



Universidade do Algarve / Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa / Faculdade de Ciências Médicas,
Departamento de Genética

Tese de Dissertação de Mestrado

*Sistemas bacterianos com expressão do complexo
enzimático de citocromos P450 humanos:
Aplicação para estudos de NADPH oxidoreductase
dos citocromos P450*

Carmen Luísa Silva Lourenço

Mestrado em Ciências Biomédicas

Dezembro 2009



Universidade do Algarve / Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa / Faculdade de Ciências Médicas,
Departamento de Genética

Tese de Dissertação de Mestrado

Sistemas bacterianos com expressão do complexo enzimático de citocromos P450 humanos: Aplicação para estudos de NADPH oxidoreductase dos citocromos P450

Carmen Luísa Silva Lourenço

Mestrado em Ciências Biomédicas

Dissertação orientada por Professor Doutor Michel Kranendonk

Dezembro 2009

“O conhecimento dirige a prática; no entanto, a prática aumenta o conhecimento.”

Thomas Fuller

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais e irmã, pelo exemplo de força, amor, bondade, confiança, apoio e incentivo que sempre me deram, sem eles eu não era o que sou hoje;

Aos meus orientadores Dr^o Michel Kranendonk, Prof. Dr^a Vera Marques e Prof. Dr^o José Ruef, pela orientação e ensinamentos transmitidos durante o meu estágio.

Aos professores do Mestrado em Ciências Biomédicas, que de alguma forma contribuíram para a minha formação científica.

A todas as pessoas do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas em especial ao pessoal do laboratório de Mutagénese pela colaboração e amizade.

A todos os meus amigos pelo apoio incondicional.

Muito obrigada

ABSTRACT

The NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (CYPOR) encoded by the *POR* gene is a flavoprotein located in the endoplasmic reticulum, whose main function is to transfer electrons to all microsomal cytochrome P450 and various oxygenases enzymes.

Mutations in *POR* gene have been associated with an autosomal recessive disorder, the Antley Bixler Syndrome (ABS), including the CYPOR variant Q153R. However conflicting results have been reported regarding the effect of this mutation on CYPOR activity. At first of this project aimed to assess the effect of the Q153R mutation on CYPOR's electron transfer capacity and to sustain the biotransformation of xenobiotics mediated by human CYP1A2. The second part concerns the development of an effective methodology which permits the dosing of CYPOR in intact bacteria.

The work was initiated with the development of BTC1A2-POR strains expressing the heterologously the recombinant human proteins CYP1A2 and CYPOR, resulting in three strains namely BTC1A2-POR^{null}, BTC1A2-POR^{wt} and BTC1A2-POR^{Q153R}.

The effect of the CYPOR Q153R variant in supporting CYP1A2 bioactivation activity was evaluated with the procarcinogens 2-aminoanthracene (2AA), 2-amino-3-methylimidazole (4, 5-f) quinoline (IQ) and 4 - (methylnitrosamino) -1 - (3-pyridyl)-1-butanone (NNK). We also carried out kinetic assays with ethoxyresorufin (EROD), methoxyresorufin (MROD) and 3-cyano-7-ethoxycoumarin (CEC). Q153R variant did not show weakened activity in any of these tests.

In the second phase of work to dose CYPOR in whole cells we needed to differentiate the activities of *E.coli* k12 reductases from human CYPOR activity. Thus reducing reactions with several substrates and assay conditions were primarily optimized in membranes and subsequently in intact bacteria. The results were not conclusive but may lead to new approaches to the development of a methodology for the determination of CYPOR activity in intact bacteria.

Keywords: Antley-Bixler syndrome, cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, polymorphisms, enzyme kinetics, drug metabolism.

RESUMO

A NADPH oxidoreductase dos citocromos P450 (CYPOR) codificada pelo gene *POR* é uma flavoproteína, localizada no retículo endoplasmático, cuja principal função é a transferência de electrões para todos os citocromos P450 microsossomais e várias enzimas oxigenases.

Mutações no gene *POR* têm sido relacionadas com uma doença genética autossómica recessiva, a Síndrome de Antley Bixler (ABS), entre os quais o mutante CYPOR Q153R. Contudo existem resultados contraditórios no que concerne ao efeito desta mutação na actividade de CYPOR.

Numa primeira fase deste projecto pretendeu-se avaliar o efeito da mutação Q153R de CYPOR na biotransformação de xenobióticos mediada pelo CYP1A2. Numa segunda fase do trabalho, pretendeu-se desenvolver uma metodologia eficaz que permitisse dosear CYPOR em bactérias intactas.

O trabalho foi iniciado com o desenvolvimento das estirpes BTC1A2-POR expressando heterologamente as proteínas recombinantes humanas CYP1A2 e CYPOR, tendo sido construídas três estirpes: BTC1A2-POR^{null}, BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R}. O efeito do mutante Q153R de CYPOR, na sustentação da actividade do CYP1A2 foi avaliado através de ensaios de mutagenicidade com 2-aminoantraceno (2AA), 2-amino-3-metilimidazol (4,5-*f*)quinolina (IQ) e 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). Foram também efectuados ensaios de cinética com etoxiresorufina (EROD), metoxiresorufina (MROD) e 3-ciano-7-etoxicumarina (CEC). O mutante Q153R demonstrou actividade igual à proteína selvagem em todos os ensaios efectuados.

Na segunda fase do trabalho, para dosear CYPOR em células inteiras foi necessário diferenciar a actividade de CYPOR da actividade das reductases de *E.coli* K12. Para tal realizaram-se ensaios de redução com vários substratos e tentou-se otimizar as condições de ensaio, primeiramente em membranas e posteriormente em bactérias intactas. Os resultados obtidos não foram conclusivos mas podem conduzir a novas abordagens para o desenvolvimento de uma metodologia que permita o doseamento de CYPOR em bactérias intactas.

Palavras-chave: síndrome de Antley Bixler, citocromos P450, NADPH oxidoreductase dos citocromos P450, polimorfismos, metabolismo de xenobióticos.

ABREVIATURAS E SIMBOLOGIA

2 AA: 2 – aminoantraceno, (2 – *aminoanthracene*)

ABS: síndrome de Antley Bixler

AMP: ampicilina

CEC – 3-ciano -7-etóxicumarina

Cm: cloranficol

cit.c: citocromo *c*

CYP: citocromo P450

CYPOR: NADPH oxidoreductase dos citocromos P450

CTC: 5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio, (*5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride*)

DMSO: dimetilsufóxido

DPI: cloreto de difenileneiodium (*diphenyleneiodium chloride*)

EDTA: ácido (etilenodiamino) tetracético

EROD – etoxiresorufina

FAD: flavina adenina dinucleótico

FMN: monoflavina nucleótido

G-6-P: glucose – 6 – fosfato

G-6-PD: glucose – 6 – fosfato – desidrogenase

IPTG: isopropil β -D-tiogalactósido

IQ: 2-amino-3-metilimidazol [4,5-*f*]quinolina], (*2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline*)

Kan: canamicina

LB: meio de (*luria – bertani*)

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio, [*3 – (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide*]

MROD - metoxiresorufina

NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NNK: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, [4-(*methylnitrosamino*)- 1-(3-*pyridyl*)-1-*butanone*]

PBS: tampão de fosfato salino

PSA: persulfato de amônio

Rpm: rotações por minuto

SNP: polimorfismo de base única, (*Single Nucleotide Polymorphism*)

TAE: tampão tris – ácido acético – EDTA

TB: meio de (*terrific broth*)

TE: tampão tris.HCl-EDTA

TEMED: N, N, N', N' - tetrametilenodiamina

TGE: tampão tris – glicerol – EDTA

TN: tampão Tris.HCl-NaCl

TOP – agár: gelose de superfície

Tp: tampão

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

Tween 20: poli-oxietileno sorbitan monolaurato

XTT: 3'-1- [(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazólio-bis(4-metóxi-6-nitro) ácido benzenosulfônico hidratado, (3'-1- [(*phenylamino*)-*carbonyl*]-3,4-*tetrazolium*-bis(4-*methoxy*-6-*nitro*) *benzenesulfonic acid hydrate*)

ÍNDICE

I – INTRODUÇÃO	1
1.1. Metabolismo de xenobióticos	1
1.1.2. Sistemas de biotransformação	2
1.2. Os citocromos P450	3
1.3. NADPH oxidoreductase dos citocromos P450	7
1.3.1. Polimorfismos genéticos do gene <i>POR</i>	8
1.3.2. Síndrome de Antley Bixler	11
1.4. Expressão heteróloga do sistema enzimático de citocromos P450 humanos em bactérias	13
1.4.1. Sistema bacteriano competente em citocromos P450 humanos Utilizado no estudo.....	15
1.4.2. Actividade e doseamento de NADPH oxidoreductase dos citocromos P450	16
II – Objectivo	18
III - Materiais e métodos	19
3.1. Materiais	19
3.2. Métodos	20
3.2.1. Crescimento das estirpes bacterianas	20
3.2.2. Construção das estirpes BTC1A2-POR	20
3.2.3. Extração e análise de DNA plasmídico	22
3.2.4. Ensaio de mutagenicidade	22
3.2.5. Isolamento da fracção membranar	23
3.2.6. Determinação da proteína existente na fracção membranar	24
3.2.7. Doseamento da expressão de citocromos P450	24
3.2.8. Doseamento da NADPH oxidoreductase de citocromos P450	25
3.2.9. Avaliação da actividade catalítica dos citocromos P450	26
3.2.10. Imunodeteção da NADPH oxidoreductase dos citocromos P450 humano nas diferentes estirpes bacterianas	28
IV – Resultados e discussão	30
4.1. Efeito da mutação Q153R de CYPOR, relacionada com a Síndrome de Antley Bixler, na biotransformação de xenobióticos mediada pelo CYP1A2	30

4.1.1. Desenvolvimento de estirpes BTC1A2-POR com expressão Heteróloga das proteínas humanas recombinantes CYP1A2 e CYPOR	30
4.1.2. Avaliação do efeito do mutante Q153R de CYPOR na actividade de CYPOR	34
4.1.3. Caracterização dos parâmetros cinéticos da estirpes BTC1A2-POR.....	38
4.2. Optimização das condições de ensaio para determinação da actividade de CYPOR em células inteiras	39
4.2.1 Avaliação do efeito de detergente na actividade específica de CYPOR ..	39
4.2.2. Avaliação de sais de tetrazólio como possíveis substratos para a determinação da actividade específica de CYPOR em células inteiras	44
4.2.3. Contribuição no desenvolvimento de uma metodologia para o doseamento de CYPOR em bactérias intactas	48
V – Conclusões	60
VI – Bibliografia	62
VII – Anexos	68

I. Introdução

O homem está continuamente exposto a substâncias químicas estranhas ao seu organismo através da sua vida profissional, alimentação, terapêutica farmacológica ou outros compostos no meio envolvente, designados de xenobióticos [1].

Muitos destes xenobióticos podem ser tóxicos, para eliminar e minimizar os potenciais danos nocivos que estes compostos acarretam para o organismo, o corpo humano possui um eficiente sistema de destoxificação, desenvolvido ao longo dos tempos (figura 1). Este é um sistema enzimático complexo com uma grande variabilidade interindividual, que depende de factores como o meio ambiente, o estilo de vida e a predisposição genética [1, 2].

1.1 . Metabolismo de xenobióticos

Em exposição, os xenobióticos são absorvidos através da pele, dos pulmões e do tracto gastrointestinal (GI), atingindo assim a corrente sanguínea e ficando disponíveis para serem distribuídos ao longo do corpo [1].

Sendo os xenobióticos compostos maioritariamente lipofílicos para a evitar a sua bioacumulação, estes necessitam de sofrer biotransformação, de forma a se tornarem mais lipossolúveis e assim serem mais facilmente excretados através da urina, fezes e ainda através da respiração e suor [3].

O fígado é o órgão por excelência para fazer biotransformação, pois possui uma grande quantidade de enzimas de biotransformação. Por outro lado o fígado está numa posição central para remover agentes tóxicos do sangue, após absorção do tracto gastrointestinal, porque o sangue que vem da veia porta passa através do fígado antes de atingir a circulação sistémica. Desta forma o fígado pode extrair compostos do sangue e prevenir a sua distribuição a outras partes do corpo. Os xenobióticos e/ou metabolitos que entram no intestino com a bÍlis podem ser excretados com as fezes ou ainda serem reabsorvidos [4-7].

Assim, a biotransformação resulta, normalmente, num aumento da velocidade de excreção reduzindo a acumulação destas substâncias nocivas no organismo [3, 7].

1.1.2. Sistemas de biotransformação

Ao entrar no organismo, os xenobióticos sofrem alterações sendo os produtos do seu metabolismo menos tóxicos que o composto inicial. Contudo alguns desses metabolitos são mais reactivos e tóxicos, ou seja, ocorre uma bioactivação do composto químico inicial. A acumulação destes metabolitos mais tóxicos promove danos nos componentes celulares, nomeadamente DNA e RNA, pelo que tem sido descrita uma associação entre a bioactivação e várias patologias genéticas como o cancro [8, 9].

A biotransformação é normalmente dividida em três fases: Fase I, Fase II e Fase III [10-12].

Na fase I de biotransformação, os xenobióticos são sujeitos a reacções de oxidação, redução ou hidrólise, cujo objectivo é a inserção de grupos funcionais (como por exemplo – OH, -NH₂, -SH ou COOH), o que resulta num ligeiro aumento da hidrofiliabilidade dos compostos [10].

As reacções de biotransformação de fase II conduzem, normalmente, a um aumento da hidrofiliabilidade do xenobiótico e promovem a sua excreção. Nesta fase, os xenobióticos são conjugados com ácido glucorónico, sulfato, aminoácidos, glutathione entre outros. Nesta fase de biotransformação ocorrem ,ainda, reacções de metilação e acetilação [3, 10].

