e eluída com proporções crescentes de acetona e água em acetato de etila seguida de metanol e acetato de etila. Estas condições foram determinadas após testes prévios no próprio laboratório da Prof. Suzana Leitão (Faculdade de Farmácia/ UFRJ).

#### **3.4.2. Partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera***

##### **3.4.2.1. Cromatografia contra-corrente (primeiro fracionamento)**

A cromatografia contra-corrente foi realizada segundo método descrito por Marston e colaboradores (1988).

##### **3.4.2.2. Segundo fracionamento da partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera***

A Fração 41-49 da partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera*, obtida através de cromatografia contra-corrente, que apresentava maior quantidade de material, foi selecionada para passar por um novo fracionamento, que desta vez foi realizado utilizando uma coluna Sephadex LH-20, eluída com 100% de metanol. As frações foram coletadas e a

mistura de solventes utilizada foi evaporada. Para nossa utilização, dissolvemos as amostras novamente em uma solução de dimetilsulfóxido/água a 20% (v/v). As condições foram determinadas após testes prévios no próprio laboratório da Prof. Gilda Leitão (Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais/ UFRJ).

### **3.5. Crescimento do microrganismo**

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AD12345678 6HIS ( $\Delta$ yor1::hisG,  $\Delta$ snq2::hisG,  $\Delta$ pdr5::hisG,  $\Delta$ pdr10::hisG,  $\Delta$ pdr11::hisG,  $\Delta$ ycf1::hisG,  $\Delta$ pdr3::hisG, Decottignies *et al.*, 1998; Ferreira-Pereira *et al.*, 2003), que superexpressa o alelo PDR5-6HIS foi crescida em meio de cultura YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), contendo dextrose 2%, extrato de levedura 1% e peptona 2%, por aproximadamente 17 h, até uma leitura da densidade ótica de aproximadamente 1,0 a 600nm, que corresponde à fase de crescimento exponencial.

### **3.6. Isolamento de membranas plasmáticas de *S. cerevisiae***

O isolamento das membranas plasmáticas foi feito como descrito por Goffeau e Dufour (1988), com algumas modificações feitas pelo nosso grupo. Após o crescimento, as células foram lavadas com solução de azida sódica a 10 mM e mantidas em gelo. Estas sofreram digestão química da parede celular a 37°C por 1 h com zimolase 20T<sup>®</sup>, na proporção de 6,6 mg de enzima para cada unidade de densidade ótica obtida após o crescimento. Em seguida, a fração mitocondrial foi eliminada por centrifugação a 12000 rpm durante 30 minutos e a

fração bruta de membranas plasmáticas foi isolada por centrifugação a 17000 rpm por 45 minutos. As alíquotas obtidas foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A medida da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando albumina bovina (BSA) como solução padrão.

### **3.7. Medida da atividade ATPásica da Pdr5p**

A atividade ATPásica foi medida pela incubação de aproximadamente 13,0  $\mu\text{g}$  de proteína a  $37^{\circ}\text{C}$  em um volume final de 0,5 mL, de um meio de reação padrão contendo ATP-Na 3 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM, EGTA 1 mM e Tris-HCl 100 mM ajustado para pH 7,5, além dos inibidores enzimáticos (para outras ATPases e/ou fosfatases de membrana) ouabaína 0,5 mM, thapsigargina 10 nM, azida sódica 1 mM e  $\text{KNO}_3$  50 mM. A reação era disparada pela adição da enzima e paralisada após 60 minutos, pela adição de 1,0 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (p/v) seguindo o método descrito por Dulley (1965). O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP foi medido de acordo com o método descrito por Fiske & Subbarow (1925).

Neste meio também eram adicionados os extratos a serem testados, em concentrações diferentes (discriminadas nas legendas das figuras), dependendo do experimento a ser realizado. Nos experimentos de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p pelo ácido gálico foi necessária a utilização de um sistema regenerador para as concentrações mais baixas de ATP (0,5 e 1,0 mM), que consiste de fosfoenolpiruvato 2 mM e da enzima piruvato kinase 180 unidades.

### **3.8. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas dos resultados obtidos nesta tese foram realizadas através da utilização do programa Sigma Plot V. 8.0<sup>®</sup> (SPSS Science Marketing).

## 4. RESULTADOS

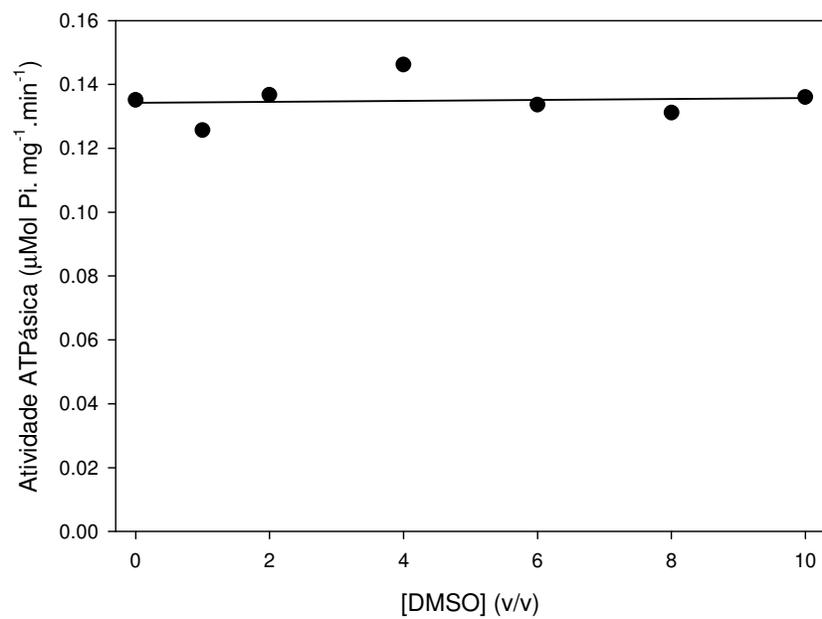
### 4.1. Efeito do solvente DMSO na atividade ATPásica da Pdr5p

Todos os extratos empregados neste trabalho foram solubilizados em uma solução de DMSO/água a 20% (v/v). Desta forma, como controle inicial, avaliamos o efeito de concentrações de DMSO no meio de reação, para verificar se haveria algum tipo de interferência deste solvente com a atividade ATPásica da Pdr5p. Como pode ser observado na Figura 5, o DMSO não foi capaz de modificar a atividade da enzima até a concentração máxima de 10% no meio de reação.

Sendo assim, este resultado nos proporcionou uma certeza de que o solvente orgânico, utilizado como veículo dos extratos, não ocasionava efeitos na atividade da enzima, visto que a concentração final máxima que teríamos de DMSO no meio de reação, gerada pela mais alta concentração de extrato adicionada, seria uma concentração final de 8% do referido solvente.

### 4.2. Efeito dos diferentes extratos sobre a atividade ATPásica da Pdr5p

Em uma primeira etapa, foram selecionadas 43 plantas da flora brasileira para a obtenção dos referidos extratos etanólicos, a partir de folhas ou frutos (no caso do jiló, *Solanum gilo*), sendo que para a grande maioria destas espécies, não foi encontrada qualquer atividade biológica relatada na literatura até o presente momento.



**Figura 5 - Efeito do solvente DMSO sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.** As medidas foram realizadas em meio padrão, como descrito em “Materiais e Métodos”, variando-se a concentração de DMSO, de 0 a 10%.

Devido ao grande número de extratos a serem utilizados, inicialmente foi feita uma triagem para verificar a capacidade de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p por esses extratos, utilizando-se uma concentração fixa (de 200 µg/mL) para todos eles.

Com os resultados obtidos (Tabela I), podemos observar que uma grande parte dos extratos testados apresentou um efeito inibitório sobre a atividade enzimática da Pdr5p. Entretanto, foram escolhidos aqueles extratos que apresentaram inibição igual ou superior a 50% da atividade ATPásica da enzima (quando comparados com a atividade controle) para que pudessem ser utilizados nos ensaios seguintes. Desta forma, foram selecionados 14 extratos, referentes às seguintes espécies (os valores entre parênteses se referem à atividade residual da enzima, expressa em percentagem, e o erro padrão): *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* (27,87 ± 0,94) (Fabaceae), *Astronium fraxinifolium* (36,00 ± 5,71) (Anacardiaceae), *Croton foribundus* (36,88 ± 6,00) (Euphorbiaceae), *Brosimum guianense* (37,76 ± 1,97) (Moraceae), *Sparattosperma leucanthum* (37,82 ± 4,75) (Bignoniaceae), *Luehia grandiflora* (39,85 ± 5,23) (Tiliaceae), *Aparisthmium cordatum* (43,01 ± 0,57) (Euphorbiaceae), *Pera heteranthera* (44,48 ± 2,57) (Euphorbiaceae), *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* (45,35 ± 2,89) (Fabaceae), *Dalbergia nigra* (45,74 ± 0,60) (Fabaceae), *Bathysa australis* (45,77 ± 5,33) (Rubiaceae), *Melanoxylon brauna* (45,77 ± 5,33) (Fabaceae), *Mabea fistulifera* (48,04 ± 1,17) (Euphorbiaceae) e *Virola oleifera* (51,20 ± 1,27) (Myristicaceae).