A biotransformação de fase III é catalizada por enzimas que também participam nas reacções de fase I e II, diferindo destas pelo facto dos seus substratos serem produtos metabólicos das reacções de fase I e II. Esta fase de biotransformação, é maioritariamente responsável pela excreção dos compostos para fora da célula [1].

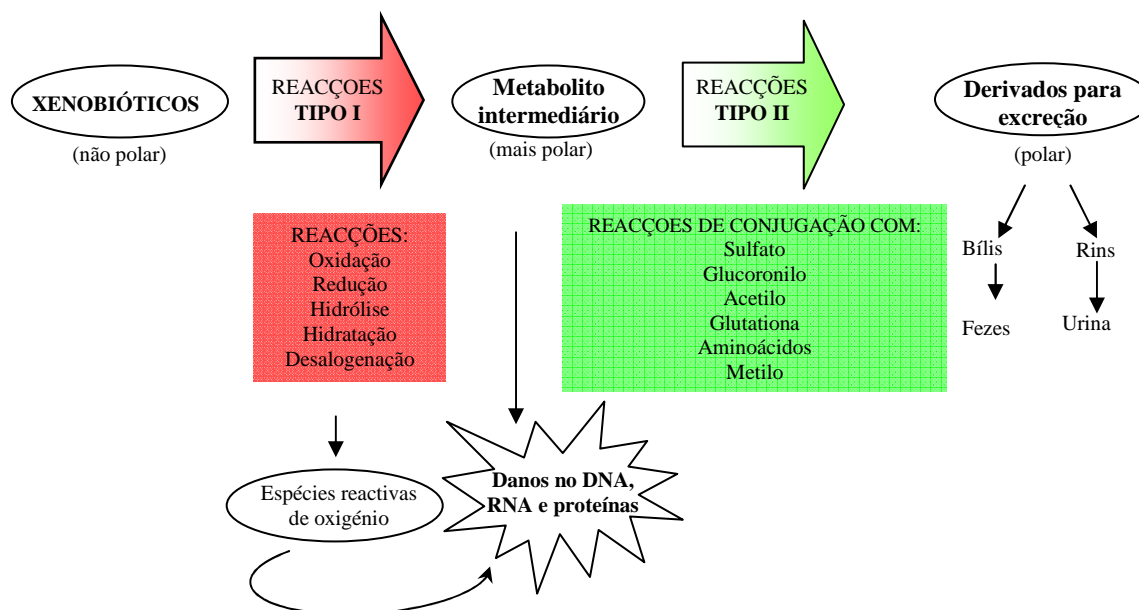


Figura 1 – Esquema representativo das várias fases envolvidas no processo de detoxificação (adaptado de Liska 2006 [1]).

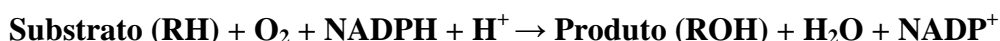
1.2. Os citocromos P450

Um dos sistemas enzimáticos mais importantes de fase I é constituído pelos citocromos P450 (P450 ou CYP) e o seu parceiro redox, NADPH oxidoreductase dos citocromo P450 (CPR ou CYPOR).

Na 2ª metade do século passado, já era conhecida a capacidade de alguns tecidos de mamífero para oxidar compostos exógenos hidrófobos, embora não se conhecessem as enzimas responsáveis por esta reacção. Em 1955, Williams e Klingenberg identificaram em microsomas de fígado de rato um pigmento com características espectrofotométricas específicas [13]. Omura e Sato caracterizaram este pigmento, como uma hemoproteína que apresentava no seu espectro diferencial um pico de Soret a 450 nm quando complexado com monóxido de carbono, e designaram-no citocromo P450 (CYP) [14]. Estudos levados a cabo por Cooper e colaboradores (1965) demonstraram a função enzimática dos CYPs e a sua importância no metabolismo de xenobióticos [15].

Os CYPs constituem uma superfamília de proteínas heme-tiolato responsáveis pela metabolização de um grande número de substratos endógenos (endobióticos):

esteróides, ácidos biliares, ácidos gordos, prostaglandinas, leucotrienos, retinóides e outros) e exógenos (xenobióticos: químicos ambientais e produtos naturais de plantas e outros) [16]. A maior parte do metabolismo mediado pelos CYPs é baseado numa reacção de oxidação-redução, sendo a reacção básica catalisada por estas enzimas a monooxigenação, em que um átomo de oxigénio (derivado do O_2) é incorporado no substrato, e o outro átomo é reduzido a água com os equivalentes redutores do NADPH [10, 17]. Esta reacção pode ser representada pela seguinte equação:



Face ao substrato podem ocorrer vários tipos de reacções, entre as quais as mais comuns são a hidroxilação de N, grupos alifáticos e aromáticos, mas também a desalogenação oxidativa ou redutora, a sulfoxidação, N- e S-oxidação, a desaminação oxidativa, a S-, N- e O-desalquilação e a redução de peróxidos e epóxidos [18-20]. O ciclo catalítico dos CYPs (figura 2) é iniciado pela ligação do substrato a um local específico próximo do grupo heme. O átomo de ferro é então reduzido para a forma ferrosa (Fe^{2+}) por intermédio de um electrão transferido do NADPH através da NADPH oxidoreductase de citocromos P450 (CYPOR). O oxigénio molecular liga-se então ao complexo CYP-substrato, seguindo-se depois a transferência de um segundo electrão do NADPH através da CYPOR para o complexo. O complexo rearranja com a inserção de um átomo de oxigénio no substrato para dar um produto e água ou peróxido de hidrogénio. Por último o produto é libertado, retornando a enzima ao seu estado origina [18, 21-23].

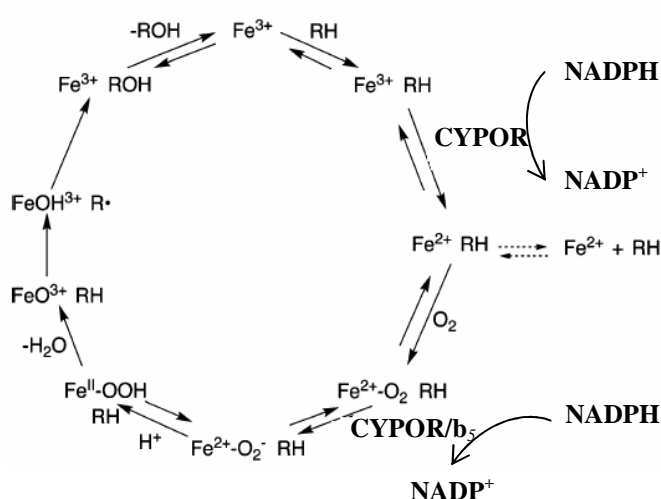


Figura 2 – Ciclo catalítico dos citocromos P450. (CYPOR: NADPH oxidoreductase dos citocromos P450; RH: substrato; ROH: produto hidroxilado. Adaptado de Guengerich et al 2008[24]).

Esta superfamília de enzimas, CYPs, pode ser encontrada desde as bactérias até ao Homem, sendo até este momento conhecidas, pelo menos, 2400 formas de enzimas CYP que se encontram distribuídas por cerca de 781 famílias, incluindo animais (110 famílias), plantas (95 famílias), fungos (310 famílias), protistas (61 famílias) e bactérias (205 famílias); (<http://drnelson.utmem.edu/p450stats.Feb2008.htm>), acessido em Agosto 2009)[25]. A grande variedade de isoformas destas proteínas tornou necessário o desenvolvimento de uma nomenclatura universal para a superfamília CYP, tendo por base a comparação das sequências de aminoácidos e as relações evolutivas dos genes correspondentes, baseada numa evolução divergente desta superfamília. Assim para designar um gene citocromo P450 é primeiramente incluída a sigla “CYP” que advém de *cytochrome P450*. Em seguida, as enzimas CYP dentro da mesma família são designadas por um número e partilham entre si mais de 40% de identidade na sequência de aminoácidos. As famílias são depois divididas em subfamílias, sendo as enzimas dentro da mesma subfamília designadas pela mesma letra. Genes dentro da mesma subfamília partilham mais de 55% de identidade na sua sequência de aminoácidos. Finalmente, um número após a letra denota cada isoenzima individual, diferindo cerca de 3% [16, 26].

A sequenciação do genoma humano permitiu identificar, até à data, 57 genes e 58 pseudogenes de CYPs [17, 24]. Com um peso molecular de cerca de 57 KDa, cada uma contendo aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos, os CYPs em células de mamífero encontram-se predominantemente no retículo endoplasmático podendo, também, ser encontrados na membrana mitocondrial. As enzimas CYP são expressas maioritariamente no tecido hepático e ainda em alguns tecidos extrahepáticos de que são exemplos o rim, o intestino, o pulmão, as gónadas, a glândula pituitária, a próstata, o cérebro, a pele, os leucócitos, o baço e o sistema cardiovascular [7]. As várias enzimas CYP humanas apresentam ainda diferentes mecanismos de regulação da expressão e uma baixa especificidade em substrato, podendo uma única enzima CYP metabolizar diferentes classes de substratos e um único substrato pode ser metabolizado por diferentes CYPs [11, 12]. Assim, os CYPs são muitas vezes agrupados de acordo com o tipo de substrato que metabolizam (tabela I).

Tabela I – Classificação de CYPs de acordo com o tipo de substrato que metabolizam (adaptado de Guengerich et al, 2008) [24].

Esteróis	Xenobióticos	Ácidos Gordos	Eicosanóides	Vitaminas	?
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	4A11	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4B1	4F8	26A1	2U1
8B1	2A13	4F12	5A1	26B1	2W1
11A1	2B6		8A1	26C1	3A43
11B1	2C8			27B1	4A22
11B2	2C9				4F11
17A1	2C18				4F22
19A1	2C19				4V2
21A2	2D6				4X1
27A1	2E1				4Z1
39A1	2F1				20A1
46A1	3A4				27C1
51A1	3A5				
	3A7				

A grande maioria dos fármacos comercializados é metabolizado pelos CYPs em especial os das famílias 1, 2 e 3, pelo que o contributo individual de cada uma destas enzimas pode estar directamente relacionado com a sua distribuição em microsomas de fígado humano [27] (figura 3).

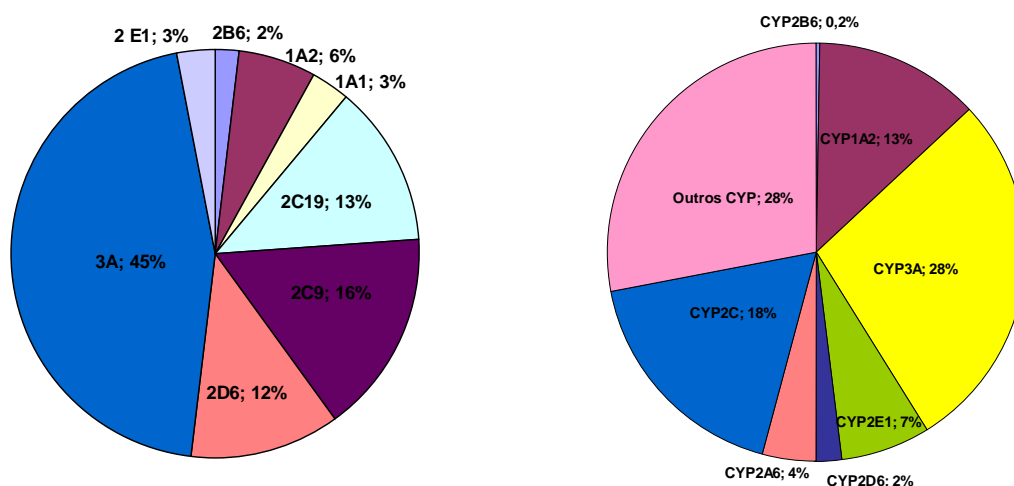


Figura 3 – Distribuição de várias subfamílias de citocromos P450 em função da metabolização dos 200 fármacos mais comercializados nos Estados Unidos da América (à esquerda) [28, 29] e presença em microsomas de fígado humano (à direita) (adaptado de Shimada et al. 1994, Williams et al 2004 [29, 30]).

1.3. NADPH oxidoreductase dos citocromo P450

A NADPH oxidoreductase dos citocromo P450 (CYPOR) está localizada no retículo endoplasmático e foi primeiramente identificada por Horecker em 1950, como sendo uma reductase específica de citocromo *c* (cit.*c*) [31]. Estudos posteriores vieram demonstrar que esta flavoproteína não é fisiologicamente responsável pela redução de cit.*c*, mas sustenta a actividade de outras enzimas também (figura 4) [32, 33].

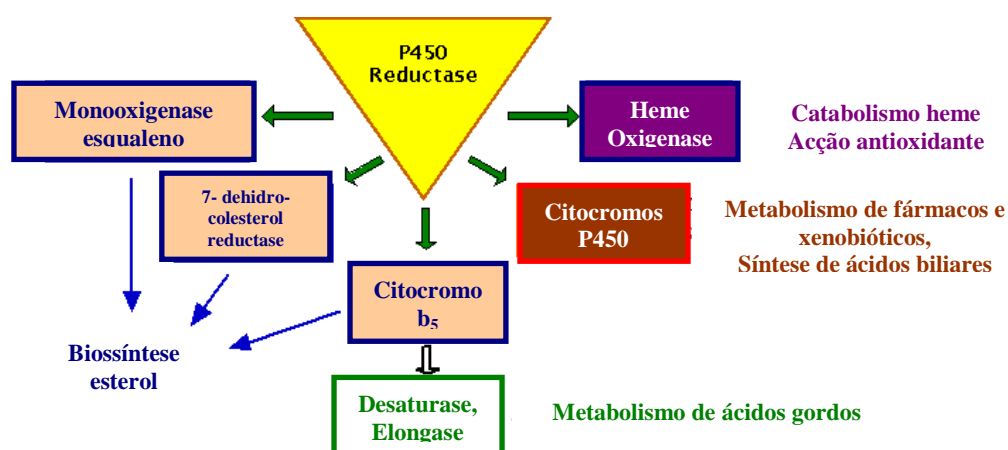


Figura 4 – Envolvimento de CYPOR em vários processos fisiológicos (Adaptado de Hart et al 2008 [33]).

CYPOR contém duas flavinas, uma molécula de flavina adenina dinucleótido (FAD) e uma molécula de monoflavina nucleótido (FMN) e tem como principal função a transferência de electrões da molécula de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) para todos os CYPs microsossomais como também para outras enzimas heme oxigenases, elongase de ácidos gordos, epoxidase de esqualeno e citocromo b_5 (figura 5) [32, 34]. Esta interacção com várias oxigenases conduz ao envolvimento de CYPOR no metabolismo de xenobióticos, esteroidogénese (CYP17A1 e CYP21A2) e metabolismo de prostaglandinas e ácidos gordos [35].

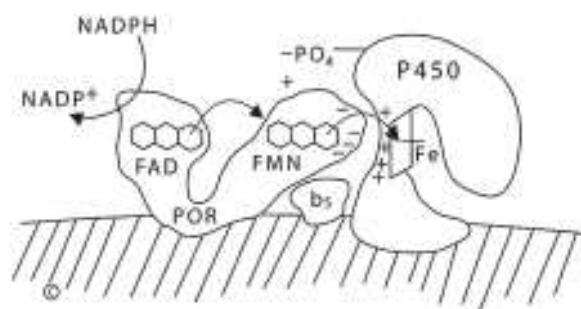


Figura 5 – Representação esquemática de CYPOR e sua função como dador de electrões para CYPs (adaptado de Agrawal, 2008 [34]).

CYPOR uma proteína de cerca de 76 KDa, é codificada pelo gene *POR* em humano que se encontra no cromossoma 7 na posição q11.23 e é constituído por 16 exões. CYPOR é constituída por 680 aminoácidos, sendo que os primeiros cerca de 25 aminoácidos da parte N-terminal da proteína determinam a sua localização e ancoragem à membrana do retículo endoplasmático [32, 34].

1.3.1. Polimorfismos genéticos do gene *POR*

São muitos os factores que influenciam a resposta a xenobióticos entre os quais: factores ambientais (dieta e tóxicos ambientais), factores fisiológicos (idade e sexo), factores patológicos (por exemplo doenças de rim, fígado e doenças cardiovasculares, entre outras) e factores genéticos (etnia, polimorfismos genéticos) [33]. Os factores genéticos de genes cujos produtos estão envolvidos na toxicodinâmica e na toxicocinética do metabolismo de xenobióticos são os de maior relevância, representando mais de 50% da variação na resposta interindividual a fármacos [33].

Como já anteriormente referido, CYPs são dos sistemas enzimáticos mais importantes envolvidos na metabolização de xenobióticos. Contudo ainda permanece por esclarecer a contribuição genética de algumas isoformas da superfamília de enzimas CYP, face à sua baixa frequência alélica, para a variação da resposta inter-individual no metabolismo de xenobióticos, indicando que os CYPs não são necessariamente a única fonte de factores genéticos [33]. Por exemplo, aspectos toxicogenéticos de receptores nucleares, transportadores de membrana e o parceiro redox de CYP, CYPOR, têm sido estudados no que respeita à sua contribuição para a variação do metabolismo de xenobióticos mediado por CYPs [33, 36].

A deleção total do gene *POR* em ratos leva à morte embrionária em virtude de múltiplos defeitos no desenvolvimento como tubo neural, anomalias cardíacas, olhos e membros, retardamento geral do crescimento e defeitos vasculares [33]. Provavelmente devido à falta de actividade dos CYPs envolvidos no processo de endobióticos, por não haver sustentação da actividade dos mesmos em virtude da falta de transporte de electrões por parte de CYPOR. [32, 35]. Contudo, ratos *knock-out* hepático para *POR* originam ratos aparentemente normais mas com acumulação de líquidos hepáticos e que apresentam uma diminuída capacidade no metabolismo de fármacos a nível hepático [35, 37].

O gene *POR* humano é polimórfico estando descritos até à data mais de 40 polimorfismos de base única no gene *POR* (<http://www.cypalleles.ki.se/por.htm>), incluindo erros de *splicing*, deleções, mutações não silenciosas e mutações frameshift (figura 6) [38, 39].

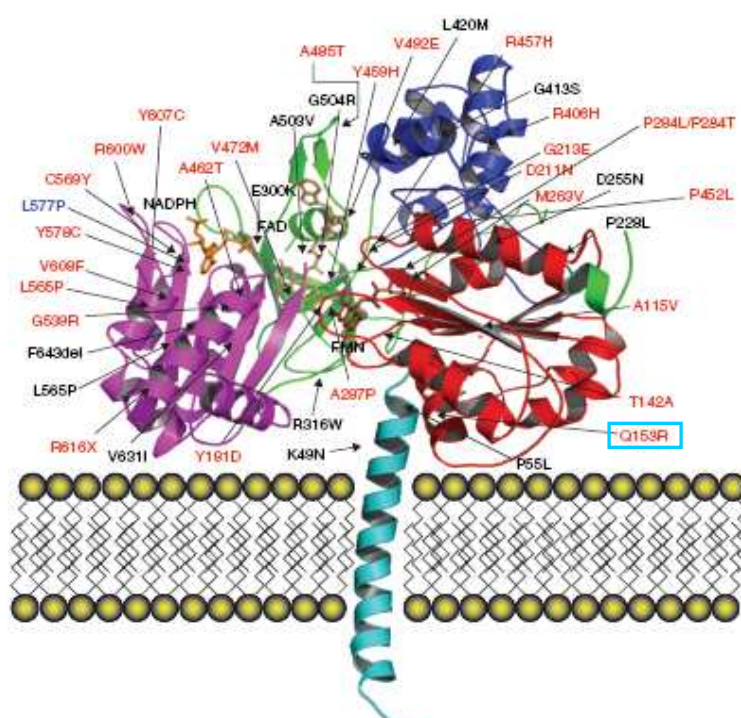


Figura 6 – Esquema representativo da proteína NADPH oxidoreductase dos citocromos P450, sua localização membranar e posições relativas de mutações polimórficas na proteína CYPOR, evidenciando a posição de Q153R (veja em baixo) (adaptado de Hart et al, 2008 [33]).

A diminuição da actividade de CYPOR foi indicada conduzir a uma insuficiência de enzimas dependentes de CYPOR como por exemplo CYP17A1 (17- α -hidroxilase e 17, 20-liase), CYP21A1 (21-hidroxilase) e CYP51A1 (lanosterol-14- α -

demetilase) (tabela II) [35, 40]. Foi descrito que mutações localizadas nos domínios NADPH, FAD e FMN têm a influência mais severa no fluxo de electrões de CYPOR, e portanto na sua função de sustentar oxidações mediadas pelos CYPs [32, 35, 41, 42] .

Tabela II – Comparação das actividades de mutantes CYPOR em vários ensaios (adaptado de Miller et al, 2009 [43]).

Compilação de dados de Huang et al 2005 [40] e Agrawal et al 2008 [34]. Os valores representam V_{\max}/K_m como percentagem relativamente a CYPOR *selvagem*. A: “Fonte “ designa a fonte da sequência de mutação: N: indivíduos normais; P: pacientes com ABS; D: bases de dados; (-): não detectável.

	fonte	1A2	2C19	17OH-ase	17,20 liase	Redução cit.c	Oxidação NADPH
POR wt	N	100	100	100	100	100	100
delE53	N	156	91	73	82	57	93
P55L	N	114	83	82	115	67	123
A115V	P	-	-	80	71	63	41
T142A	P	3	-	60	54	49	52
Q153R	P	144	284	31	27	9	11
Y181D	P	-	-	-	-	-	-
D211N	N	52	52	57	62	27	59
G213E	N	174	101	57	93	111	105
P228L	D	20	39	100	41	75	72
M263V	P	92	136	9	13	76	57
P284L	N	41	27	44	82	104	153
P284T	N	-	-	14	19	16	32
A287P	P	-	-	40	21	9	16
E300K	D	84	81	112	146	93	104
R316W	D	109	100	94	141	61	77
R406H	N	125	155	61	57	62	78
G413S	D	73	104	83	110	76	100
P452L	N	21	83	48	61	16	12
R457H	P	-	-	3	-	1	-
Y459H	P	-	-	11	-	-	-
A462T	N	119	100	58	66	85	69
V472M	N	54	77	58	46	23	24
A485T	N	80	98	68	88	36	51
V492E	P	-	-	3	-	-	-
A503V	D,N	85	113	68	58	67	56
G504R	D	82	140	91	103	53	47
G539R	P	10	33	46	8	9	-
L565P	P	-	-	32	19	14	1
C569Y	P	6	-	28	13	6	2
R600W	N	36	60	38	32	18	7
Y607C	N	7	24	76	40	-	20
V608F	P	5	-	80	57	8	3
R616X	P	-	-	6	-	-	-
V631I	P	6	23	51	40	74	23
delF646	P	-	-	97	46	36	94

1.3.2. Síndrome de Antley Bixler

A deficiência de CYPOR é uma doença genética autossômica recessiva. A manifestação clínica é esteroidogênese alterada e assemelha-se a deficiências combinadas das actividades 17 α -hidroxilase, 17, 20 – liase e 21 hidroxilase. Mutações do gene *POR* foram recentemente associadas com uma doença genética autossômica recessiva, Síndrome de Antley Bixler (ABS) [32].

O Síndrome de Antley-Bixler (ABS: OMIM #207410), primeiramente descrito em 1975, é um distúrbio congénito raro caracterizado por inúmeras malformações esqueléticas que incluem craniosinostose, hipoplasia facial severa, sinostose radioumeral, fracturas do fémur, orelhas displásicas, “trapezoidocefalia” e ambiguidade genital, resultantes de uma esteroidogênese deficiente [38]. Os critérios para o diagnóstico de ABS não estão totalmente esclarecidos, contudo são requisitos mínimos a craniosinostose e sinostose radioumeral [38, 44-46].

A relação genética de ABS foi inicialmente controversa: relatos de crianças afectadas e consanguinidade parental sugeriam uma manifestação autossômica recessiva, contudo tem também sido observado em pacientes com ABS uma autossomia dominante de mutações no gene do receptor do factor de crescimento de fibroblasto 2 (*FGFR2*) [38, 47]. Os factores de crescimento de fibroblastos estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento ósseo e podem ligar-se a quatro diferentes receptores de superfície celular de tirosina cinases. Ganho cumulativo de mutações funcionais nos genes *FGFRs* causam uma diversidade de síndromas craniosinostóticos fenotipicamente diversos, incluindo os síndromas Pfeiffer, Apert, Jackson-Weiss e Crouzon [38, 47].

Contrariamente a outros síndromas craniosinostóticos, os pacientes com ABS apresentam uma incidência de anomalias genitais de cerca de 31 a 64%, incluindo hipoplasia dos lábios maiores, hipoplasia da genitália masculina e criptorcidismo [38]. Em 2005, Huang e colaboradores determinaram que mutações nos genes *POR* e *FGFR2* segregam completamente, concluindo que mutações no gene *FGFR2* estavam presentes em pacientes com ABS com esteroidogênese normal enquanto que pacientes com fenótipo ABS e esteroidogênese alterada com ambiguidade genital apresentam mutações no gene *POR* [38, 40].

Um fenótipo ósseo similar com ABS com anomalias genitais foi descrito numa criança que durante o seu desenvolvimento *in utero* foi exposta a fluconazole [42]. O CYP51, envolvido na biossíntese do colesterol que requer CYPOR como dador de

electrões para a conversão de lanosterol a ergosterol é inibido pelo fluconazole. Este facto, leva a especular que ABS pode ser causado por um defeito na biossíntese do colesterol [38]. Apesar da patogénese das malformações ósseas permanecer por esclarecer, existem vários outros elementos que corroboram esta hipótese face à conexão entre a biossíntese do colesterol e o desenvolvimento do esqueleto [38]. Primeiro, variações na biossíntese do colesterol estão todas associadas com anomalias no esqueleto. Em segundo, o colesterol está envolvido na regulação e transdução de sinal de proteínas cruciais na regulação do crescimento e morfogénese de estruturas embrionárias [32, 38, 48].

Contrariamente aos defeitos em outras enzimas da esteroidogénese, que causam tanto a virilização em raparigas como não virilização em rapazes, a deficiência em CYPOR causa genitália ambígua em ambos os sexos [38]. Os rapazes são muitas vezes não virilizados, em virtude da diminuição da actividade 17,20-liase que previne a formação do precursor 19-carbono androgénio [38]. Deficiência em POR tem um efeito mais acentuado na actividade 17,20 liase do CYP17 do que na actividade 17 α -hidrolase. Em contraste, raparigas com deficiência CYPOR são frequentemente virilizadas, mas sem progressão pós-natal, ao contrário raparigas com deficiência na actividade 21-hidrolase não tratadas [38, 42, 49].

Uma das mutações encontradas em ABS é a mutação Q153R, que resulta na substituição de uma glutamina por uma arginina na posição 153 do gene *POR* (figura 7).

Baseado na estrutura de cristal de CYPOR de ratinho, parece que o mutante Q153R está localizado perto do domínio FMN de CYPOR, o que pode indicar uma ligação directa com a transferência de electrões para os seus parceiros redox, os citocromos P450 [40, 50].

Num estudo efectuado por Miller e colaboradores, em que foram analisados 35 mutantes CYPOR relacionados com ABS detectaram que o mutante Q153R está debilitado na sua actividade de redução de cit.c, cerca de 9% de actividade quando comparado com a proteína selvagem. Ainda este mutante também demonstrou actividade debilitada na sustentação da actividade 17- α -hidroxilase e 17,20-hidroxilase (31% e 27% respectivamente) [42, 51].