### 4.3. Curvas de inibição com os extratos selecionados

Após a triagem dos extratos, testando-os com uma concentração fixa de 200 µg/mL, realizamos experimentos utilizando os extratos selecionados em concentrações que variaram

**Tabela I – Atividade ATPásica da Pdr5p na presença dos 43 extratos utilizados no experimento de triagem.**

NOME	FAMÍLIA	ATIVIDADE RELATIVA (%)*
<i>Bauhinia microstachya</i> var. <i>microstachya</i>	Fabaceae	27,87 ± 0,94
<i>Astronium fraxinifolium</i>	Anacardiaceae	36,00 ± 5,71
<i>Croton floribundus</i>	Euphorbiaceae	36,88 ± 6,00
<i>Brosimum guianense</i>	Moraceae	37,76 ± 1,97
<i>Sparattosperma leucanthum</i>	Bignoniaceae	37,82 ± 4,75
<i>Luehia grandiflora</i>	Tiliaceae	39,85 ± 5,23
<i>Aparisthium cordatum</i>	Euphorbiaceae	43,01 ± 0,57
<i>Bathysa australis</i>	Rubiaceae	43,14 ± 1,88
<i>Pera heteranthera</i>	Euphorbiaceae	44,48 ± 2,57
<i>Bauhinia microstachya</i> var. <i>massambabensis</i>	Fabaceae	45,35 ± 2,89
<i>Dalbergia nigra</i>	Fabaceae	45,74 ± 0,60
<i>Melanoxylon brauna</i>	Fabaceae	45,77 ± 5,33
<i>Mabea fistulifera</i>	Euphorbiaceae	48,04 ± 1,17
<i>Virola oleifera</i>	Myristicaceae	51,20 ± 1,27
<i>Cariniana estrellensis</i>	Lecythidaceae	54,79 ± 2,69
<i>Caesaria sylvestris</i>	Flacourtiaceae	55,44 ± 2,39
<i>Guettarda virburnoides</i>	Rubiaceae	56,38 ± 6,11
<i>Ficus gomelleria</i>	Moraceae	56,77 ± 5,00
<i>Lippia alba</i> forma <i>intermédia</i>	Verbenaceae	56,83 ± 3,04
<i>Pera leandri</i>	Euphorbiaceae	57,78 ± 9,62
<i>Lippia origanoides</i>	Verbenaceae	57,92 ± 3,04
<i>Peschiera affinis</i>	Apocynaceae	59,02 ± 6,73
<i>Carpotroche brasiliensis</i>	Flacourtiaceae	59,08 ± 8,13
<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Fabaceae	64,08 ± 4,77
<i>Anadenanthera colubrina</i>	Fabaceae	64,42 ± 4,25
<i>Simira glaziovii</i>	Rubiaceae	64,51 ± 3,24
<i>Pouteria filipes</i>	Sapotaceae	65,67 ± 2,21
<i>Apuleia leiocarpa</i>	Fabaceae	66,49 ± 5,60
<i>Sorocea bonplandii</i>	Moraceae	67,31 ± 4,22
<i>Malouetia arborea</i>	Apocynaceae	68,33 ± 5,52
<i>Solanum gilo</i>	Solanaceae	69,39 ± 1,44
<i>Bombacopsis stenopetala</i>	Bombacaceae	70,31 ± 2,27
<i>Vitex cymosa</i>	Verbenaceae	71,03 ± 8,94
<i>Siparuna reginae</i>	Monimiaceae	71,89 ± 8,51
<i>Senifildera multiflora</i>	Euphorbiaceae	72,29 ± 1,96
<i>Guapira opposita</i>	Nyctaginaceae	72,67 ± 2,79
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	Rutaceae	73,93 ± 0,78
<i>Siparuna arianae</i>	Monimiaceae	74,63 ± 5,36
<i>Cabralea canjerana</i>	Meliaceae	79,64 ± 0,77
<i>Cedrela fissilis</i>	Maliaceae	79,98 ± 2,61
<i>Simira sampaioana</i>	Rubiaceae	85,81 ± 5,25
<i>Psychotria vellosiana</i>	Rubiaceae	93,35 ± 4,70
<i>Plathymentia foliolosa</i>	Fabaceae	96,36 ± 8,26

\*A atividade ATPásica foi ensaiada em preparações de membrana utilizando-se uma concentração fixa de extrato para cada teste, de 200 µg/mL. Os valores representam a média ± o erro padrão de 3 experimentos independentes. A atividade específica do controle (sem adição de nenhum extrato) foi de 0,17 ± 0,02 µMol Pi. mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e foi considerada 100%.

de 0 a 400  $\mu\text{g/mL}$ . Obtivemos, em todos os casos, curvas de inibição dose-dependentes com perfis semelhantes, como mostrado na Figura 6.

Com o auxílio do programa Sigma Plot v.8.0 (SPSS Science Marketing), foi possível estimar, a partir do “fitting” das curvas de inibição, o  $\text{IC}_{50}$  dos extratos utilizados nesta fase do trabalho, sendo estes resultados sumarizados na Tabela II .

Com base nos valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos, decidimos selecionar para os experimentos seguintes alguns daqueles extratos que apresentaram os valores de  $\text{IC}_{50}$  mais baixos. Foram escolhidos os extratos das seguintes espécies: *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* (19,89  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fabaceae), *Virola oleifera* (22,80  $\mu\text{g/mL}$ ) (Myristicaceae), *Bathysa australis* (35,32  $\mu\text{g/mL}$ ) (Rubiaceae), *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* (40,21  $\mu\text{g/mL}$ ) (Fabaceae) e *Mabea fistulifera* (42,88  $\mu\text{g/mL}$ ) (Euphorbiaceae).

Esta seleção levou em consideração também a quantidade de material disponível dos extratos para dar continuidade ao trabalho, bem como a possibilidade de uma nova coleta, devido à época do ano em que foram inicialmente coletados.

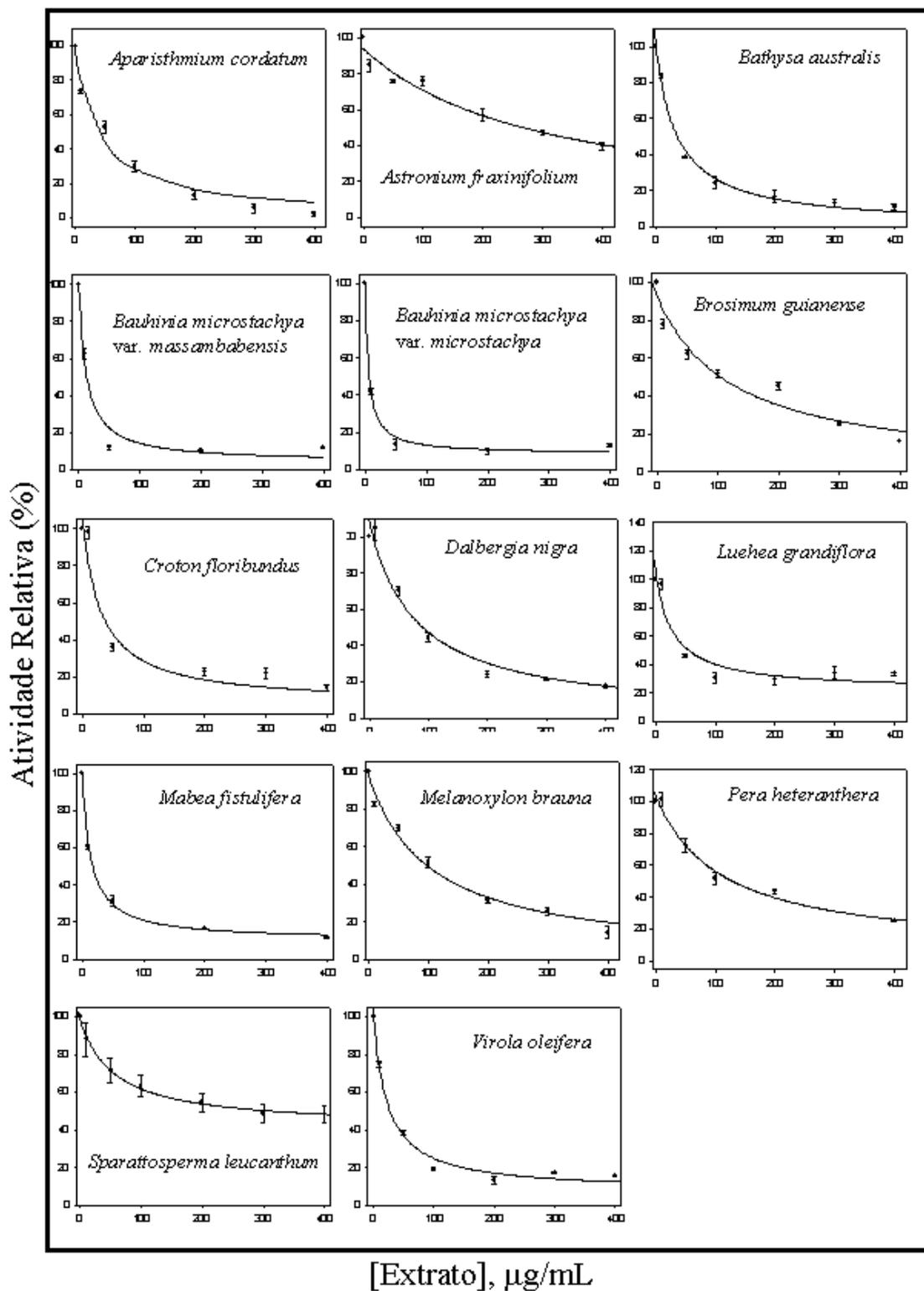


Figura 6 - Curvas de inibição realizadas com os 14 extratos de maior efeito inibitório. As preparações de membranas foram incubadas em meio de reação padrão com concentrações crescentes de extrato, como descrito em “Materiais e Métodos”. Média de 3 experimentos.

**Tabela II – Valores de IC<sub>50</sub> obtidos a partir das curvas de inibição dos 14 extratos selecionados.**

<b>NOME</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)*</b>
<i>Aparisthium cordatum</i>	40,42
<i>Astronium fraxinifolium</i>	305,63
<i>Bathysa australis</i>	35,32
<i>Bauhinia microstachya var. massambabensis</i>	19,89
<i>Bauhinia microstachya var. microstachya</i>	40,21
<i>Brosimum guianense</i>	121,83
<i>Croton floribundus</i>	29,00
<i>Dalbergia nigra</i>	77,76
<i>Luehia grandiflora</i>	27,66
<i>Mabea fistulifera</i>	42,88
<i>Melanoxylon brauna</i>	102,13
<i>Pera heteranthera</i>	107,42
<i>Sparattosperma leucanthum</i>	55,05
<i>Virola oleifera</i>	22,80

\*Os valores foram obtidos com o auxílio do programa Sigma Plot v.8.0 (SPSS Science Marketing) a partir das curvas de concentração dos extratos selecionados (Figura 6).

#### **4.4. Particionamento dos extratos selecionados**

Como mencionado na introdução desta tese, pretendíamos, a partir dos extratos brutos, isolar a(s) substância(s) ativa(s) presente(s) nestes extratos, rastreando-as através da capacidade de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p. Sendo assim, o primeiro passo na tentativa de separar os diferentes compostos presentes nestes extratos foi a obtenção de partições dos mesmos, utilizando solventes de diferentes polaridades.

Este processo foi realizado através da solubilização dos extratos brutos em uma solução de metanol/água a 10% (v/v), realizando-se em seguida uma extração com solventes orgânicos imiscíveis. Os solventes utilizados apresentam polaridades crescentes (hexano < diclorometano < acetato de etila < butanol), e sua utilização tem como objetivo extrair substâncias diferentes, de polaridade semelhante à do solvente utilizado.

As partições obtidas foram novamente secas, com eliminação total do solvente e dissolvidas em solução de DMSO/Água a 20% (v/v), como descrito anteriormente. Estas soluções foram testadas frente à atividade ATPásica da Pdr5p, utilizando-se uma concentração fixa de 200 µg/mL, como em nosso primeiro experimento de triagem, para que pudéssemos compará-las e dar prosseguimento ao processo de purificação dos extratos com as partições mais convenientes.