Estudos posteriores do mesmo grupo indicaram que o mesmo mutante, Q153R, demonstrou um aumento na sua actividade catalítica de CYP1A2 e CYP2C19 (144% para CYP1A2 e 284% para CYP2C19) relativamente à CYPOR^{wt} [34].

Estes resultados surpreendentemente contraditórios poderão ser explicados pela forma como foi feita a abordagem experimental. Por um lado Miller e seus colaboradores expressaram em *E.coli*, CYPOR^{wt} e os diversos mutantes sem os 27 aminoácidos terminais. Por outro lado as proteínas heterólogas foram expressas numa estequiometria CYP:CYPOR, 1:15 para o CYP1A2 e 1:5, estequiometrias diferentes daquela encontrada em fígado humano em que o rácio CYPOR:CYP é aproximadamente 1:10.

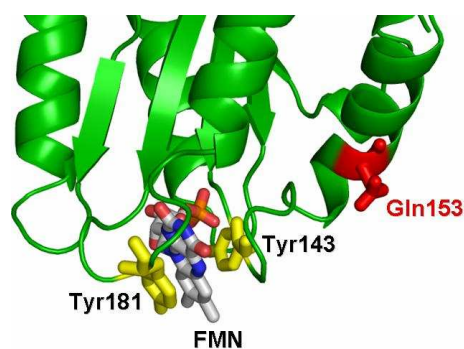


Figura 7 – Esquema representativo da localização da mutação Q153R de CYPOR. Ficheiro PDB: 1B1C: Domínio FMN de CYPOR (Zhao Q et al, Protein Sci 1999), o resíduo nº 1 é o resíduo 61 da proteína total: a tirosina 143 é o resíduo nº 80, glutamina (Q) 153 é o resíduo nº 90 e a tirosina (Y) 181 é o resíduo nº 118. A imagem foi gerada com o software Poly-view 3D, por Kranendonk.

1.4. Expressão heteróloga do sistema enzimático de citocromos P450 humanos em bactérias

Actualmente vários são os sistemas bacterianos utilizados para a expressão heteróloga de enzimas de biotransformação humano, em particular CYPs bem como suas aplicações [52].

Em virtude das suas características, a *Escherichia coli* k12 (*E.coli* k12) por exemplo, tem sido o modelo, por excelência para efectuar a biotransformação de enzimas de biotransformação humanas CYP e CYPOR. A manipulação genética, a sequenciação total do genoma, a ausência de biotransformação endógena que permite detectar apenas a actividade da proteína expressa [53, 54]. Ainda, a utilização de meios de cultura poucos complexos, fácil manutenção em laboratório e existência de fortes promotores que permitem obter rapidamente elevadas densidades ópticas e elevados níveis de

expressão proteica [55, 56]. Assim, *E.coli* K12 tem permitido estudar a biotransformação de xenobióticos mediada por CYPs e o estudo funcional deste complexo enzimático [55, 57].

Para que se consiga expressar CYPs em *E.coli* k12 é necessário que se efectuem modificações na parte N-terminal. No caso dos citocromos P450 humanos esta modificação ocorre ao nível da extremidade 5' do cDNA, visando otimizar quer a sua inserção na membrana bacteriana quer a tradução dos seus respectivos mRNAs em *E.coli* k12 [56, 58].

Por permitir obter grandes quantidades proteicas com elevado grau de pureza, a expressão heteróloga de CYPs humanos em bactérias, tem sido uma ferramenta útil na elucidação de estruturas cristalinas, e ainda na produção de anticorpos específicos de várias enzimas de biotransformação [59, 60].

A expressão heteróloga de enzimas de CYPs e CYPOR humanas em bactérias permite também o estudo do impacto que diferentes mutações nos CYPs e na sua reductase específica têm sobre as suas respectivas capacidades catalíticas, fornecendo assim informações detalhadas sobre interações enzima-substrato e elucidando a relação estrutura/actividade dos CYPs bem como interações proteína-proteína que se estabelecem entre CYPs e CYPOR.

Para obter um modelo celular onde CYP é activo é necessário a sua co-expressão com o seu parceiro redox CYPOR. Neste sentido, várias estratégias têm sido seguidas entre as quais a expressão das duas proteínas sob o controlo de um único promotor (expressão bicistrónica), a expressão das duas proteínas sob o controlo de dois promotores num mesmo plasmídeo ou em plasmídeos diferentes ou, ainda, a expressão de uma proteína de fusão contendo as competências funcionais das proteínas de interesse [56, 61-64].

A expressão heteróloga de CYPs e CYPOR humanas em bactérias contendo alvos indicadores de lesão genética tem permitido a identificação de compostos genotóxicos e o estudo de mecanismos moleculares e bioquímicos da mutagénese. O sucesso destes ensaios prende-se com o facto da sua rapidez, facilidade de execução, baixo custo e elevada reprodutibilidade e sensibilidade [52, 65].

1.4.1. Sistema bacteriano competente em citocromos P450 humanos utilizado no estudo

Durante os últimos anos no Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, tem vindo a ser desenvolvido pelo Doutor Michel Kranendonk e sua equipa, um teste de mutagenicidade com estirpes de *E.coli* K12 para o estudo de biotransformação e genotoxicidade química. Este teste tem por base a reversão de uma mutação pontual no operão biossintético da L-arginina (*argE3*), que torna as estirpes auxotróficas para a L-arginina, sendo por isso incapazes de crescer em meio mínimo sem este aminoácido [65].

Este trabalho culminou com o estabelecimento de diversas estirpes de *E.coli* k12, designadas estirpes BTC, com expressão heteróloga de várias formas dos CYPs humanos em conjunto com a sua respectiva reductase CYPOR [52, 63, 66]. A estirpe BTC foi desenvolvida com o intuito de detectar mutagénese química permitindo o estudo do papel de CYPs humanos na mutagenicidade de várias classes de compostos químicos (alquilantes e não alquilantes). Além desta aplicação e devido às suas características específicas estas estirpes estão a ser aplicadas no estudo funcional de CYP e CYPOR [67, 68].

Para além da mutação num dos genes responsáveis pela biossíntese da L-arginina (*vida supra*), estas estirpes, não possuem capacidade de reparação de DNA por excisão face a deleção parcial do gene *uvrA*, que leva a um aumento da sua sensibilidade relativamente à detecção de mutagenicidade [65, 66]. Mutações nos genes *ogt* e *ada*, genes responsáveis pela reparação de DNA, de lesões de agentes alquilantes, tornam estas estirpes mais sensíveis a mutações induzidas por agentes alquilantes. A mutação *rfa*⁻ traduz-se numa perda parcial da barreira lipopolissacárida da parede bacteriana (LPS^d) tornando-a deste modo mais permeável a agentes genotóxicos de maior dimensão [65, 66].

A co-expressão de CYPs e CYPOR humanos foi levada a cabo através de um sistema biplasmídico, no qual CYPOR se encontra clonada num plasmídeo que origina um baixo número de cópias por células (pLCMPOR) (figura 8). Enquanto que o CYP1A2 foi clonado num plasmídeo que origina um elevado número de cópias por célula (pCWori⁺) (figura 8). Este tipo de expressão biplasmídico permite obter razões CYPOR:CYP fisiologicamente relevantes por se assemelharem às razões CYPOR:CYP encontradas em fígado humano. Contrariamente ao que se encontra em sistemas

bicstrónicos ou com dois promotores, que originam estequeometrias diferentes das fisiologicamente relevante, sendo CYPOR superior ou igual a CYP [56, 63, 64].

Outra vantagem deste sistema de co-expressão biplasmídico reside no facto de permitir a introdução de qualquer forma dos CYPs humanos sem necessidade de proceder à clonagem de novo da CYPOR relativamente ao sistema de co-expressão de CYP e CYPOR utilizando um só plasmídeo (*vida supra*). [66, 69, 70].

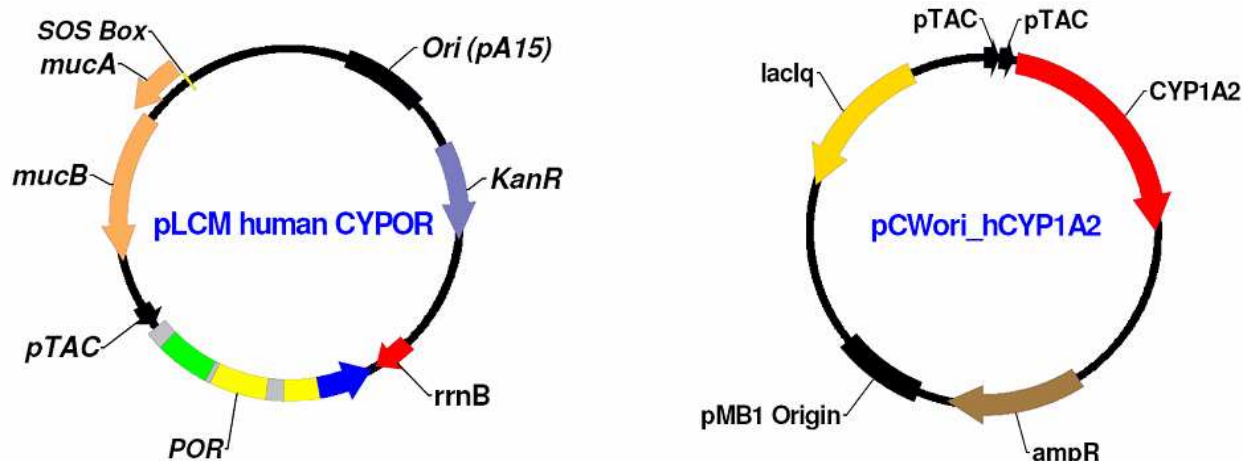


Figura 8 – Representação esquemática dos plasmídeos utilizados na construção das estirpes BTC.

1.4.2. Actividade e doseamento de NADPH oxidoreductase dos citocromos P450

Sendo CYPOR uma enzima com um papel preponderante em virtude da sua participação em várias vias metabólicas envolvidas no metabolismo de endobióticos e de xenobióticos, torna-se relevante determinar a sua actividade e proceder ao seu doseamento.

A metodologia estandardizada para doseamento da NADPH oxidoreductase dos citocromos P450, através da determinação da sua actividade, tem sido baseada maioritariamente em ensaios de cinética de redução de cit.c, utilizando microsomas de sistemas celulares.

O processo de obtenção de membranas é um processo moroso. Uma metodologia que permita dosear CYPOR em bactérias intactas, permite evitar esta preparação morosa, facilitando assim o doseamento de CYPOR em múltiplas amostras de culturas diferentes. Sendo o cit.c uma proteína com elevado peso molecular que não consegue penetrar a parede celular bacteriana, este não permite a determinação da actividade de CYPOR em células inteiras. Torna-se assim necessário, encontrar um substrato que consiga ultrapassar a barreira imposta pela parede celular bacteriana permitindo o doseamento de CYPOR em bactérias intactas.

Os sais de tetrazólio, derivados aromáticos de 1,2,3,4-tetrazole, podem ser possíveis substratos de CYPOR e a sua redução origina formazanos coloridos. Estes sais são comumente utilizados em ensaios de determinação da proliferação celular e citotoxicidade, ensaios enzimáticos, procedimentos histoquímicos e *screening* bacteriológico [71].

II. OBJECTIVO

No laboratório onde este trabalho prático foi executado têm vindo a ser desenvolvidos sistemas bacterianos com expressão de CYPs e CYPOR para aplicação em estudo funcional do complexo enzimático dos citocromos P450 humanos.

Como referido na Introdução o mutante Q153R de CYPOR, a reductase dos citocromos P450, demonstrou apresentar resultados contraditórios relativamente à sua capacidade de transferência de electrões. Por um lado demonstrou uma diminuição na capacidade de redução de cit.c, por outro lado demonstrou ser mais activo na sustentação da actividade catalítica de CYP1A2 relativamente a CYPOR^{wt}.

Este facto pode ser explicado pela forma como a proteína foi expressa nos estudos iniciais levados a cabo por Miller e colaboradores. Por um lado com deleção de 27 aminoácidos da parte N-terminal, visto que estes determinam a localização da proteína e sua ancoragem à membrana. Por outro lado as proteínas heterólogas foram expressas numa estequiometria em que CYPOR está em excesso relativamente a CYPs. Esta estequiometria é diferente da encontrada em microsomas de fígado humano em que o rácio CYPOR:CYP é aproximadamente 1:10.

Assim, neste trabalho utilizou-se um sistema de co-expressão biplasmídico do CYP e CYPOR que resulta na expressão destas proteínas numa estequiometria semelhante à encontrada em microsomas de fígado humano. Mais ainda a CYPOR foi expressa neste sistema biplasmídico, sem deleção dos aminoácidos da parte N-terminal. Para, com base em ensaios de redução de cit.c, ensaios de mutagenicidade e de cinética, se tentar verificar qual o efeito do mutante Q153R na biotransformação de xenobióticos mediada pelo CYP1A2.

Tendo em conta o papel preponderante de CYPOR em várias vias metabólicas é preferível ter uma metodologia que permita dosear eficientemente CYPOR em bactérias intactas (*vida supra*). Assim, numa segunda fase deste trabalho prático pretendeu-se dar um contributo para o desenvolvimento de uma metodologia rápida e eficaz que permita dosear CYPOR em bactérias intactas. Para tal avaliaram-se vários substratos e tentou-se otimizar vários parâmetros do ensaio, como concentração de substrato, densidade celular, temperatura de pré-incubação e percentagem de glucose.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As estirpes bacterianas de *E.coli* k12 e plasmídeos, utilizados estão descritos na tabela III.

Tabela III – Estirpes de *E.coli* k12 e plasmídeos utilizados.