As partições do extrato de *Mabea fistulifera* foram capazes de inibir a atividade da enzima Pdr5p de forma mais eficiente do que o extrato etanólico inicial, tendo sido a partição em acetato de etila a mais eficiente, como pode ser observado na Figura 7A.

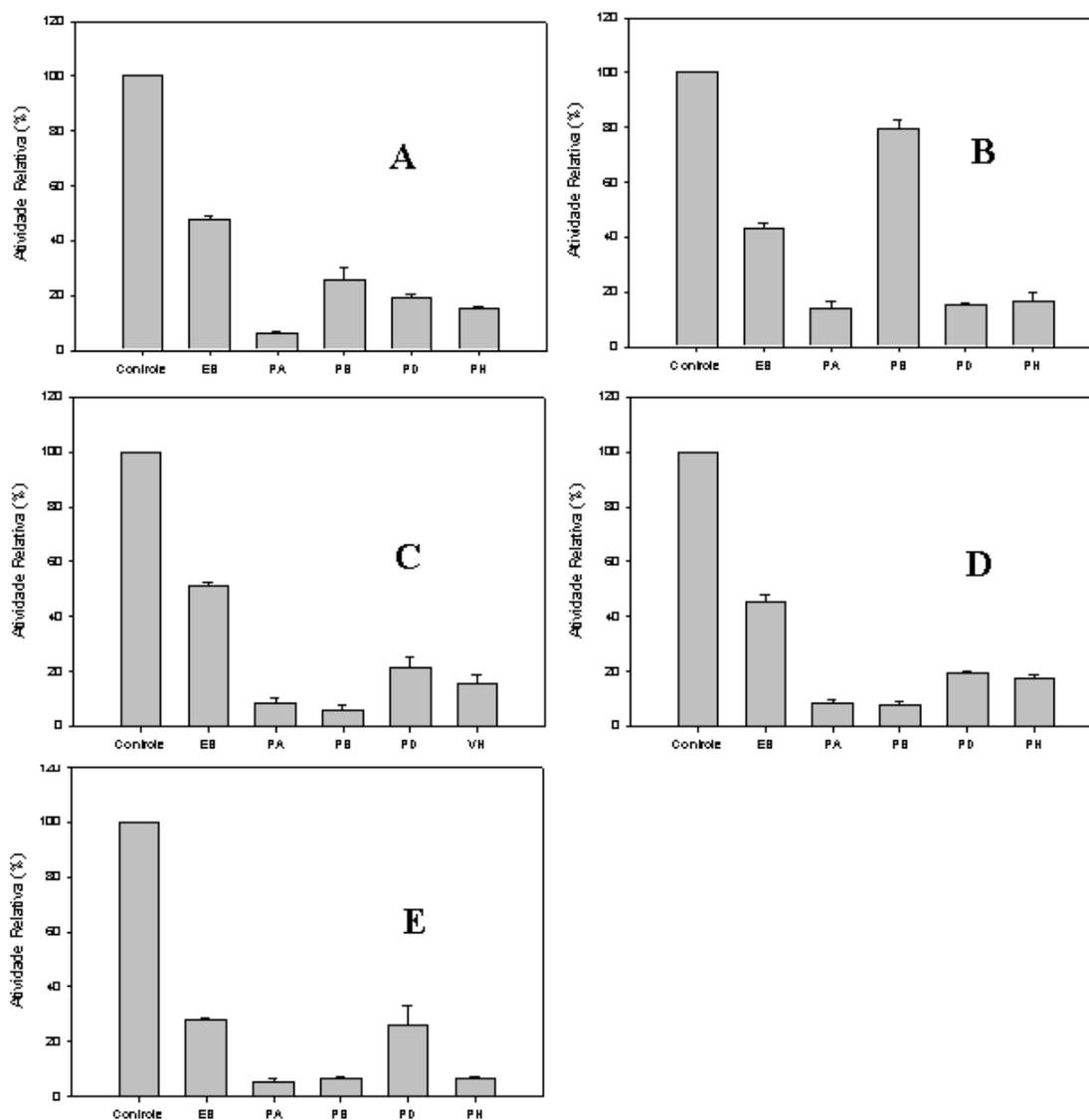
A Figura 7B mostra o efeito das partições do extrato de *Bathysa australis* sobre a atividade ATPásica da Pdr5p. Neste caso, ocorre um efeito bastante interessante, que é o fato de a partição em butanol não ter sido capaz de inibir eficientemente a atividade ATPásica da enzima, podendo indicar que este solvente não tenha sido capaz de extrair a(s) substância(s) responsável(is) pelo efeito sobre a enzima. Por outro lado, as partições em acetato de etila, diclorometano e hexano apresentaram efeitos inibitórios, e foram mais eficientes que o extrato bruto.

Na Figura 7C, temos o efeito das partições do extrato de *Virola oleifera* sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de *S. cerevisiae*. Nesta, podemos observar que todas as partições obtidas apresentaram uma capacidade de inibição da atividade catalítica da Pdr5p intensa, sendo que as partições em butanol e acetato de etila foram as que apresentaram os

melhores resultados. Podemos observar também que todas as partições foram capazes de inibir a atividade ATPásica da Pdr5p de forma mais eficiente que o extrato bruto que lhes deu origem, o que pode indicar que todos os solventes utilizados foram capazes de extrair do extrato bruto a(s) substância(s) com a atividade biológica esperada. A Figura 7D mostra que as partições do extrato de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* tiveram efeitos sobre a atividade ATPásica da Pdr5p bastante parecidos com o do extrato bruto, tendo sido as partições em acetato de etila e butanol as mais eficientes.

Por fim, para o extrato de *Bauhinia microstachya* var. *microstachya*, observamos na Figura 7E que a partição em diclorometano apresentou capacidade de inibição semelhante à do extrato bruto, enquanto que as demais partições apresentaram resultados melhores e bastante semelhantes entre si.

Com base nos resultados obtidos, associados à disponibilidade de material, foram selecionadas para continuar esta tentativa de isolamento de substâncias destes extratos, as partições em acetato de etila de *Mabea fistulifera* e acetato de etila de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis*.

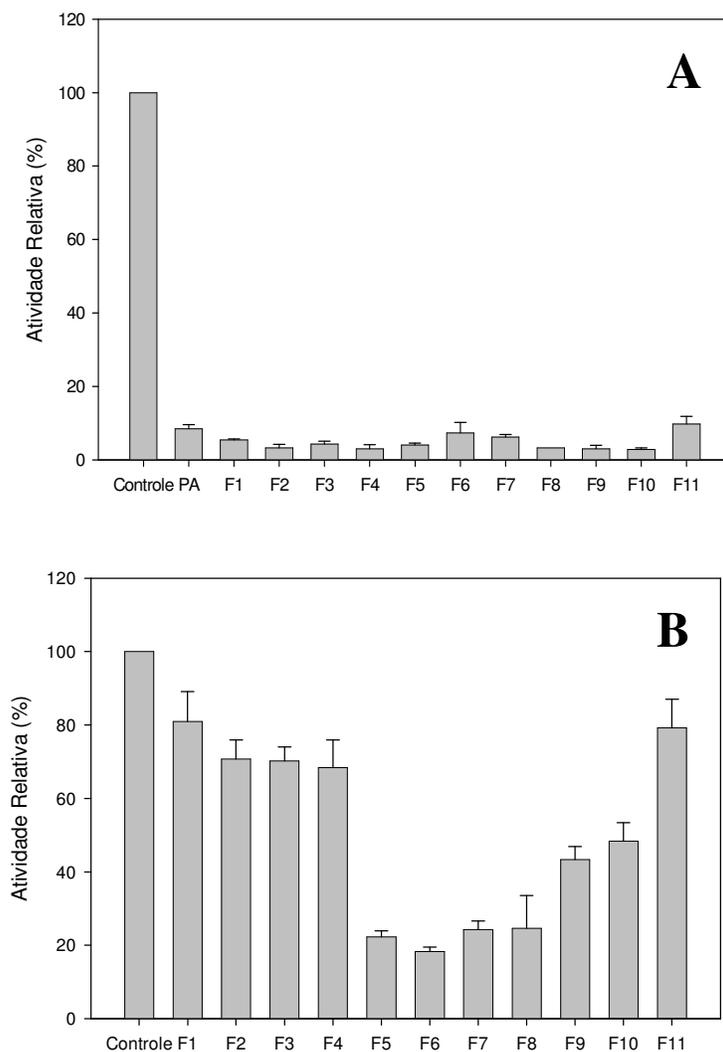


**Figura 7 – Efeito das partições do extrato bruto de *Mabea fistulifera* sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.** As partições, na concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , foram incubadas com preparações de membranas contendo a Pdr5p, em ensaio padrão descrito em “Materiais e Métodos”. **A**, *Mabea fistulifera*; **B**, *Bathysa australis*; **C**, *Virola oleifera*; **D**, *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis*; **E**, *Bauhinia microstachya* var. *microstachya*. **PA**, partição em acetato de etila; **PB**, partição em butanol; **PD**, partição em diclorometano; **PH**, partição em hexano, **EB**, extrato bruto (extrato etanólico inicial). Os resultados representam a média de 3 experimentos. O controle refere-se à atividade ATPásica na ausência de qualquer partição e corresponde a 100%.

#### 4.5. Fracionamento das partições selecionadas

Com o objetivo de separar as substâncias contidas nas partições selecionadas, estas foram submetidas a um fracionamento, utilizando duas diferentes técnicas cromatográficas.

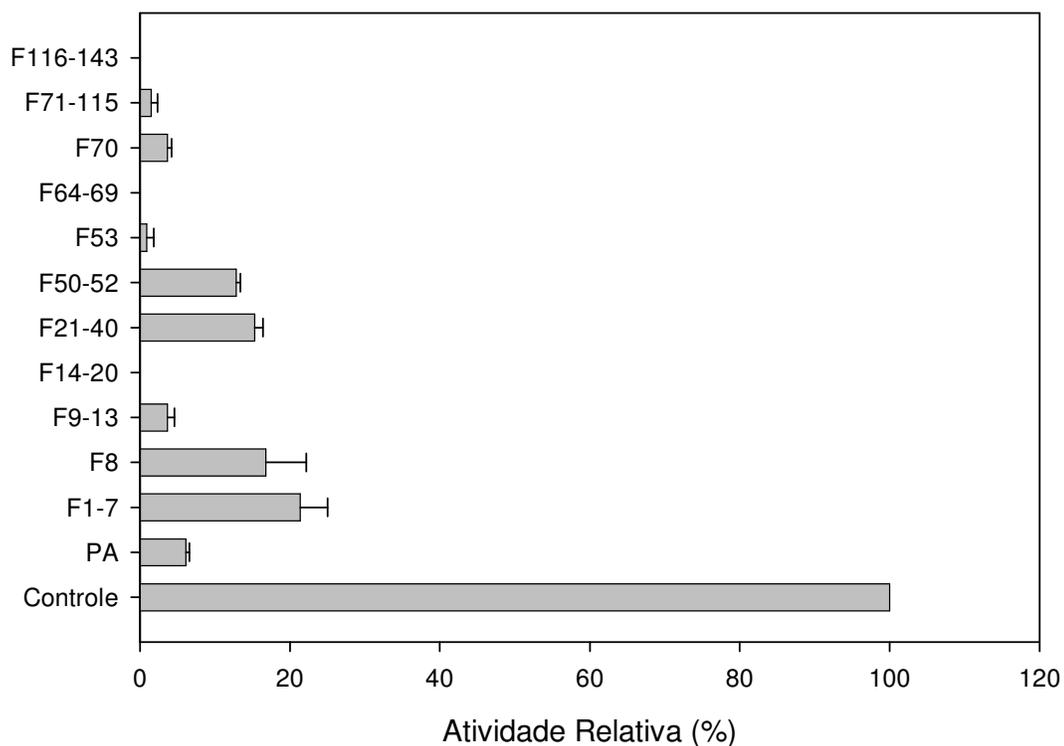
A partição em acetato de etila do extrato de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* foi fracionada através de cromatografia em coluna de gel de sílica (diâmetro  $\varnothing = 3,5$  cm, h = 67 cm) eluída com proporções crescentes de acetona e água em acetato de etila seguida de metanol e acetato de etila e, após a passagem na referida coluna, foram obtidas onze novas frações. As frações obtidas nesta coluna foram testadas novamente frente à atividade ATPásica da Pdr5p, em uma concentração fixa de 200  $\mu\text{g/mL}$ , a mesma utilizada para o extrato bruto e suas partições, com o objetivo de comparação com os mesmos, e os resultados são mostrados na Figura 8A. Observa-se que todas as frações testadas tiveram um efeito semelhante sobre a atividade ATPásica da Pdr5p nesta concentração e foram bastante eficientes na inibição. Entretanto, não foi possível identificar entre elas a mais eficiente. Por isso, decidimos testá-las novamente com uma concentração mais baixa, de 20  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 8B), próxima ao  $\text{IC}_{50}$  do extrato bruto (que era de 19,89  $\mu\text{g/mL}$ ), visando identificar aquelas frações que apresentariam a maior concentração dos compostos com atividade sobre a Pdr5p. Neste experimento, observou-se que algumas das frações apresentavam capacidades inibitórias diferentes. Desta forma, as frações 5, 6, 7 e 8, que foram as mais eficientes, foram selecionadas para um novo fracionamento, na tentativa de se isolar seus componentes.



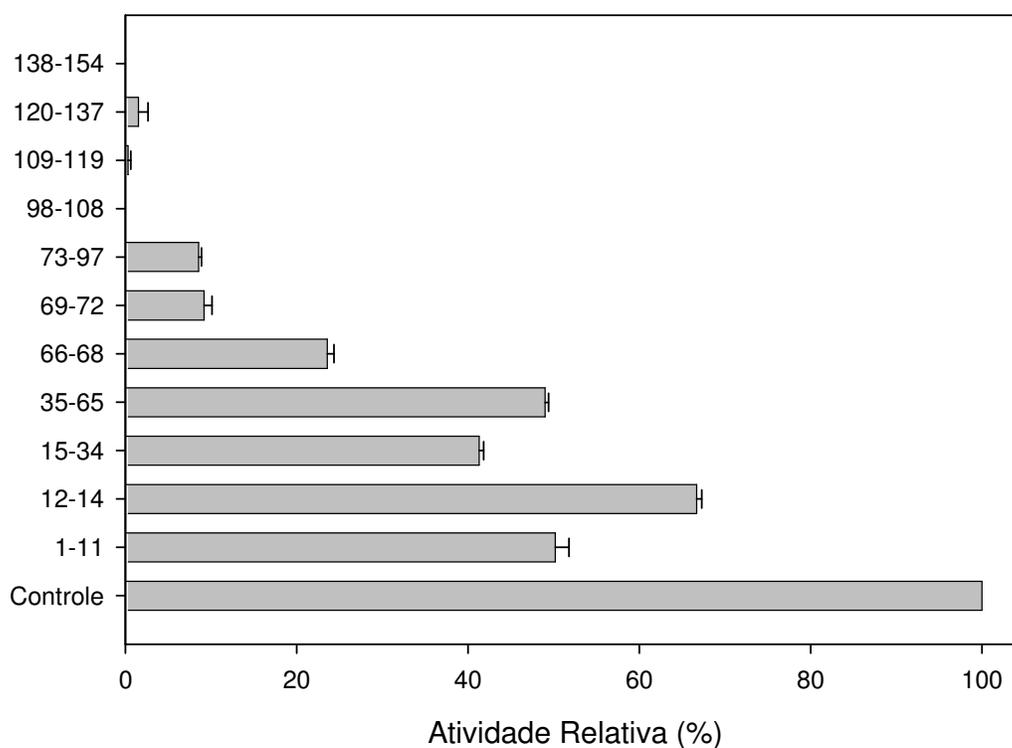
**Figura 8 - Efeito das frações do extrato de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.** As diferentes frações (F1-F11), (A) na concentração de 200 µg/mL e (B) na concentração de 20µg/mL, foram testadas frente à atividade ATPásica da Pdr5p em experimento padrão, descrito em “Materiais e Métodos”. PA, partição em acetato de etila que deu origem às frações. Os dados mostrados correspondem à média  $\pm$  o erro padrão de 3 experimentos independentes.

No fracionamento da partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera*, a técnica utilizada foi a de cromatografia contra-corrente, que é uma cromatografia líquido-líquido, que utiliza duas fases de solventes imiscíveis, sem a necessidade de um suporte sólido (para revisão, ver Marston *et al.*, 1988). Neste fracionamento, foram obtidas 143 frações, que foram agrupadas em treze frações, de acordo com sua composição, obtida através de cromatografia em camada fina (CCF) (dados não mostrados). Podemos observar na Figura 9 que algumas das frações testadas foram capazes de inibir totalmente a atividade ATPásica da enzima, enquanto que outras tiveram eficiência em torno de 20%. Entretanto, devido à escassez de material, não foi possível fracioná-las novamente na tentativa de isolar as substâncias que compõem essas frações.

A fração 41-49, que apresentava maior quantidade de material, não foi testada frente à atividade ATPásica da Pdr5p e foi selecionada para passar por um novo fracionamento, que desta vez foi realizado utilizando uma coluna Sephadex LH-20, com 100% de metanol. Nesta etapa, foram obtidas 154 novas frações, que novamente foram agrupadas. O efeito dessas frações agrupadas sobre a Pdr5p de membranas plasmáticas de *S. cerevisiae* é mostrado na Figura 10. Podemos observar que, das frações obtidas, as que foram recolhidas do meio para o final do fracionamento (66-154) foram as que apresentaram maior efeito sobre a atividade ATPásica da nossa preparação de membranas, sendo que quatro destas frações (98-108, 109-119, 120-137, 138-154) foram capazes de inibir totalmente a atividade ATPásica da preparação de membranas. Entretanto, as quantidades obtidas destas frações eram muito pequenas, o que impossibilitou a separação de seus componentes. Foi possível o isolamento de uma substância, presente em frações de 35 a 65, que foram agrupadas e nomeadas como 35-65. A presença de uma única substância foi detectada através de CCF e esta foi recentemente identificada como ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) por  $^1\text{H-NMR}$  e  $^{13}\text{C-NMR}$  (dados não mostrados).



**Figura 9 - Efeito das frações obtidas no primeiro fracionamento da partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera* sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.** As diferentes frações (1-143) foram testadas frente à atividade ATPásica da Pdr5p, com uma concentração fixa de 200  $\mu\text{g/mL}$ , em experimento padrão descrito em “Materiais e Métodos”. PA, partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera*. Os dados mostrados correspondem à média  $\pm$  o erro padrão de 3 experimentos independentes.

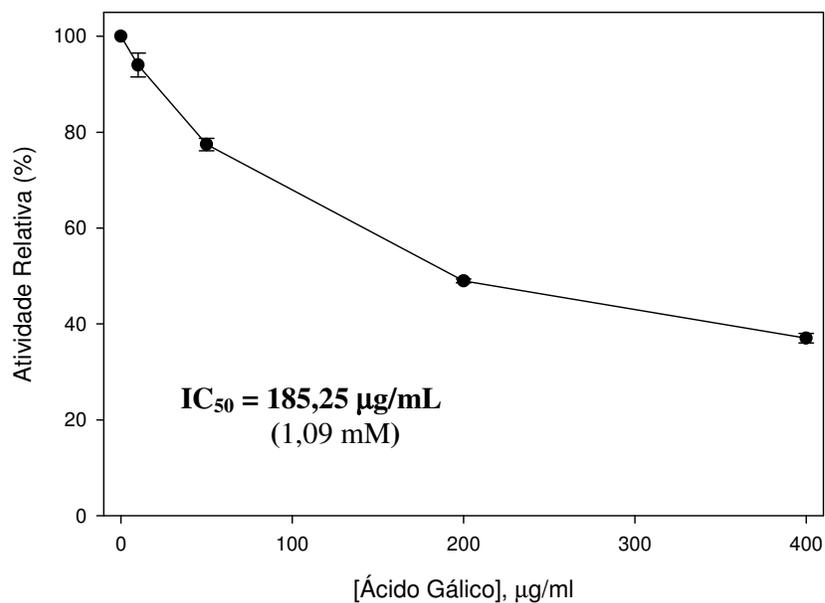


**Figura 10 - Efeito das frações obtidas no segundo fracionamento da partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera* sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.** A avaliação do efeito dessas frações frente à atividade ATPásica da preparação de membranas foi realizada como descrito anteriormente (ver “Materiais e Métodos”), com uma concentração fixa de 200µg/mL. Neste segundo fracionamento, foram utilizadas as frações 41-49 do primeiro fracionamento para uma nova coluna cromatográfica. Os dados mostrados correspondem à média  $\pm$  o erro padrão de 3 experimentos independentes.