Estirpe	Genótipo	Referência
PD301	<i>ara-14, lacY1, tsx-33, qsr⁻, thi-1, supE44, galK2, λ-, rac⁻, rfbD1, argE3, mgl-51, rpsL31, kdgk51, xyl-5, mtl-1, uvrA6, galE, Δogt::Cm^R, ada10, rfa⁻</i>	[66]
BTC1A2-POR ^{null}	PD301 / pCWh1A2 / pLCM	
BTC1A2-POR ^{wt}	PD301 / pCWh1A2 / pLCM_POR ^{wt}	
BTC1A2-POR ^{Q153R}	PD301 / pCWh1A2 / pLCM_POR ^{Q153R}	
Plasmídeos	Marcadores genéticos	
pLCM	Plasmídeo de mutagenicidade contendo mucAB ⁺ , Kan ^R , derivado de pACYC177	[65]
pLCMPOR	pLCM contendo cDNA de CYPOR humano sob promotor tac	[63]
pLCMPOR ^{Q153R}	pLCM contendo cDNA de CYPOR humano contendo a mutação Q153(A>G)R sob ptac	Dr ^a Daniela Moutinho
pCWh1A2	Plasmídeo contendo cDNA de CYP1A2 humano, Amp ^R , <i>ptac.ptac/ lacI^q</i>	[56]

Os stocks de células bacterianas de cada estirpe foram armazenados a -80 °C (em 15% glicerol v/v).

Os meios, soluções, reagentes, equipamentos e material encontram-se descritos nos anexos.

3.2. Métodos

3.2.1. Crescimento das estirpes bacterianas

Culturas sem indução da expressão de CYP e CYPOR

Stocks de células bacterianas foram inoculados em erlenmeyers contendo meio LB, cloranfenicol (10 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) e crescidas durante 16 horas, em incubadora orbital, a 37 °C e 210 rotações por minuto (rpm).

Culturas com indução da expressão de CYP e CYPOR

Stocks de células bacterianas foram inoculados em *erlenmeyers* contendo meio TB/peptona, cloranfenicol (10 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml), tiamina (1 µg /ml), solução de oligoelementos (0,4 µl/ml) e IPTG (0,2 mM). Estas culturas foram incubadas durante 16 horas em incubadora orbital a 28 °C e 175 rpm.

Quantificação do crescimento

A determinação do crescimento celular foi levada a cabo através da medição da densidade óptica (DO) a 600 nm, que corresponde ao número de células / volume de cultura. As amostras foram preparadas em triplicado, tendo sido diluídas 30 vezes em meio correspondente. Para os ensaios em células inteiras é necessário remover o meio. Assim 1.5 ml de cultura bacteriana foi centrifugado a 12.000 g durante 30 segundos a 4 °C, o sobrenadante é desprezado e o pellet é ressuspendido em tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6). Este procedimento é efectuado duas vezes e depois é determinada a absorvância e verificada a densidade óptica a 600 nm.

3.2.2. Construção das estirpes BTC1A2-POR

A transformação de células *E.coli* PD301 com os plasmídeos de interesse para cada estirpe foi realizada por electroporação. Adicionou-se a 30 µl de células preparadas para electroporação (preparação: veja em baixo), 1-2 µl de DNA plasmídico e transferiu-se a mistura para uma *cuvette* de electroporação previamente mantida em gelo, seguidamente sujeita-se a mistura celular a um impulso eléctrico com 25 µF, 200 Ω, 1,35 kV, que resulta num τ (constante de tempo) à volta de 4.5 milisegundos. As

células bacterianas são depois diluídas com 1 ml de meio NZY⁺, e postas a incubar numa incubadora orbital durante 1 hora a 37 °C e 230 rpm, para permitir expressão dos antibióticos. Por último plaquearam-se 50 e 200 µl de cada cultura transformada, em placas contendo meio LB suplementado com (10 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) e incubou-se em estufa a 37 °C durante 12 a 15 horas.

Preparação de células para electroporação

Stocks de células bacterianas (PD301) foram inoculados em meio LB contendo cloranfenicol (10 µg/ml) e crescidos a 37 °C e 210 rpm até atingir uma DO₆₀₀ (0.4 – 0.6). Seguidamente a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.800 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi ressuspendido em 2 ml de H₂O ultrapura e fez-se o volume até 25 ml com H₂O. A suspensão celular foi seguidamente centrifugada a 4.800 g durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 ml glicerol 10% (v/v). Fizeram-se aliquotas e armazenaram-se a -80 °C.

Confirmação das características fenóticas das estirpes

Para a verificação da manutenção das características fenóticas plaquearam-se 5 µl de colónias transformadas ressuspendidas em PBS (estéril) em placas M9 + Tiamina (M9, Arg⁻), M9 + Tiamina + L – arginina (M9, Arg⁺), placa MacConkey incubadas a 37 °C durante 48 horas e placas LB suplementadas com cloranfenicol (10 µg/ml), canamicina (15 µg/ml), ampicilina (50 µg/ml) incubadas a 37 °C, durante 24 horas.

A característica de auxotrofia para a L-arginina foi confirmada através da incapacidade de crescimento na placa cujo meio M9 não foi suplementado com L-arginina e simultaneamente pela capacidade de crescimento na placa cujo meio M9 foi suplementado com este aminoácido. A característica fenotípica LPS^d foi confirmada pela incapacidade de crescimento celular bacteriano em meio MacConkey (este meio tem na sua composição agentes tóxicos, tais como sais biliares e violeta de cristal, que apenas conseguem penetrar a célula bacteriana, se esta possuir a característica LPS^d). A confirmação da mutação *ogt*⁻ e introdução dos plasmídeos nas estirpes bacterianas foi levada a cabo pela visualização de crescimento bacteriano em placas LB suplementadas com cloranfenicol (10 µg/ml), canamicina (15 µg/ml) e ampicilina (50 µg/ml).

3.2.3. Extração e análise de DNA plasmídico

Isolamento de DNA plasmídico

A obtenção de DNA plasmídico foi feita por recurso a *Kits* de acordo com as instruções do fabricante (Ilustra™ plasmid Prep Mini Kit – GE HealthCare para extração de DNA plasmídico em pequenas quantidades (μg) ou QIA filter™ Plasmid Midi Kit – QIAGEN para extração de DNA plasmídico em grandes quantidades (mg).

Electroforese em gel de agarose para análise de DNA plasmídico

Preparou-se um gel de agarose 1% (v/p) em tampão TAE (pH 8.0) em presença de brometo de etídio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A electroforese correu em tampão TAE, sendo os géis submetidos a um campo eléctrico de 90 V durante cerca de 30 minutos. Após a electroforese os géis foram visualizados com luz UV (254 nm) e fotografados.

Em cada gel que se efectuou foi ainda adicionado um marcador de peso molecular e amostras de DNA plasmídico purificado, como controlo correspondente às amostras que se pretendiam analisar.

3.2.4. Ensaios de mutagenicidade

Ensaios de mutagenicidade realizados com estirpes de BTC1A2-POR sem expressão heteróloga de citocromos P450 humanos

Os ensaios de mutagenicidade realizados com as estirpes sem expressão heteróloga dos CYPs foram efectuados, segundo a técnica utilizada por Kranendonk e colaboradores [65]. Adicionaram-se a tubos contendo gelose de superfície (TOP-agár) previamente liquidificados e mantidos a 45 °C, 100 μl cultura bacteriana e uma dose única de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) (0.078 nmol /placa). A mistura celular foi plaqueada em placas contendo meio VB e incubadas em estufa a 37 °C, durante 48 horas.

Cada ensaio foi feito em duplicado e as placas após a incubação de 48 horas foram fotografadas digitalmente e o número de colónias revertentes presente em cada placa foi determinado com recurso ao software LabWorks™ Image Acquisition and Analysing Software versão 4.6, BioImaging Systems.

Ensaio de mutagenicidade realizados com estirpes de BTC1A2-POR com expressão heteróloga de citocromos P450 humanos

Os ensaios de mutagenicidade, realizados com as estirpes com indução heteróloga dos CYPs humanos foram efectuados segundo o método de pré-incubação líquida descrita por Kranendonk e colaboradores [65, 66].

A pré-incubação líquida foi feita com um volume final de 800 µl contendo, volume variável de água nanopura, 500 µl tampão Ames 0.2 M (pH 7.4), solução de glucose 1M (para uma concentração final de 10 mM), 100 µl de cultura bacteriana e volume variável do composto mutagénico por forma a obter a concentração de mutagénio pretendida no ensaio, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), 2-amino-3-metilimidazol (4,5-*f*)quinolina (IQ) ou 2 – aminoantraceno (2AA), a 37 °C durante 45 minutos com 175 rpm. Após a incubação adicionou-se à mistura celular, gelose de superfície (Top-agár) previamente liquificado e mantido a 45 °C e plaqueou-se em placas contendo meio VB. As placas foram depois incubadas em estufa a 37 °C durante 48 horas.

Cada ensaio com os diferentes compostos e diferentes doses para cada composto foi feito em triplicado. As placas após a incubação de 48 horas foram fotografadas digitalmente e o número de colónias presente em cada placa foi determinado com recurso ao software LabWorks™ Image Acquisition and Analysing Software versão 4.6, BioImaging Systems.

3.2.5. Isolamento da fracção membranas de bactérias

Para o isolamento das fracções membranas das diversas estirpes, seguiu-se o procedimento descrito por Kranendonk e colaboradores [67].

Culturas bacterianas previamente crescidas foram centrifugadas a 4.800 g durante 15 minutos a 4 °C, tendo os sedimentos sido ressuspensos em Tris-Sucrose e congeladas a -80 °C. As suspensões bacterianas foram descongeladas em banho de água à temperatura ambiente, adicionou-se uma mistura de inibidores de protease (extracto de pâncreas 0.02 mg/ml, quimiotripsina 0.003 mg/ml, papaina 0.33 mg/ml, termolisina 0.0005 mg/ml e pronase 0.005 mg/ml), benzonase (concentração final 0.05 µl/ml suspensão bacteriana) e lizosima (concentração final 0.5 ml/ml suspensão bacteriana) e incubou-se a suspensão bacteriana durante 30 minutos a 4 °C, 10 rpm num agitador vertical angular multi-funções. As suspensões celulares foram seguidamente lisadas por

sonicação (5 ciclos de 30 segundos, 25% *output* com intervalos de 59 segundos). Após sonicação as células não lisadas foram separadas por centrifugação durante 25 minutos, a 4.800 g e 4 °C. Os sobrenadantes provenientes desta centrifugação foram centrifugados a 100.000 g durante 1 hora a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação continha a fracção citosólica e foi descartado e o sedimento, representando a fracção membranar foi ressuscitado em 2 ml de tampão TGE com a ajuda de um homogeneizador. Foram feitas aliquotadas de 500 µl das fracções membranares obtidas e armazenadas a -80 °C.

3.2.6. Determinação da concentração proteica da fracção membranar

A determinação da concentração proteica das fracções membranares foi feita através do método de Bradford. Para tal elaborou-se uma curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) diluída em tampão TGE (pH 7.5) de forma a apresentar uma concentração proteica de 0, 0.2, 0.4, 0.6 e 0.8 mg/ml num volume final de 200 µl. As fracções membranares a ser analisadas foram diluídas 20 vezes em tampão TGE.

De seguida adicionou-se 1 ml de reagente de Bradford às fracções membranares e às diluições de BSA. Incubaram-se as misturas no escuro entre 15 minutos a 1 hora e registaram-se os valores da absorvância a 595 nm de cada uma, tendo sido a concentração proteica das fracções membranares determinada através da interpolação da curva de calibração.

3.2.7. Doseamento de citocromos P450

O doseamento dos CYPs foi efectuado através da absorção do espectro diferencial de CYP reduzido na presença de CO versus CYP reduzido, conforme descrito por Omura e Sato [14, 72].

Para determinar a expressão dos CYPs nas células inteiras, 5 ml de culturas bacterianas foram sedimentadas por centrifugação a 4.800 g durante 15 minutos e a 4 °C, tendo o sedimento sido ressuscitado no mesmo volume de tampão TN. Depois adicionou-se ditionito de sódio preparado na hora para uma concentração final de 4.6 mM, de forma a reduzir todo o CYP presente. As amostras foram divididas por duas *macrocuvettes* e traçou-se uma linha de base entre os 400 e 500 nm. Borbulhou-se a *macrocuvette* da amostra com CO e traçou-se o espectro diferencial entre os 400 e 500

nm. Tendo em conta o máximo de absorvância, conhecendo o coeficiente de extinção molar (ϵ) do complexo CYP – CO ($91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para $\Delta\text{Abs } 450 - 490$) foi, então possível calcular a concentração de citocromo P450.

Para dosear CYPs em fracções membranares, diluíram-se as amostras 18 vezes em tampão TGE, num volume final de 1.8 ml. Em seguida adicionou-se ditionito de sódio para uma concentração final de 4.6 mM e dividiu-se o volume por duas *microcuvettes*. Por último borbulha-se a *microcuvette* da amostra com CO, traçou-se o espectro diferencial entre os 400 nm e 500 nm e determinou-se a concentração de citocromo P450 presente na amostra (*vida supra*).

3.2.8. Doseamento da NADPH oxidoreductase do citocromo P450

O doseamento de CYPOR nas membranas das diversas estirpes bacterianas foi efectuado de acordo com o procedimento descrito por Kranendonk e colaboradores, com pequenas modificações [67]. Este método tem por base a capacidade de CYPOR reduzir o cit.c, sendo a reacção acompanhada pelo aumento da absorvância da mistura reaccional a 550 nm ao longo do tempo.

Em *microcuvettes* para um volume final de 2.0 ml adicionou-se cit.c numa concentração final de ($50 \mu\text{M}$), suspensão membranares e tampão de cit.c. Seguidamente dividiu-se o volume por duas *microcuvettes* que se colocaram num espectrofotómetro de feixe duplo. A reacção foi iniciada pela adição de NADPH numa concentração final de ($200 \mu\text{M}$) à *microcuvette* da amostra e mediu-se o aumento de absorvância a 550 nm ao longo do tempo.