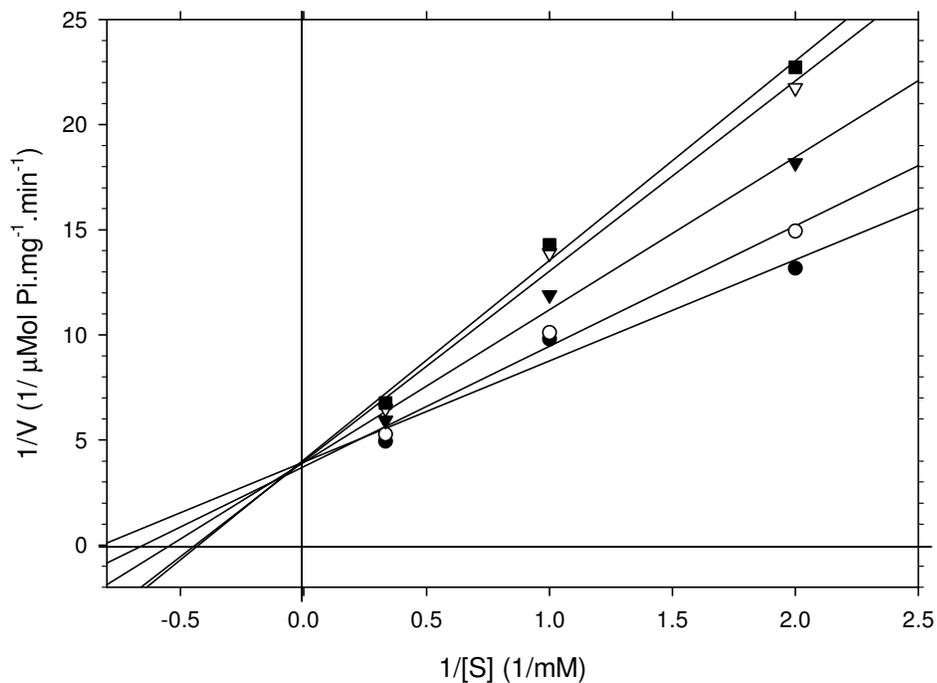
#### 4.6. Inibição da Pdr5p em membranas pelo ácido gálico

Como o ácido gálico (isolado do extrato de *Mabea fistulifera*) apresentou a capacidade de inibir a proteína Pdr5p, e não há na literatura nenhum relato deste efeito, decidimos caracterizar a inibição realizada por este composto sobre a enzima em questão. Para isso, inicialmente realizamos uma curva com concentrações variando de 0 a 400  $\mu\text{g/mL}$  desta substância (Figura 11) e observamos uma inibição dose-dependente. A partir dela, também estimamos o  $\text{IC}_{50}$ , que ficou em torno de 185,25  $\mu\text{g/mL}$ , o que corresponde a 1,09 mM. Este valor foi calculado como descrito anteriormente para os extratos brutos, com o auxílio do programa Sigma Plot v.8 (SPSS Science Marketing).

O próximo passo foi estudar a inibição realizada por esta substância sobre a Pdr5p, como mostrado na Figura 12. Quando concentrações crescentes de ácido gálico foram utilizadas na presença de concentrações crescentes do substrato ATP, ocorreu uma inibição da atividade da enzima do tipo competitivo, que pode ser observada através do gráfico de duplo-recíproco. Este resultado indica que o ácido gálico exerce seu efeito inibitório sobre a Pdr5p através da ligação a seu domínio de ligação a nucleotídeos.



**Figura 11 – Curva de Concentração com a substância isolada do extrato de *Mabea fistulifera*, Ácido gálico.** Foram utilizadas preparações de membrana em meio padrão como descrito em “Materiais e Métodos” na presença de concentrações crescentes de ácido gálico. O IC<sub>50</sub> para este inibidor foi estimado, com auxílio do programa Sigma Plot v.8 (SPSS Science Marketing) e o valor obtido foi de 185,25 (µg/mL). Os dados mostrados correspondem à média ± o erro padrão de 3 experimentos independentes.



**Figura 12 – Tipo de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p pelo Ácido gálico.** Gráfico de duplo-recíproco da atividade ATPásica, com concentrações diferentes do substrato ATP: 0,5 mM, 1,0 mM e 3,0 mM, na ausência (●) ou com concentrações de ácido gálico de 0,3 mM (○), 1,2 mM (▼), 2,4 mM (▽) e 4,8 mM (■). Os dados mostrados se referem a um experimento típico.

## 5. DISCUSSÃO

Diversos transportadores da família ABC estão envolvidos no fenômeno de resistência a múltiplas drogas. Entre eles, temos a Pdr5p de *S. cerevisiae*, capaz de conferir resistência a diversos quimioterápicos, peptídeos ionóforos e esteróides (Kolaczowski *et al.*, 1996). Sabe-se que os transportadores ABC possuem dois domínios de ligação a nucleotídeos e que estes estão envolvidos no transporte dos substratos, fornecendo energia para este processo. Sendo assim, ocorre uma estimulação da hidrólise de nucleotídeos trifosfatados quando há o transporte. Na presença de inibidores para esses transportadores, o que se observa é uma redução da utilização destes nucleotídeos, o que indica que não está ocorrendo transporte, ou melhor, que a proteína perdeu sua função, reversível ou irreversivelmente, devolvendo o fenótipo de sensível à célula que anteriormente era resistente. Este processo é importante por ser capaz de recuperar a utilidade de diversas drogas da terapia anticâncer, antimicrobiana e antifúngica, em casos de pacientes ou microrganismos anteriormente resistentes, pois se sabe que estes “arsenais” quimioterápicos são limitados (Niimi *et al.*, 2004).

Nesta tese, apresentamos o efeito de 43 extratos oriundos da flora brasileira sobre a atividade ATPásica da Pdr5p de leveduras, presente em membranas plasmáticas da espécie *S. cerevisiae*. Buscamos também, através de técnicas cromatográficas de separação, isolar possíveis inibidores para esse transportador, o que pode proporcionar uma nova alternativa na quimioterapia de alguns pacientes, devido à sua grande homologia com transportadores envolvidos neste processo de resistência. Além disso, pretendemos contribuir para um melhor entendimento do processo de inibição e funcionamento desta proteína.

Acredita-se que, de todas as espécies de plantas catalogadas (estimadas entre 250.000 e 350.000), em torno de 35.000 sejam utilizadas em todo o mundo com propósitos medicinais, e que por volta de 80% da população mundial faz uso dessas plantas. Entretanto,

estima-se que apenas uma pequena fração das espécies identificadas e nomeadas até hoje tenha sido estudada (Jin-Ming *et al.*, 2003). A utilização de extratos vegetais e substâncias isoladas a partir destes em pesquisas, buscando novos princípios ativos que possam ajudar na quimioterapia anticâncer e antimicrobiana, tem sido relatada na literatura (Ahmad *et al.*, 2001, Corea *et al.*, 2003). Diversos trabalhos relatam a seleção de substâncias ativas a partir de uma família de compostos ou de diversas espécies de plantas, o que leva a uma triagem entre possíveis inibidores de um determinado alvo (Kuntz *et al.*, 1999; Conseil *et al.*, 2003; Kolaczowski *et al.*, 2003, Niimi *et al.*, 2004). Muitos trabalhos deste tipo podem ser encontrados na literatura, o que demonstra o real interesse e preocupação de grupos de pesquisa no mundo inteiro em buscar novas substâncias ativas que venham a colaborar com o tratamento de doenças que ainda não possuem uma cura definitiva.

Sendo assim, o objetivo principal desta tese foi encontrar e estudar entre as 43 espécies de plantas utilizadas, das quais a maioria ainda não apresenta atividades biológicas relatadas, algumas que apresentem a capacidade de inibir a enzima Pdr5p de *S. cerevisiae*, visando a obtenção de novas substâncias capazes de reverter o fenótipo conferido por esta proteína.

O primeiro passo na realização deste trabalho foi a definição do solvente orgânico a ser utilizado, visto que os extratos de plantas são compostos por substâncias orgânicas, em sua grande maioria, insolúveis em água. O solvente DMSO foi selecionado por ser capaz de solubilizar todos os extratos quando presente em baixas concentrações em soluções aquosas, e pelo fato de existirem diversos relatos de sua utilização em estudos de atividades enzimáticas (para revisão, ver de Meis, 1989). Entretanto, para que fosse utilizado, era necessário que este não fosse capaz de interferir na medição da atividade ATPásica da nossa preparação de membranas. Desta forma, testamos várias concentrações deste solvente orgânico, até uma concentração final de 10%, valor este que era superior à concentração final

máxima que seria utilizada nos nossos experimentos. Como demonstrado na Figura 5, nas concentrações a serem utilizadas neste trabalho, o DMSO foi eficiente como solvente e sua utilização nos experimentos mostrou-se eficaz, visto que o mesmo não promoveu interferência com relação ao meio de reação e atividade da enzima.

Definido o solvente a ser utilizado, tornou-se necessário definir uma estratégia para a seleção de um número restrito de extratos, uma vez que o número inicial (43 extratos de plantas) era bastante elevado. A abordagem selecionada para a busca de novos inibidores para a Pdr5p, a partir desses extratos, foi a de restringir, ao longo do trabalho, o número de espécies estudadas, ao mesmo tempo em que nos aprofundávamos no estudo de algumas, visando chegar ao isolamento de substâncias com a capacidade de inibir a enzima em questão. Assim, decidimos realizar primeiramente uma triagem entre esses extratos, em um experimento que comparasse o efeito de todos eles, fixando a concentração utilizada de cada um (Tabela I). Com esta abordagem, pretendíamos selecionar aqueles que possuísem as maiores concentrações das substâncias ativas ou aqueles que tivessem as substâncias com maior atividade sobre a enzima em questão. Neste experimento, constatamos que alguns extratos apresentaram grande capacidade de inibição da atividade ATPásica da Pdr5p, enquanto outros não apresentaram efeito (inibitório ou ativador), como é o caso dos extratos de *Plathymenia foliosa* ou *Psycotria vellosiana*. Estes resultados são bastante interessantes, uma vez que indicam que o efeito inibitório de alguns extratos, observado sobre a atividade ATPásica da enzima, não se deve a possíveis contaminantes, como resíduos do solvente utilizado na extração (etanol), e confirmando uma vez mais, que o solvente utilizado nestes experimentos (DMSO) não produziu qualquer tipo de interferência sobre o sistema utilizado.

As curvas de concentração com os quatorze extratos selecionados (Figura 6) apresentaram perfis semelhantes de dose-resposta, com diferenças apenas no que diz respeito aos valores de IC<sub>50</sub>. Para algumas, como é o caso dos extratos de *Bauhinia microstachya* var.

*massambabensis*, *Bauhinia microstachya* var. *microstachya* e *Bathysa australis*, as concentrações testadas foram suficientes para levar a atividade ATPásica da preparação de membranas bem próxima a inativação completa. Em outros casos, as concentrações necessárias para uma completa inibição da atividade ATPásica não foram atingidas, mas o perfil dessas curvas nos leva a crer que em concentrações maiores, que por impossibilidades técnicas não nos foi possível testar, isso poderia perfeitamente ter um resultado semelhante, ou seja, a completa inativação da enzima.

Podemos observar que, para ambas as variedades da espécie *Bauhinia microstachya* utilizadas neste trabalho, houve uma inibição da atividade ATPásica da preparação de membranas bastante eficaz. Porém, a variedade *B. microstachya* var. *massambabensis* gerou uma curva de inibição com um IC<sub>50</sub> mais baixo. Possivelmente, esta variedade seria capaz de produzir substância(s) com atividade(s) sobre a enzima Pdr5p, como o que foi observado com a variedade *B. microstachya* var. *microstachya*. Outra hipótese seria que esta variedade poderia produzir substâncias ativas em menor quantidade ou concentração do que encontrado na variedade mais ativa.

Entretanto, quando analisamos o efeito das partições obtidas com solventes de polaridades crescentes (Figura 7), o que se observa para todos os extratos, inclusive os das duas variedades de *Bauhinia microstachya*, é o aparecimento de pelo menos uma partição capaz de exercer um efeito maior que o do extrato bruto, sendo que para estes dois extratos, o efeito de todas as partições foi muito semelhante. Neste caso, podemos supor que a extração com um determinado solvente tenha favorecido a captação de um tipo específico de substância em cada extrato, levando a crer que tenha havido uma concentração da(s) molécula(s) ativa(s) na partição mais eficiente, igualando nas partições a concentração da(s) molécula(s) ativa(s) presentes nas duas variedades em quantidades diferentes. O fato de que a partição em butanol do extrato de *Bathysa australis* não exerceu efeito sobre a atividade

ATPásica da preparação de membranas confirma que a simples presença destes extratos ou suas partições no meio de reação não necessariamente gera efeitos inibitórios sobre a atividade ATPásica da enzima, mostrando que esse efeito é promovido por substâncias específicas presentes nos extratos, e não simplesmente pelo aumento da hidrofobicidade produzido no meio por causa desses compostos orgânicos.

A partição em acetato de etila do extrato de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* foi fracionada através de uma coluna cromatográfica com sílica-gel, tendo sido obtidas onze frações que após serem testadas frente à atividade enzimática da Pdr5p de membranas plasmáticas, todas apresentaram um efeito bastante semelhante na concentração de 200 µg/mL (Figura 8A), por isso, decidimos testar novamente essas frações com concentrações mais baixas (Figura 8B), próximas ao IC<sub>50</sub> obtido para o extrato bruto. Neste experimento, observou-se que algumas as frações apresentavam capacidades inibitórias diferentes, indicando que na concentração mais alta utilizada, muitas delas atingiram a concentração capaz de promover a inibição máxima sobre a proteína, o que impossibilitava a diferenciação entre elas. Desta forma, as frações 5, 6, 7 e 8, que foram as mais eficientes, foram selecionadas para um novo fracionamento, visando o isolamento de seus componentes.

No caso da partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera*, a cromatografia do tipo contra-corrente foi a técnica utilizada para o primeiro fracionamento. Algumas das frações obtidas foram capazes de inibir totalmente a atividade ATPásica da Pdr5p (Figura 9), o que pode indicar a presença de excelentes inibidores para esta enzima nestas frações, mas como não se isolou nestas frações uma substância pura, além de não se ter obtido uma quantidade de material suficiente para uma nova separação, não foi possível ir adiante com o estudo dessas frações.

A fração 41-49 não foi testada em nosso sistema, mas foi novamente fracionada, por conter uma quantidade suficiente de material para um novo fracionamento e por apresentar

uma mistura de substâncias que poderia ser separada neste novo fracionamento. Neste, foram obtidas novas 154 frações, agrupadas em 11 frações de acordo com seus componentes.

Neste segundo fracionamento (Figura 10), observou-se que as frações obtidas do meio para o final da eluição foram mais eficientes na inibição da enzima, sendo que as quatro últimas frações foram capazes de inibir completamente a atividade ATPásica da Pdr5p. Novamente, a quantidade de material era insuficiente para uma nova separação, o que impossibilitou o estudo dessas frações isoladamente. Porém, neste fracionamento, obteve-se uma substância pura, que foi encontrada nas frações 35 a 65, agrupadas posteriormente. Com o isolamento dessa substância e a constatação de que esta exercia um efeito inibitório sobre a Pdr5p, a mesma passou a ser objeto de um estudo mais aprofundado.

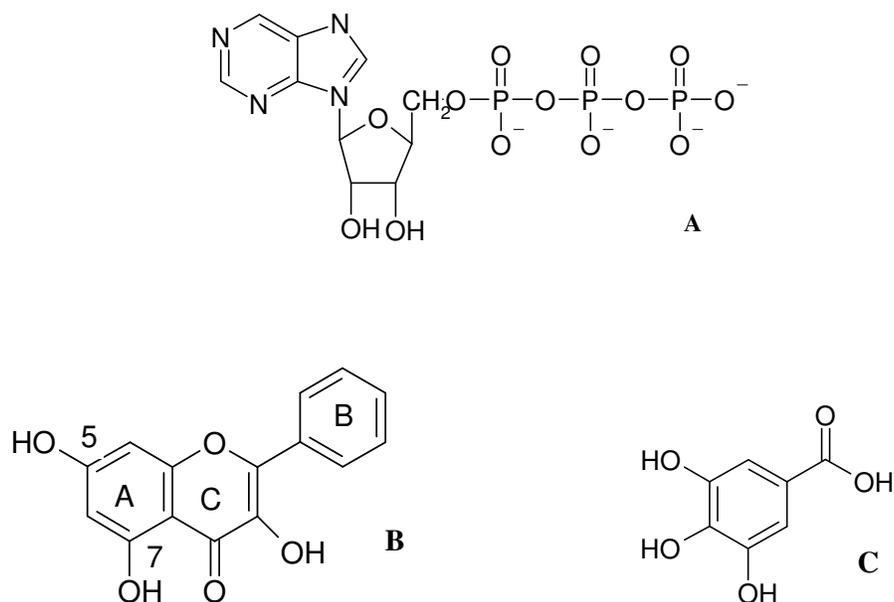
A substância isolada foi identificada como ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico). Este foi capaz de inibir a atividade ATPásica da Pdr5p em concentrações na faixa de milimolar, com o IC<sub>50</sub> de 1,09 mM, enquanto que alguns inibidores relatados na literatura, como flavonóides (Conseil *et al.*, 2000), oligomicina (Kolaczowski *et al.*, 1996), trifluoperazina (Kolaczowski *et al.*, 2003), entre outros, são capazes de atuar na faixa de micromolar. Neste caso, devemos considerar a possibilidade da ocorrência de sinergismo entre as substâncias presentes no extrato e nas partições, o que pode fazer com que, de forma isolada, elas não tenham um efeito tão satisfatório. Isso pode ter ocorrido com o ácido gálico, que, sozinho, apresentou-se menos eficiente do que as frações e partições do extrato de *Mabea fistulifera* que lhes deram origem.

Uma outra hipótese para este caso é de que este composto isolado não seja o único responsável pelo efeito inibitório do extrato, havendo a possibilidade de se isolar outras moléculas ativas a partir da mesma partição já utilizada. Também é possível que o ácido gálico tenha sido originado no processo de fracionamento, ou na evaporação do solvente utilizado, como produto de degradação de outras moléculas, como por exemplo os taninos.

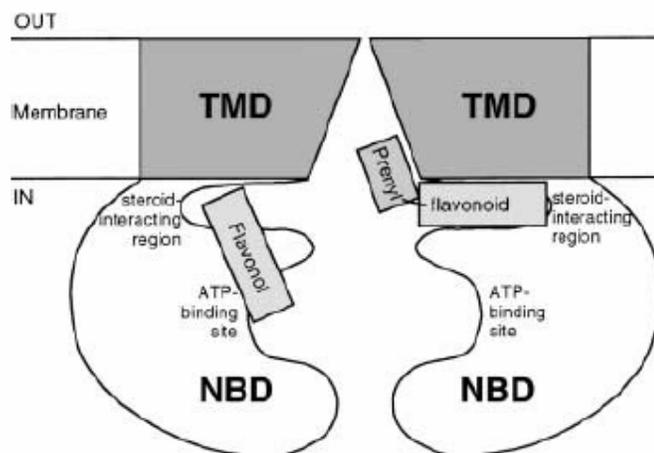
Esta poderia ser a resposta para o fato do mesmo não ter tido a eficiência esperada, pois não seria o inibidor que buscávamos no extrato, e sim um fragmento da molécula ativa.

Ao estudarmos o tipo de inibição realizado pelo ácido gálico sobre o sítio de ligação a nucleotídeos, observamos que a inibição se dá de forma competitiva, apesar do mesmo ser um inibidor de eficiência moderada, por atuar em concentrações na faixa de milimolar. Em estudos utilizando flavonóides sobre a Pdr5p (Conseil *et al.*, 2000), observa-se uma inibição do tipo não competitiva pelo sítio de ligação de ATP, com os inibidores agindo na faixa de 2,5 a 50  $\mu\text{M}$ . Entretanto, Di Pietro e colaboradores. (2002) relataram um efeito inibitório de diversos flavonóis sobre a P-gp de mamíferos, com ação sobre o sítio de ligação a nucleotídeos. A molécula seria capaz de sobrepor tanto o sítio de ligação a nucleotídeos, quanto uma região em que se acredita que se liguem esteróides, presente também no domínio citoplasmático da proteína. Neste caso, os flavonóis, que são compostos de três anéis planares conjugados, apresentando hidroxilas nas posições 5 e 7 do anel A, se ligariam ao NBD, produzindo o efeito inibitório por apresentar uma estrutura similar à da adenina, que compõe a molécula de ATP (Figura 13). Outros flavonóides, com cadeias laterais hidrofóbicas, como radicais prenila, seriam capazes de se ligar apenas ao sítio vizinho onde ocorre a ligação de esteróides, aumentando a interação com o TMD pela hidrofobicidade da cadeia lateral (Figura 14).

Analisando a estrutura do ácido gálico, a nossa proposta é que tracemos um paralelo entre sua estrutura e a do ATP, bem como a dos flavonóis. O fato de este inibidor competitivo apresentar um tamanho bastante inferior ao da molécula de ATP poderia justificar a baixa eficiência na inibição, pois a ocupação do NBD estaria se dando apenas de forma parcial, o que geraria uma dificuldade na ligação do substrato ao seu sítio. Não existem relatos na literatura que descrevam um sítio específico de ligação de esteróides à Pdr5p, porém sabe-se



**Figura 13 – Estruturas de espécies químicas** – Figura esquemática das estruturas dos compostos químicos capazes de interagir com o sítio de ligação a nucleotídeos da glicoproteína-P de mamíferos: (A) ATP e (B) flavonóis hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A. (C) Estrutura do ácido gálico.