A concentração de CYPOR foi determinada utilizando um $\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e sabendo que a actividade específica da CYPOR para a reacção de redução do cit.c é de 3.200 min^{-1} . Com a concentração proteica da amostra calculou-se o conteúdo de CYPOR presente nas fracções membranares.

Utilização de novos substratos para avaliar a actividade de CYPOR

A quantificação de CYPOR nas membranas bacterianas tem também sido levada a cabo com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), baseando-se na capacidade de CYPOR reduzir o MTT, sendo a reacção acompanhada pelo aumento da absorvância a 610 nm da amostra em tempo [73]. As amostras, com

um volume final de 1.0 ml contendo MTT numa concentração final de 100 μM , suspensão membranar bacteriana e tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6), foram colocadas num espectrofotómetro de feixe duplo. A reacção foi iniciada pela adição de NADPH numa concentração final de 200 μM à *microcuvette* da amostra e mediu-se o aumento de absorvância a 610 nm ao longo do tempo.

A concentração de CYPOR foi determinada utilizando um $\Delta\epsilon_{610\text{nm}} = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e sabendo que a actividade específica da CYPOR para a reacção de redução do MTT é de 1.910 min^{-1} [73].

A redução de (3'-1-[(fenilamino-carbonil]-3,4-tetrazólio-bis(4-metóxi-6-nitro) ácido benzenosulfónico hidratado (XTT) foi levada a cabo num volume final de 3 ml contendo XTT numa concentração final de 100mM, tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6), suspensão membranar previamente caracterizada e sistema regenerador de NADPH (0.2 mM NADP⁺, 0.5 mM glucose-6-fosfato, 0.04 U/ml glucose-6-fosfato desidrogenase). O aumento de absorvância foi medido ao longo do tempo a 650 e 675 nm.

A redução de 5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio (CTC) foi levada a cabo num volume final de 1 ml contendo CTC numa concentração final (500 μM), sendo o resto das condições iguas a XTT. O aumento de absorvância foi medido ao longo do tempo a 450 nm.

3.2.9. Avaliação da actividade catalítica dos citocromos P450

o-desalquilação da metoxiresorufina e da etoxiresorufina

O CYP1A2 medeia especificamente tanto a *o*-desalquilação da metoxiresorufina como da etoxiresorufina formando resorufina, sendo a sua actividade enzimáticas designada de *o*-desmetilase da metoxiresorufina ou *o*-detilase da etoxiresorufina (figura 9). A determinação desta actividade foi levada a cabo por fluorimetria, como descrito por Burke *et al.*, com algumas modificações [74].

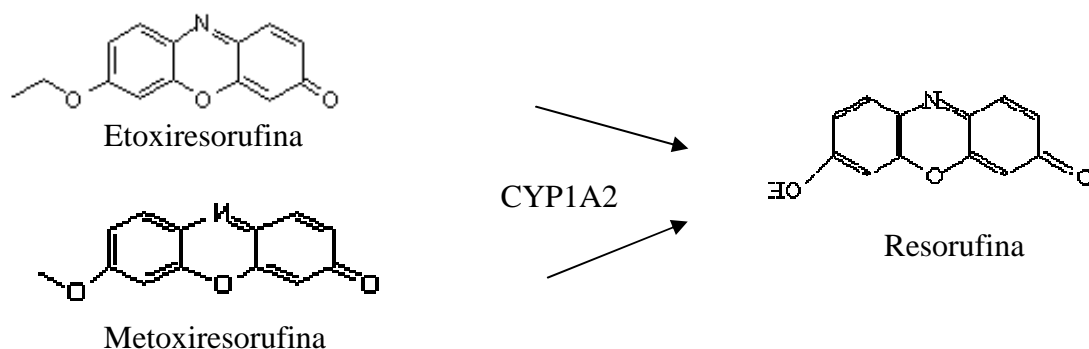


Figura 9 – *o*-desalquilação da metoxiresorufina e etoxiresorufina mediada por CYP1A2 e respectivo produto.

A determinação dos parâmetros cinéticos V_{\max} e K_m para a actividade de etoxiresorufina -*o*- delilase e metoxiresorufina – *o* – desmetilase catalizadas pelo CYP1A2 foi levada a cabo em microplacas de 96 poços, utilizando 7 concentrações de cada substrato até um máximo de 5 μM para a etoxiresorufina e 2 μM para a metoxiresorufina, membranas com 8 nM de CYP1A2, tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6) e sistema regenerador de NADPH (para concentrações finais de 0.5 mM glucose-6-fosfato, glucose – 6 – fosato desidrogenase 0.04 U/poço e NADP^+ 0.2 mM). A concentração de DMSO foi mantida constante a 0.2% (v/v) para todas as concentrações de substrato, pois está descrito que a concentração de solvente no meio influencia a actividade catalítica dos citocromos P450 [75, 76]. A fluorescência de resorufina foi determinada utilizando filtros com λ de excitação = 535 nm e com λ de emissão = 585 nm, em intervalos de 1 minuto. A quantidade de resorufina produzida foi determinada por interpolação de uma recta de calibração deste composto, preparada exactamente nas mesmas condições experimentais descritas para as amostras. Os dados foram modulados segundo a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos V_{\max} e K_m foram determinados recorrendo à utilização do software GraphPad Prism, versão 4.03, (GraphPad Software, Inc.)

***o*- desalquilação da 3-ciano-7etoxicumarina**

Um outro substrato que o CYP1A2 metaboliza é a 3-ciano-7-etoxicumarina (CEC) a 3-ciano-7-hidroxycumarina (CHC) (figura 10).

A metodologia para determinação desta actividade específica de CYP1A2 foi igual ao anteriormente descrito para a etoxiresorufina e metoxiresorufina, com alteração

foram colocados num suporte plástico apropriado e efectuou-se a transferência 100 V durante 1 hora.

Hibridação de anticorpos específicos e obtenção dos “imunoblots”

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi colocada num agente bloqueador (2.5% (p/v) de agente bloqueador em T-TBS) entre 1 a 2 horas para minimizar a hidridação inespecífica e de seguida incubada com o anticorpo primário num agitador vertical angular multi-funções a 4 °C durante a noite. Em seguida a membrana foi lavada três vezes em T-TBS (pH 7.5), durante 5 minutos e incubada à temperatura ambiente durante 1 hora com o anticorpo secundário. A membrana foi depois lavada três vezes em T-TBS (pH 7.5) durante 5 minutos e uma vez em TBS (pH 7.5) durante 5-15 minutos.

As bandas foram depois visualizadas e detectadas utilizando um filme sensível, a quimioluminescência, e reveladas no final em cassete de autoradiografia (ECL Amersahm Biosciences).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como referido nos objectivos, os resultados decorrentes da realização deste trabalho prático estão no seguimento de um plano de estudos realizado em duas fases. Primeiramente pretendeu-se avaliar o efeito da mutação Q153R de CYPOR, relacionada com ABS, na biotransformação de xenobióticos mediada pelo CYP1A2, com base na redução de *cit.c* e em ensaios de mutagenicidade e de cinética.

Este trabalho foi iniciado com o desenvolvimento e caracterização das estirpes BTC1A2-POR^{null}, BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R}, tendo para isso o cDNA de CYPOR delectado ou modificado.

Na segunda fase do trabalho para dosear CYPOR em bactérias intactas, foram efectuados ensaios de redução com vários substratos, primeiramente em membranas e posteriormete em células inteiras. Tentou-se ainda otimizar vários parâmetros do ensaio como, concentração de substrato, densidade celular (DO₆₀₀), percentagem de glucose e temperatura de pré-incubação.

4.1. Efeito da mutação Q153R de CYPOR, relacionada com a Síndrome de Antley Bixler, na biotransformação de xenobióticos mediada pelo CYP1A2

4.1.1. Desenvolvimento de estirpes de BTC1A2-POR com expressão heteróloga das proteínas humanas recombinantes CYP1A2 e CYPOR

Construção de estirpes BTC1A2-POR

Para avaliar o efeito do mutante Q153R de CYPOR, na actividade da proteína selvagem, construíu-se uma estirpe bacteriana contendo cDNA de CYPOR modificado para obter esta proteína mutante, através de um processo de clonagem levado a cabo pela Dr^a Daniela Moutinho (deste departamento).

Construíu-se ainda uma estirpe contendo CYPOR na sua forma selvagem, BTC1A2-POR^{wt} como controlo positivo pois o objectivo era verificar se a proteína mutada afectava ou não a actividade da proteína selvagem (*vida supra*) e uma estirpe não contendo expressão de CYPOR, BTC1A2-POR^{null} como controlo negativo.

Transformaram-se células de *E.coli* PD301 por electroporação, obtendo as estirpes BTC1A2-POR^{wt} (plasmídeos pCWh1A2 e pLCMPOR), a estirpe BTC1A2-POR^{null} (plasmídeos pCWh1A2 e pLCM) e a estirpe BTC1A2-POR^{Q153R} (plasmídeos pCWh1A2 e pLCMPOR^{Q153R}).

Verificação das características fenotípicas

Tabela IV – Análise fenotípica das estirpes BTC1A2-POR

Placa	BTC1A2-POR ^{null}					BTC1A2-POR ^{wt}					
	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#3	#4	#5	#6
MaCconkey	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M9, Arg ⁺	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M9, Arg ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB (Amp+Cm+Kan)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Todos os transformantes apresentaram auxotrofia para L-arginina com excepção do candidato 3 da estirpe BTC1A2-POR^{null}, verificada pelo crescimento em placas com L-arginina e ausência de crescimento em placas sem este aminoácido (tabela IV). Também foi confirmada a deficiência na parede lipossacárida (LPS^d) pela ausência de crescimento em meio MacConkey. A resistência das estirpes em relação a ampicilina (marcador de presença de pCWh1A2), canamicina (marcador de presença de pLCMhPOR) e cloranfenicol (marcador de resistência característico de células PD301) foi verificada pelo crescimento em meio LB suplementado com cloranfenicol (10 µg/ml), canamicina (15 µg/ml) e ampicilina (50 µg/ml) (Tabela IV).

Análise de estabilidade de DNA plasmídico

Quando se transforma estes dois plasmídeos (pCW e pLCM) verifica-se que não há uma conservação dos mesmos, pode acontecer que algum dos plasmídeos não seja inserido no sistema de expressão, ou ainda, que os plasmídeos não apresentem os mesmos níveis de expressão [66, 70]. Não havendo, num sistema de expressão deste tipo, a manutenção da estabilidade dos mesmos torna-se necessário efectuar uma análise da estabilidade do DNA plasmídico transformado.

Para cada estirpe em análise, BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{null}, extraiu-se e analisou-se o DNA de todos os transformantes por electroforese, para verificar a introdução dos plasmídeos pretendidos e estabilidade dos mesmos através da

observação de bandas correspondentes a pCWh1A2 (6916 bp) e pLCMPOR (9079 bp) (figura 11).

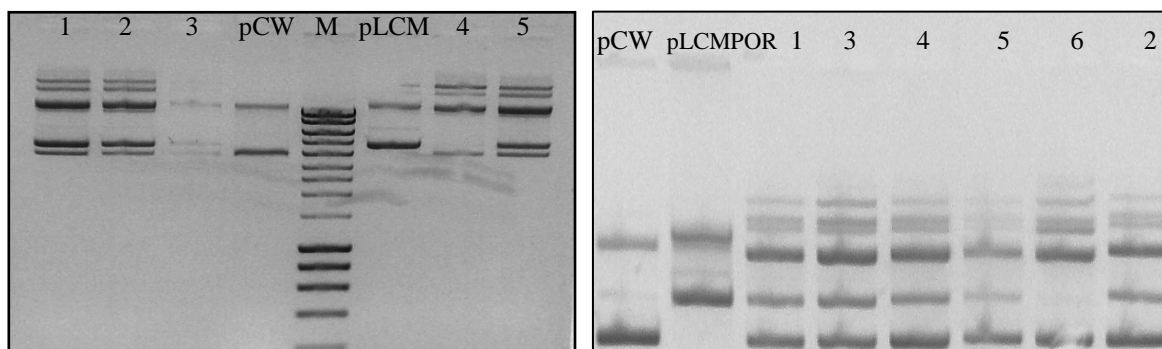


Figura 11 – Electroforese de DNA plasmídico dos transformantes obtidos por electroporação da estirpe BTC1A2-POR^{null} (à esquerda) e BTC1A2-POR^{wt} (à direita).

No que concerne à estirpe BTC1A2-POR^{wt}, em todos os candidatos, são visíveis as bandas correspondentes aos dois plasmídeos de interesse, sendo que os que apresentam maior quantidade de DNA plasmídico são os candidatos 1, 2 e 3. Relativamente à estirpe BTC1A2-POR^{null} o candidato 4 não apresenta uma das bandas do plasmídeo pLCM, o que pode ser um indicador de instabilidade plasmídica. É ainda de referir que o candidato 3 apresenta uma baixa quantidade de DNA plasmídico de interesse e os candidatos 1, 2 e 5 apresentam a maior quantidade de DNA plasmídico e semelhante entre si.

Doseamento da expressão de citocromo P450

De seguida avaliou-se a capacidade de expressão de CYP1A2 de cada candidato. As culturas foram induzidas, foi calculado o conteúdo de CYP1A2 por espectroscopia diferencial de CO e verificou-se a densidade celular (tabela V).

Tabela V – Níveis de expressão de CYP1A2 nos candidatos de transformação das estirpes BTC1A2-POR^{null} e BTC1A2-POR^{wt}.

Candidato	BTC1A2-POR ^{null}			BTC1A2-POR ^{wt}		
	DO ₆₀₀ *	[CYP] nM**	[CYP] / DO	DO ₆₀₀ *	[CYP] nM**	[CYP]/DO
# 1	7.2±0.004	334	46.4	9.5±0.004	236	25.0
# 2	7.1±0.004	258	36.3	9.4±0.004	248	26.5
# 3	7.8±0.005	365	46.6	8.8±0.003	195	22.2
# 4	7.0±0.003	207	29.6	9.3±0.002	229	24.6
# 5	7.0±0.002	285	40.5	9.2±0.002	215	23.4
#6				9.1±0.005	226	24.8

*- médias representativas dos triplicados

**-determinação feita singular arredondada às unidades

A densidade celular das culturas (expresso em DO₆₀₀) é semelhante entre os candidatos de cada estirpe, indicando um crescimento celular semelhante. A estirpe BTC1A2-POR^{wt} apresenta valores de DO₆₀₀ superiores à estirpe BTC1A2-POR^{null} indicando uma densidade celular superior.

Relativamente ao conteúdo de CYP1A2, estes encontram-se entre 200 e 300 nM para ambas as estirpes, sendo que para a estirpe BTC1A2-POR^{null} os candidatos 1, 3 e 5 apresentam expressão de CYP1A2 mais elevada e para a estirpe BTC1A2-POR^{wt} são os candidatos 1 e 2 que apresentam expressão mais elevada de CYP1A2.

Avaliação da sensibilidade de detecção de mutagenicidade

De forma a determinar a sensibilidade de detecção mutagénica dos vários candidatos de transformação das estirpes, efectuaram-se ensaios com uma dose única do composto mutagénico 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) (0,078 nmol/placa) (figura 12).

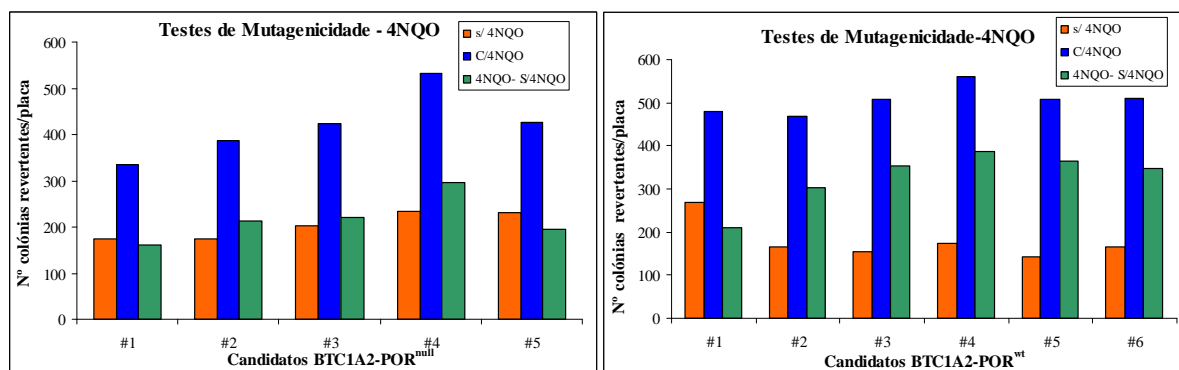


Figura 12 – Análise de sensibilidade de detecção mutagénica das estirpes BTC1A2-POR (à esquerda BTC1A2-POR^{null} e à direita BTC1A2-POR^{wt}).

Ambas as estirpes responderam à dose única de mutagénico originando revertentes induzidos entre as 200 e 400 colónias por placa.

Determinação do transformante mais representativo para cada estirpe BTC1A2-POR

Após terem sido caracterizados os transformantes das várias estirpes seleccionou-se o transformante mais representativo, tendo por base os níveis de expressão de CYP1A2, a estabilidade do DNA plasmídico e o número de revertentes induzidos. O transformante escolhido foi o que apresentou as características mais próximas da média dos transformantes isolados. Assim para a estirpe BTC1A2-POR^{null} escolheu-se o candidato número 2 e para a estirpe BTC1A2-POR^{wt} escolheu-se o candidato número 4.

4.1.2 Avaliação do efeito do mutante Q153R na actividade de CYPOR

Imunodeteção de CYPOR humana nas estirpes BTC1A2-POR em estudo

Como se pretendia avaliar a influência do mutante Q153R de CYPOR na actividade da proteína selvagem, era necessário determinar qual o nível de expressão proteica nas estirpes, assegurando que os resultados dos ensaios seguintes eram devidos à mutação e não a uma diferente expressão proteína nas estirpes.

Para confirmar a presença da proteína CYPOR humana efectuou-se uma imunodeteção de CYPOR nas estirpes em estudo (figura 13).

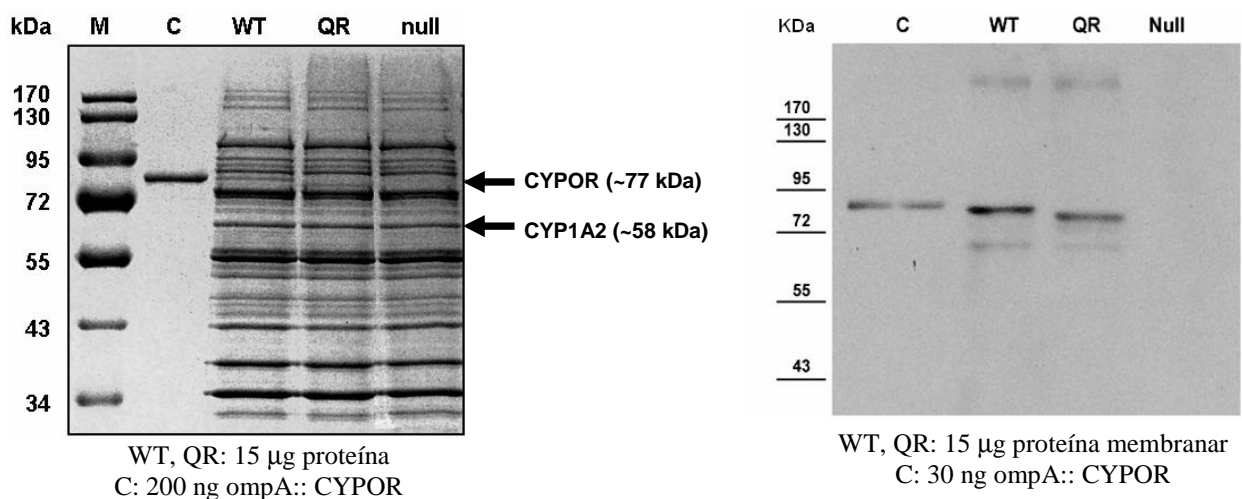


Figura 13 – Imunodeteção de CYPOR humana nas estirpes BTC1A2-POR em estudo.

À esquerda SDS-PAGE e à direita *Western Blot* para detecção de CYPOR (C: controlo, WT: BTC1A2-POR^{wt}, QR: BTC1A2-POR^{Q153R}, Null: BTC1A2-POR^{null}).

No gel de SDS-PAGE são visíveis as bandas correspondentes ao CYP1A2 e CYPOR nas estirpes BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R}. Apenas é visível a banda de CYP1A2 na estirpe BTC1A2-POR^{null}, pois esta não expressa CYPOR.

No *Western Blot* é observável um nível de expressão semelhante de CYPOR^{wt} e do mutante CYPOR^{Q153R}, não se observando banda correspondente a CYPOR na estirpe BTC1A2-POR^{null}.

Estes resultados indicam que os dados de ensaios posteriores serão unicamente devidos à mutação e não influenciados por uma diferencial expressão nos níveis de CYPOR.

Caracterização das fracções membranares das estirpes BTC1A2-POR

As fracções membranares de todas as estirpes em estudo, foram caracterizadas com base na expressão de CYP1A2 por espectroscopia diferencial de CO, quantificação de CYPOR através da redução de cit.c e conteúdo proteico (Tabela VI).

TABELA VI – Conteúdos de CYP1A2, CYPOR e proteína das fracções membranares das estirpes BTC1A2-POR.

Estirpe	Proteína total (mg/ml)	CYP1A2 (pmol/mg proteína)	CYPOR (nmol cit.c/min/mg proteína)
BTC1A2-POR^{null}	16.1 ± 0.3	99 ± 4	1.8 ± 0.6
BTC1A2-POR^{wt}	14.9 ± 0.5	135 ± 14	53.8 ± 1.5
BTC1A2-POR^{Q153R}	15.2 ± 0.2	126 ± 33	49.7 ± 1.1

No que concerne à expressão de CYP1A2, todas as estirpes em estudo apresentaram um conteúdo entre os 99 e 126 pmol/mg proteína, tendo a estirpe BTC1A2-POR^{wt} apresentado o conteúdo em CYP1A2 mais elevado (Tabela VII).

As membranas da estirpe BTC1A2-POR^{Q153R} demonstraram uma igual actividade na redução de cit.c relativamente à estirpe BTC1A2-POR^{wt}, tomando em conta o resultado da imunodeteção (figura 13), indicando que CYPOR^{Q153R} não está debilitado na sua actividade de redução de cit.c. Assim aplicando a actividade específica de CYPOR, foi calculado o conteúdo de CYPOR (nmol cit.c/min/mg proteína) nas fracções membranares de cada estirpe, indicando um rácio de CYPOR:CYP1A2 nas estirpes BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R} de aproximadamente 1:10 (Tabela VII). Este valor é muito semelhante ao encontrado em microsomas de fígado humano, ou seja, o rácio obtido é fisiologicamente relevante [66].

Testes de mutagenicidade com as estirpes *BTC1A2-POR*

Com o intuito de avaliar a eficácia do mutante CYPOR^{Q153R} relativamente à proteína CYPOR^{wt} no que concerne à sustentação da actividade de CYP1A2 de bioactivação de aminas aromáticas (2AA), heterocíclicas (IQ) e nitrosaminas (NNK), originando metabolitos que podem causar mutações no DNA, foram feitos ensaios de mutagenicidade com as estirpes *BTC1A2-POR*^{Q153R}, *BTC1A2-POR*^{wt} e *BTC1A2-POR*^{null}. Os resultados são apresentados na figura 14.

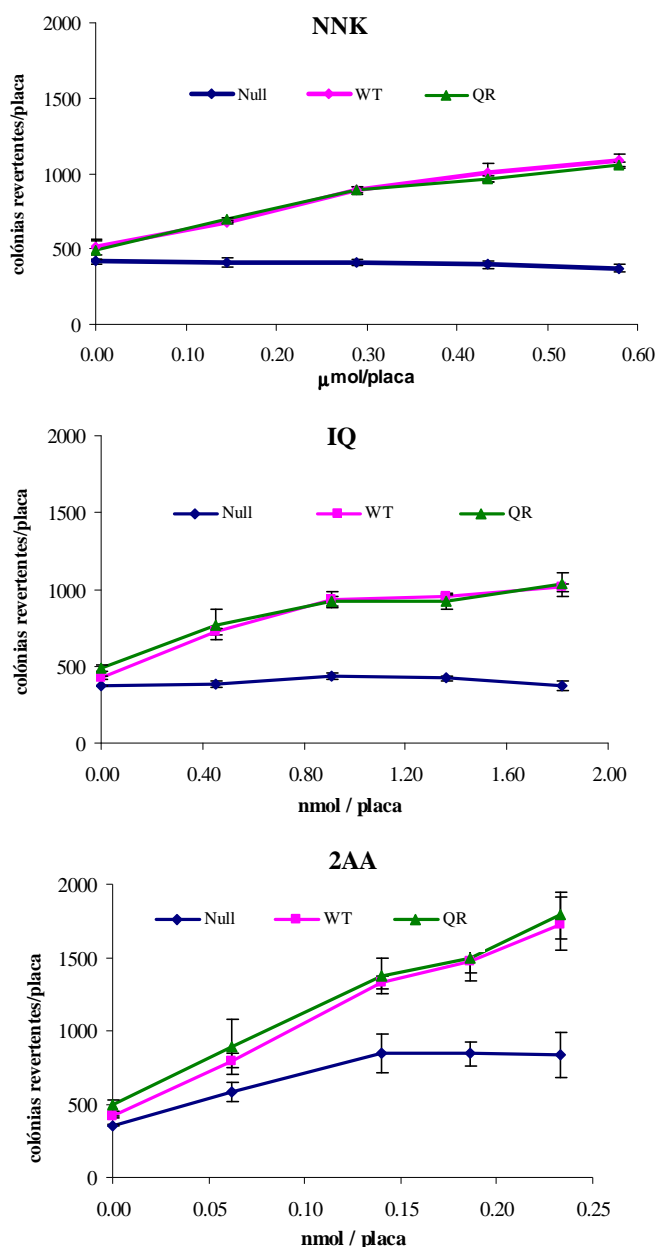


Figura 14 – Curvas dose-resposta dos ensaios de mutagenicidade com compostos, NNK, IQ e 2AA utilizando as três estirpes estudadas (Null: *BTC1A2-POR*^{null}, WT: *BTC1A2-POR*^{wt}, QR: *BTC1A2-POR*^{Q153R}).

As estirpes BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R} apresentaram, para os três compostos mutagénicos utilizados, um aumento da actividade mutagénica dependente da concentração de mutagénico, sendo esse aumento muito semelhante entre as duas estirpes.

Os compostos NNK e IQ não demonstraram ser bioactivados pela estirpe BTC1A2-POR^{null}, como seria de esperar uma vez que não expressando esta estirpe CYPOR a actividade de bioactivação de CYP1A2 está comprometida. Contrariamente, para o composto 2AA é visível uma bioactivação de CYP1A2 por parte da estirpe BTC1A2-POR^{null}, indicando que poderá haver enzimas de *E.coli* k12 capazes de suportar a actividade de CYP1A2 para este composto [67].

Os resultados dos ensaios de mutagenicidade indicam que o mutante CYPOR^{Q153R} demonstrou actividade igual a CYPOR^w na sustentação da bioactivação mediada por CYP1A2 para os compostos NNK, IQ e 2AA.

4.1.3. Caraterização dos parâmetros cinéticos das estirpes BTC1A2-POR

A capacidade para o mutante Q153R suportar a actividade catalítica de CYP1A2 relativamente à CYPOR^{wt} foi avaliada através de ensaios de cinética com substratos específicos do CYP1A2, etoxiresorufina (EROD), metoxiresorufina (MROD) e 3-ciano-7-cumarina (CEC). (figura 15).