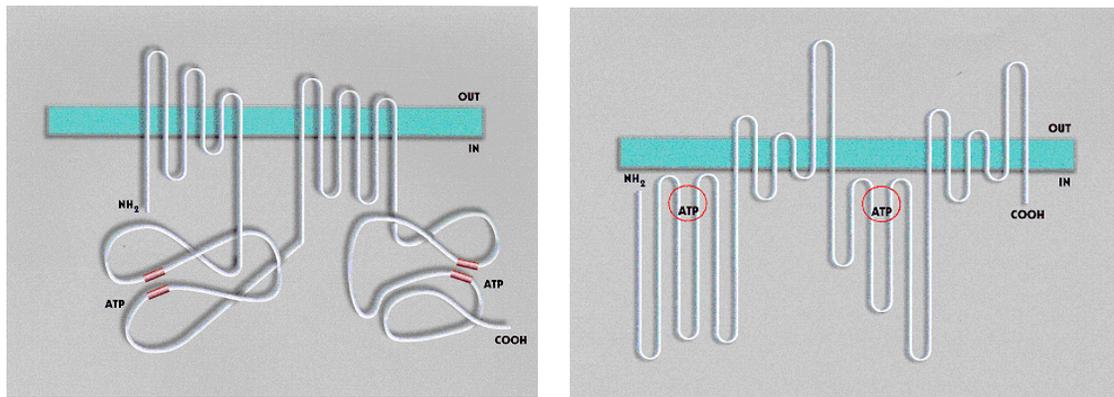
**Figura 14 – Esquema para a interação de flavonóis e prenil-flavonóides com a glicoproteína-P de mamíferos e transportadores de múltiplas drogas relacionados.** Os flavonóis, como kaempferide, galangina ou dehidrosilibina, realizariam interações bifuncionais com os domínios citoplasmáticos da proteína, ligando-se tanto aos NBDs, quanto a uma região vizinha, capaz de interagir com esteróides e derivados, tais como RU486. A prenilação favoreceria grandemente a interação com a região de ligação a esteróides e com o domínio transmembranar, o que impediria a sobreposição ao sítio de ligação de nucleotídeos (extraído de Di Pietro *et al.*, 2002).

que estes se ligam aos sítios de ligação a drogas e são transportados pela proteína (Kolaczowski *et al.*, 1996; Kolaczowski *et al.*, 1998; Mahé *et al.*, 1996), enquanto que derivados de esteróides (mais lipofílicos), como RU49953 (Conseil *et al.*, 2003) ligam-se a este sítio, mas não são transportados, agindo como inibidores da proteína em questão.

Sendo assim, a interação dos flavonóides com a Pdr5p se dá através da ligação a um dos sítios de ligação a drogas (Conseil *et al.*, 2000), como ocorre com os esteróides, sem que ocorra o transporte de alguns, o que caracteriza os que não são transportados como inibidores. Por outro lado, nada impede que o ácido gálico, assim como os flavonóides na P-gp de mamíferos, se ligue ao NBD e produza uma inibição da hidrólise de nucleotídeos, por impedir que estes se liguem adequadamente ao seu sítio.

Apesar da homologia entre a Pdr5p e a P-gp de mamíferos, existem diferenças estruturais e estas incluem a disposição dos sítios de ligação a nucleotídeos, que na P-gp estão invertidos, ou seja, voltados para lados opostos, enquanto que na Pdr5p, eles se dispõem de forma especular (Figura 15). É possível que a disposição dos NBDs na Pdr5p impeça que os flavonóis tenham a mesma ação observada na P-gp, por uma questão espacial, de acesso ao NBD. Neste caso, o ácido gálico, por ser uma molécula menor, poderia ter condições de se ligar ao NBD e promover a inibição da ligação dos nucleotídeos trifosfatados.

Ferreira-Pereira e colaboradores (2003) demonstraram uma estrutura dimérica da Pdr5p, através da reconstrução tridimensional da proteína, com os sítios de ligação a nucleotídeos de cada monômero orientados perpendicularmente, sugerindo movimentos de rotação durante seu ciclo catalítico. Por esta razão, poderíamos propor também que a rotação destes NBDs durante o ciclo catalítico exponha mais a região de ligação do nucleotídeo e facilite a entrada do ácido gálico. Sendo assim, este poderia se ligar em um determinado momento do ciclo, passando a promover a inibição da ligação de novas moléculas de nucleotídeo trifosfatado.



**Figura 15 – Modelos estruturais propostos para dois transportadores ABC.** À esquerda, representação esquemática da Glicoproteína-P de mamíferos. Modelo extraído e modificado de Endicott & Ling (1989). À direita, representação esquemática da Pdr5p de leveduras. Modelo extraído e modificado de Balzi e colaboradores (1994).

Apesar de o ácido gálico não ser um inibidor tão eficiente como os demais já descritos na literatura, este pode ser usado em experimentos cinéticos que visem o melhor entendimento do funcionamento da enzima, porém já se sabe que o mesmo apresenta grande toxicidade em organismos vivos, o que impossibilita seu uso na clínica. Entretanto, o ácido gálico costuma ser encontrado de forma livre, mas também como produto de degradação de taninos e, por esta razão, serve como um indicativo de que possa haver esta classe de produtos naturais na partição em acetato de etila do extrato de *Mabea fistulifera*. Por isto, novos fracionamentos estão sendo realizados, com o objetivo de se isolar novas substâncias que possam agir como inibidores da Pdr5p e também de proteínas homólogas a esta, presentes por exemplo, em fungos patogênicos, como é o caso de *Candida glabrata* (Wada *et al.*, 2002).

## 6. CONCLUSÕES

- Dos extratos investigados, apenas alguns exerceram um efeito inibitório acima de 50% sobre a atividade ATPásica da Pdr5p, sendo que para todos os extratos selecionados, foi observado um efeito dose-dependente nas curvas de inibição;
- Ao separar os extratos em partições de polaridades crescentes, foram observados graus de inibição diferentes, porém em todos os casos, uma das partições se apresentou mais eficiente que o extrato bruto que lhe deu origem, indicando que tenha ocorrido uma concentração dos princípios ativos nesta partição;
- Todas as frações da partição em acetato de etila de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* apresentaram uma inibição semelhante na atividade ATPásica da enzima, o que, aliado ao fato de não se ter isolado nenhum composto, demonstra a necessidade de um novo fracionamento;
- A substância isolada do extrato de *Mabea fistulifera*, o ácido gálico, não pode ser utilizada na clínica, devido a seus efeitos tóxicos já conhecidos, porém, pode ser utilizada na elucidação do ciclo catalítico bem como os mecanismos de transporte de drogas promovido pela Pdr5p;
- No estudo da inibição da atividade ATPásica da Pdr5p pelo ácido gálico, constatou-se que esta se dá de forma competitiva pelo sítio de ligação a nucleotídeos. A partir da comparação com a ação de flavonóis, que atuam no mesmo sítio da glicoproteína-P de mamíferos, acreditamos que esta inibição ocorra através da semelhança com a estrutura da base adenina que compõe a molécula de ATP. A inibição seria de baixa eficiência devido ao tamanho da molécula de ácido gálico, que é bastante inferior ao da molécula de ATP, bem como do flavonóis, podendo interagir apenas parcialmente com o sítio de ligação a nucleotídeos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Investigar a eficiência dos extratos na “re-sensibilização” de células intactas, comparando seu efeito em cepas que expressam e que não expressam a Pdr5p;
- Testar a atividade dos fitoterápicos sobre a Pdr5p purificada;
- Estudar o efeito dos fitoterápicos na ligação e transporte de rodamina 6G, com preparações de membranas e com células intactas, respectivamente;
- Refracionar uma das frações obtidas a partir da partição em acetato de etila de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis*, visando isolar o(s) composto(s) com atividade inibitória da Pdr5p;
- Fracionar as partições de maior efeito inibitório dos extratos de *Virola oleifera*, *Bathysa australis* e *Bauhinia microstachya* var. *microstachya*, na busca de novos inibidores para a Pdr5p;
- Testar as frações purificadas com maior ação inibitória em cobaias portadoras de doenças malignas, no intuito de se observar a eficácia da quimioterapia em animais resistentes.

## 4. REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. & BEG, A. Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.* **74**:113–123.
- ALTENBERG, A. G. 2003. The engine of ABC proteins. *News Physiol. Sci.* **18**:191-195.
- ALTENBERG, G. A., VANOYE, C. G., HORTON, J. K., & REUSS, L., 1994. Unidirectional fluxes of rhodamine 123 in multidrug resistant cells: evidence against direct extrusion from the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4654-4657.
- BALZI, E., WANG, M., LETERNE, S., CAPIEAUX, E. & GOFFEAU, A. 1994. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J. Biol. Chem.* **269**:2206-2214.
- BARTIZAL, K., GILL, C. J., ABRUZZO, G. K., FLATTERY, A. M., KONG, L., SCOTT, P. M., SMITH, J. G., LEIGHTON, C. E., BOUFFARD, A., DROPINSKI, J. F., & BALKOVEC, J.. 1997. In vitro preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2326–2332.
- BERGER, E. A. & HEPPEL, L. A. 1974. Different mechanisms of energy coupling for the shock-sensitive and shock-resistant amino acid permeases of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **249**:7747-7755.

- BISSINGER, P. H. & KUCHLER, K. 1994. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J. Biol. Chem.* **269**:4180-4186.
- BOUMENDJEL, A., DI PIETRO, A., DUMONTET, C. & BARRON, D. 2002. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Med. Res. Reviews* **22**:512-529.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- CONSEIL, G., BAURBICHON-CORTAY, H., DAYAN, G., JAULT, J. M., BARRON, D. & DI PIETRO, A. 1998. Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-Glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9831-9836.
- CONSEIL, G., DECOTTIGNIES, A., JAULT, J.M., COMTE, G., BARRON, D. GOFFEAU, A. & DI PIETRO, A. 2000. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **39**:6910-6917.
- CONSEIL, G., PEREZ-VICTORIA, J. M., JAULT, J. M., GAMARRO, F., GOFFEAU, A., HOFFMANN, J. & DI PIETRO, A. 2001. Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity. *Biochemistry* **40**:2564-2571.

- CONSEIL, G., PEREZ-VICTORIA, J. M., RENOIR, J. M., GOFFEAU, A. & DI PIETRO, A. 2003. Potent competitive inhibition of drug binding to the *Saccharomyces cerevisiae* ABC exporter Pdr5p by the hydrophobic estradiol-derivative RU49953. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**:131-134.
- COREA, G., FATTORUSSO, E., LANZOTTI, V., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., APPENDINO, G., BALLERO, M., SIMON, P. N., DUMONTET, C. & DI PIETRO, A., 2003. Jatrophone diterpenes as P-glycoprotein inhibitors. first insights of structure-activity relationships and discovery of a new, powerful lead. *J. Med. Chem.* **46**:3395-3402.
- DE MEIS. 1989. Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds – energy transduction in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **973**:333-349.
- DECOTTIGNIES, A. & GOFFEAU, A. 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**:137-145.
- DECOTTIGNIES, A., GRANT, A.M., NICHOLS, J.W., DE WET, H., MCINTOSH, D.B. & GOFFEAU, A. 1998. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J. Biol. Chem.* **273**:12612-12622.
- DECOTTIGNIES, A., KOLACZKOWSKI, M., BALZI, E. & GOFFEAU, A. 1994. Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J. Biol. Chem.* **269**:12797-12803.

- DECOTTIGNIES, A., ROGERS, B., KOLACZKOWSKI, M., CARVAJAL, E., BALZI, E., CONSEIL, G., NIIMI, K., DI PIETRO, A., MONK, B. C. & GOFFEAU, A. 2001. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. In: Microbial multidrug efflux, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
- DEL POETA, M., CRUZ, M.C., CARDENAS, M.E., PERFECT, J.R. & HEITMAN, J. 2000. Synergistic antifungal activities of bafilomycin A(1), fluconazole, and the pneumocandin MK-0991/caspofungin acetate (L-743,873) with calcineurin inhibitors FK506 and L-685,818 against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob. Agents Chemother. **44**:739-46.
- DEL SORBO, G., SCHOONBEEK H. & DE WAARD, M. A. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genet. Biol. **30**:1-15.
- DI PIETRO, A., CONSEIL, G., PÉREZ-VICTORIA, J.M., DAYAN, G., BAUBICHON-CORTAY, H., TROMPIER, D., STEINFELS, E., JAULT, J.-M., DE WET, H., MAITREJEAN, M., COMTE, G., BOUMENDJEL, A., MARIOTTE, A.-M., DUMONTET, C., MCINTOSH, D. B., GOFFEAU, A., CASTANYS, S., GAMARRO, F. & BARRON, D. 2002. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. Cell Mol. Life Sci. **59**:307–322.
- DIXON, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. Nature **411**:843-847.
- DULLEY, J. 1965. Determination of inorganic phosphate in the presence of detergents or protein. Anal. Biochem. **67**:91-96.

- EGNER, R., ROSENTHAL, F.E., KRALLI, A., SANGLARD, D. & KUCHLER, K. 1998. Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol. Biol. Cell* **9**:523-543.
- ENDICOTT, J.A. & LING, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:137-71.
- FERREIRA-PEREIRA, A., MARCO, S., DECOTTIGNIES, A., NADER, J., GOFFEAU, A., & RIGAUD, J.L. 2003. Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p. *J. Biol. Chem.* **278**:11995–11999.
- FISKE, C. H. & SUBBAROW, Y. J. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**:375-400.
- GOFFEAU, A. & DUFOUR, J.P. 1988. Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **157**:528-33.
- GOLIN, J., AMBUDKAR, S. V., GOTTESMAN, M. M., HABIB, A. D., SCZEPANSKI, J., ZICCARDI, W. & MAY, L. 2003. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *J. Biol. Chem.* **273**:5963-5969.
- GOLIN, J., BARKATT, A., CRONIN, S., ENG, G. & MAY, L. 2000. Chemical specificity of the PDR5 multidrug resistance gene product of *Saccharomyces cerevisiae* based on studies with tri-n-alkyltin chlorides Antimicr. *Agents Chemother.* **44**:134-138.

- GOTTESMAN, M. M. & PASTAN, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:385-427.
- GROS, P., CROOP J. & HOUSMAN D. 1986. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicating strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* **47**:371-380.
- HIGGINS C. F., HAAG P. D., NIKAIDO, K., ARDESHIR, F., GARCIA, G. & FERRO-LUZZI AMES, G. 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*, *Nature* **298**:723-727.
- HIGGINS, C. F., HILES, I. D., SALMOND, G. P. C., GILL, D. R., DOWNIE, J. A., EVANS, I. J., HOLLAND, B., GRAY, L., BUCKEL, S. D., BELL, A. W. & HERMODSON, M. A. 1986. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**:448-450.
- HIGGINS, C. F. & GOTTESMAN. M. M. 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* **17**:18-21.
- HIGGINS, C.F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.* **152**:205-210.

- HYDE, S. C., EMSLEY, P., HASTHORN, M. J., MIMMACK, M. M., GILEADI, U., PEARCE, S. R., GALLAGHER, M. P., GILL, D. R., HUBBARD, R. E. & HIGGINS, C. F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**:362-365.
- IKEGAWA, T., USHIGOME, F., KOYABU, N., MORIMOTO, S., SHOYAMA, Y., NAITO, M., TSURUO, T., OHTANI, H. & SAWADA, Y. 2000. Inhibition of P-glycoprotein by orange juice components, polymethoxyfavones in adriamycin-resistant human myelogenous leukemia (K562/ADM) cells. *Cancer Lett.* **160**:21-28.
- KURODA, M., HASHIDA-OKATO, T., YASUMOTO R., GOMI, K., KATO, I. & TAKESAMOTO, K. 1999. An aurobasidin A resistance gene isolated from *Aspergillus* is a homolog of yeast AUR1, a gene responsible for inositol phosphoceramide (IPC) synthase activity. *Mol. Gen. Genet.* **261**:290-296.
- JIN-MING, K., NGOH-KHANG, G., LIAN-SAI, C. & TET-FATT, C. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**:7-21.
- KOLACZKOWSKA, A. & GOFFEAU, A. 1999. Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updates* **2**:403-414.
- KOLACZKOWSKI, M., KOLACZKOWSKA, A., LUCZYNSKI, J. WITEK, S., & GOFFEAU, A. 1998. *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **4**:143-158.

- KOLACZKOWSKI, M., MICHALAK, K. & MOTOHASHI, N. 2003. Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:279-283.
- KOLACZKOWSKI, M., VAN DER REST, M., CYBULARZ-KOLACZKOWSKA, A., SOUMILLION, J. P., KONINGS, W. N. & GOFFEAU, A. 1996. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J. Biol. Chem.* **271**:31543-31548.
- KUCHLER, K., STERNE, R. E. & THORNER, J. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**:3973-3984.
- KUNTZ, S., WENZEL, U. & DANIEL, H. 1999. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.* **38**:133-142.
- LAGE, H. 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:188-99.
- LEPPERT, G., MCDEVITT, R., FALCO, S.C., VAN DYK, T., FICKE, M. & GOLIN, J. 1990. Cloning by gene amplification of two *loci* conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* **125**:13-20.
- MAESAKI, S., MARICHAL, P., HOSSAIN, M.A., SANGLARD, D., VANDEN BOSSCHE, H. & KOHNO, S. 1998. Synergic effects of tactolimus and azole antifungal agents against azole-resistant *Candida albicans* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:747-53.

- MAHÉ, Y., LEMOINE, Y. & KUCHLER, K. 1996. The ATP binding cassette transporter Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **271**:25167-25172.
- MAMNUN, Y., SCHÜLLER, C. & KUCHLER, K. 2004. Expression regulation of the yeast PDR5 ATP-binding cassette (ABC) transporter suggests a role in cellular detoxification during the exponential growth phase. *FEBS Lett.* **559**:111-117.
- MARCHETTI, O., ENTENZA, J.M., SANGLARD, D., BILLE, J., GLAUSER, M.P. & MOREILLON, P. 2000. Fluconazole plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2932-2938.
- MARSTON A., POTTERAT O. & HOSTETTMANN K. 1988. Isolation of biologically active plant constituents by liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **45**:3-11.
- MIMMACK, M. L., GALLAGHER, M. P., HYDE, S. C., PEARCE, S. R., BOOTH, I. R. & HIGGINS, C. F. 1989. Energy-coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport. *Proc. Natl. Acad. USA* **86**:8257-8261.
- NIIMI, K., HARDING, D. R. K., PARSHOT, R., KING, A., LUN, D. J., DECOTTIGNIES, A., NIIMI, M., LIN, S., CANNON, R. D., GOFFEAU, A. & MONK, B. C. 2004. Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1256-1271.

- PUTMAN, M., VAN VEEN, H. W. & KONINGS, W. N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:672-693.
- RAVIV, Y., POLLARD, H. B., BRUGGEMANN, E. P., PASTAN, I. & GOTTESMANN, M. M. 1990. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* **265**:3975-3980.
- RONINSON, I. B., CHIN, J. E., CHOI, K. G., *et al.* (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistance KB carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:4538-4542.
- SANGLARD, D., ISCHER, F., CALABRESE, D., MAJCHERCZYK, P. A. & BILLE, J., 1999. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2753-65.
- SAUNA, Z. E., SMITH, M. M., MULLER, M., KERR, K. M. & AMBUDKAR, S. V. 2001. The mechanism of action of multidrug-resistance-linked P-glycoprotein. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**:481-491.
- SENIOR, A. E., AL-SHAWI, K. M. & URBATSCH, I. L. 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **377**:285-289.
- STERMITZ, F.R., LORENZ, P., TAWARA, J.N., ZENEWICZ, L.A. & LEWIS, K. 2000. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-

methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:1433-1437.

TAGLICH, D. & MICHAELIS, S. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. Methods Enzymol. **292**:130-162.

TEGOS, G., STERMITZ, F.R., LOMOVSKAYA, O. & LEWIS, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemother. **46**:3133-3141.

VARMA, M. V. S., ASHOKRAJ, Y., DEY, C. S. & PANCHAGNULA, R. 2003. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. Pharmacol. Res. **48**:347-359.

WADA, S., NIIMI, M., NIIMI, K., HOLMES, A. R., MONK, B. C., CANNON, R. D. & UEHARA, Y. 2002. *Candida glabrata* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Pdh1p expressed in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deficient in membrane transporters show phosphorylation-dependent pumping properties. J. Biol. Chem. **277**:46809-46821.

WALKER, J. E., SARASTE, M., RANSWICK, M. J. & GAY, N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. **1**:945-951.

WOLFGER, H., MAMNUN, Y. M. & KUCHLER, K. 2001. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. Res. Microbiol. **152**:375-89.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)