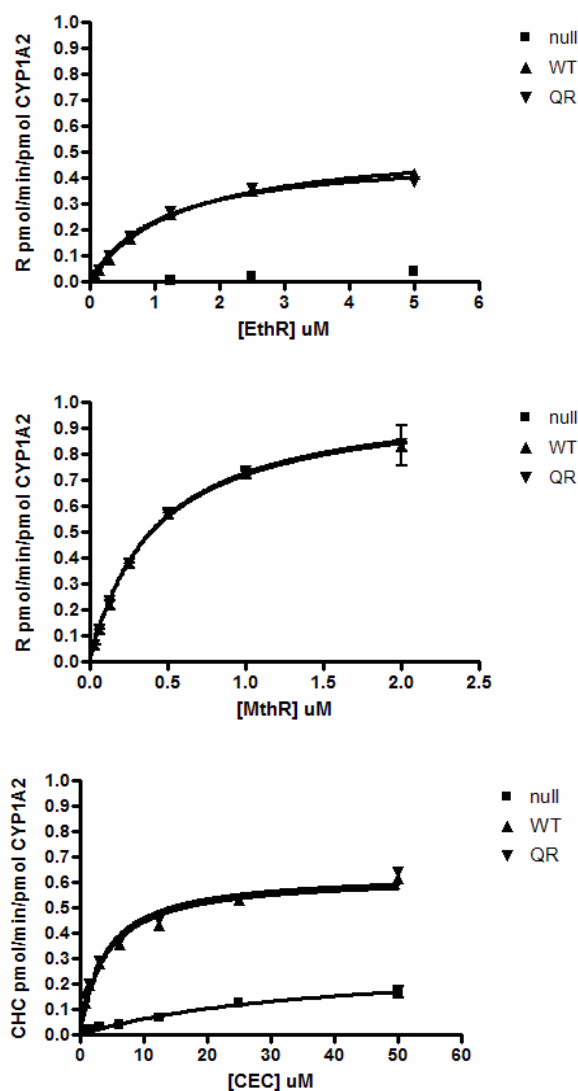


Figura 15 – Gráficos de actividade de de-alquilização do CYP1A2 nas estirpes BTC1A2-POR (WT: BTC1A2-POR^{wt}, QR: BTC1A2-POR^{Q153R}, null: BTC1A2-POR^{null}).

Os dados foram modulados segundo a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos V_{max} e K_m foram determinados recorrendo à utilização do software GraphPad Prism (Tabela VII).

Tabela VII – Parâmetros cinéticos da de-alquilação da etoxiresorufina, metoxiresorufina e 3-ciano-7-cumarina para as estirpes BTC1A2-POR.

ESTIRPE	EROD		MROD		CEC	
	V _{max} (R pmol / min / CYP1A2)	K _m (μM)	V _{max} (R pmol / min / CYP1A2)	K _m (μM)	V _{max} (CHC pmol / min / CYP1A2)	K _m (μM)
BTC1A2-POR ^{null}	-	-	-	-	0.29 ± 0.05	36.1 ± 10.2
BTC1A2-POR ^{wt}	0.54 ± 0.01	1.39 ± 0.07	1.02 ± 0.09	0.42 ± 0.09	0.62 ± 0.02	4.1 ± 0.4
BTC1A2-POR ^{Q153R}	0.50 ± 0.01	1.12 ± 0.08	1.03 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.64 ± 0.02	3.9 ± 0.4

(-): não detectável; R: resorufina; CHC: 3-ciano-7-hidroxycumarina

Os parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} , obtidos para BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R} são iguais, indicando que CYPOR^{Q153R} não afecta a capacidade de CYPOR na sustentação da actividade catalítica de CYP1A2, para os diferentes substratos utilizados.

4.2. Optimização das condições de ensaio para determinação da actividade de CYPOR em células inteiras

4.2.1. Avaliação do efeito de detergente na actividade específica de CYPOR

Como referido na introdução a redução de *cit.c*, substrato não fisiológico de CYPOR, tem sido a metodologia por excelência para dosar CYPOR em membranas. Contudo, *cit.c* é uma proteína com elevado peso molecular, pelo que não consegue penetrar a parede bacteriana.

Um outro substrato utilizado neste laboratório para dosar CYPOR em membranas é o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT). A redução de MTT é um dos métodos mais comumente utilizados para aceder à proliferação celular e citotoxicidade. O MTT recebe os electrões transferidos do NADPH pela CYPOR, sendo reduzido e produzindo um formazano azulado o que permite seguir a reacção espectrofotometricamente através do aumento da absorvância a 610 nm [73].

Em estudos iniciais para determinação da actividade de CYPOR, neste laboratório, verificou-se que quando se utiliza o MTT obtem-se cerca do dobro da actividade relativamente a *cit.c*. Uma possibilidade que pode explicar este resultado

pode ser o facto de existirem agregados membranares contendo CYP e CYPOR sequestrados devido ao método de obtenção das fracções membranares, sendo MTT um composto com peso molecular mais pequeno que o *cit.c* acederia melhor a estes agregados.

Com o intuito de responder à hipótese proposta para a discrepância de valores obtidos, relativamente à actividade de CYPOR quando medida com MTT ou com *cit.c*, e para aumentar a acessibilidade do substrato à CYPOR procedeu-se ao estudo do efeito dos detergentes no ensaio. O primeiro ensaio que se realizou foi efectuado através da redução de *cit.c* adicionando 0.1% (p/v) Triton X-100, o detergente utilizado na purificação de CYPOR (figura 16) [41].

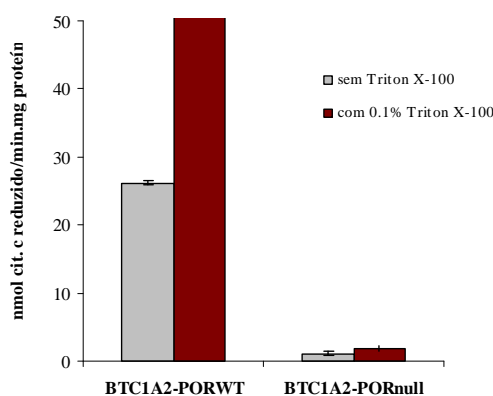


Figura 16 – Ensaio de redução de *cit.c* em membranas adicionando 0.1% Triton X -100 ao tampão de ensaio.

Os resultados denotam um aumento da actividade de CYPOR específica para a redução de *cit.c* em cerca de 2 vezes com a adição de detergente. Uma vez que os detergentes em concentrações elevadas desnaturam as proteínas, procedeu-se a um ensaio com vários detergentes e com um gradiente de concentrações dos mesmos, com o objectivo de determinar qual o detergente e qual a concentração ideal para efectuar o ensaio de determinação da actividade de CYPOR. Assim, realizou-se um ensaio de redução de *cit.c* com um gradiente logarítmico de concentrações de detergente (v/p), com Triton X-100, Tergitol e Tween 20 (figura 17). Utilizou-se a estirpe BTC1A2-POR^{null} como controlo negativo.

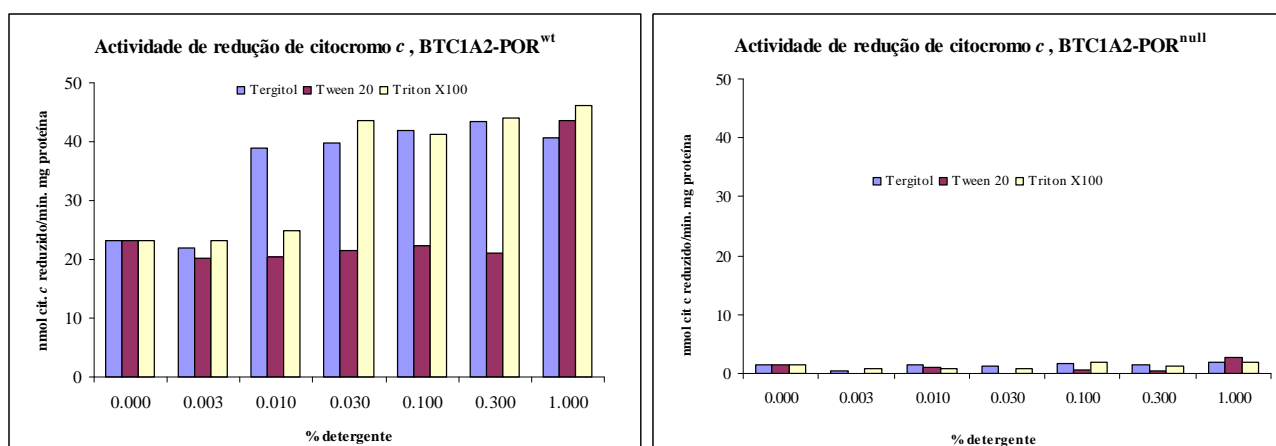


Figura 17 – Actividade de redução de cit.c para os diferentes detergentes em diferentes concentrações utilizados no tampão de ensaio (null: BTC1A2-POR^{null}, wt: BTC1A2-POR^{wt}).

Os resultados indicam que o detergente que permite libertar CYPOR, utilizando as concentrações mais baixas é o Tergitol para 0.01%, verificando-se um aumento da actividade de CYPOR com Triton X-100 a 0.03 %. Para libertar CYPOR utilizando Tween-20 seria necessário utilizar uma concentração muito elevada.

Tendo em conta os resultados obtidos repetiu-se o ensaio de redução de cit.c apenas com Triton X-100 e Tergitol, numa escala linear, para determinar com maior precisão a concentração de detergente (v/p) que se deveria utilizar no ensaio (figura 18).

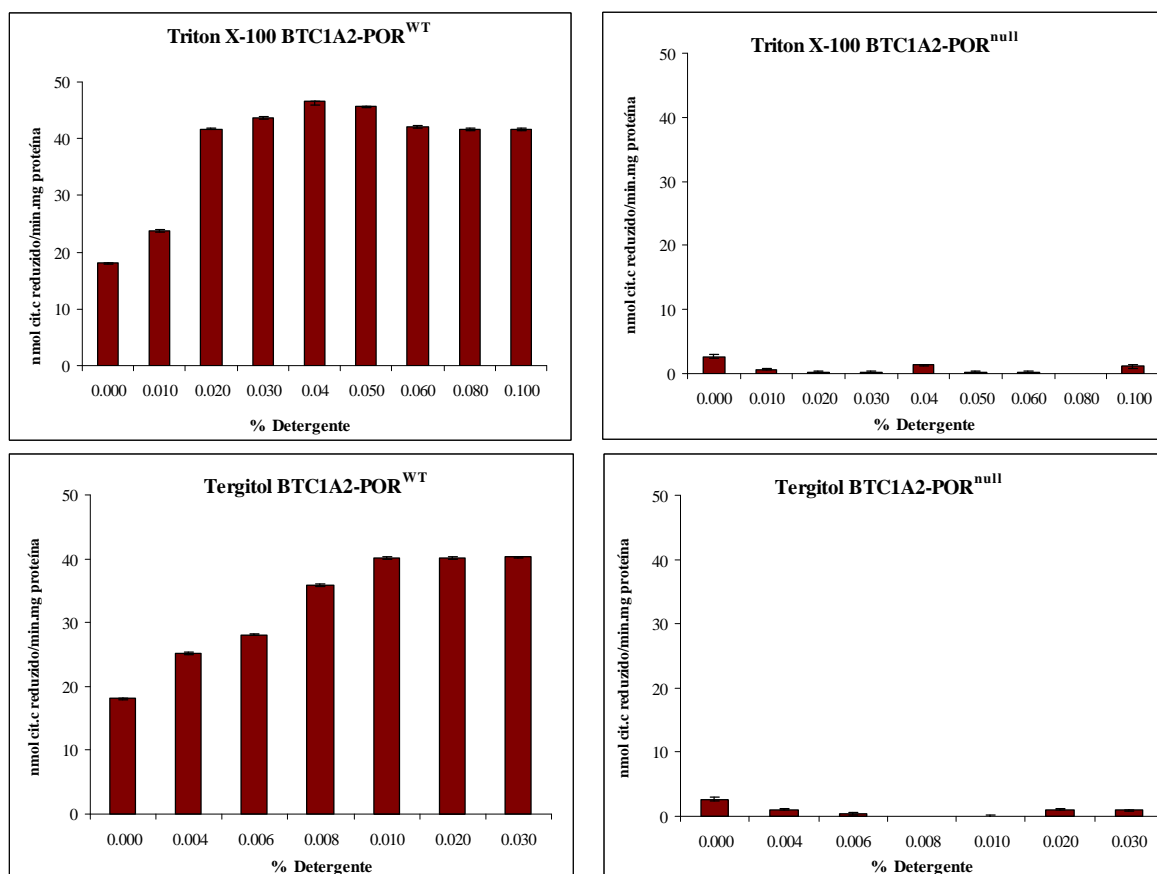


Figura 18 – Redução de cit.c com Triton X-100 e Tergitol em gradiente de concentração no tampão de ensaio.

Os resultados obtidos denotam que é necessária uma menor percentagem de tergitol (0.01 – 0.03%) para libertar CYPOR. Utilizando o Triton X-100 são necessárias concentrações mais elevadas (0.04 %), contudo são atingidos os valores de cit.c reduzido mais elevados (~50 nmol/min.mg proteína). Tendo em conta os resultados obtidos (figura 18) e sendo Triton X-100 utilizado no processo de purificação de CYPOR optou-se por standardizar a incorporação no tampão de ensaio de Triton X-100 (0.04%).

Como controlo final foi efectuado um ensaio de redução de MTT e cit.c com Triton X-100 (0.04%) e tergitol (0.03%) para confirmar a hipótese da diferença de resultados de quantificação de CYPOR por redução de cit.c e MTT (figura 19).

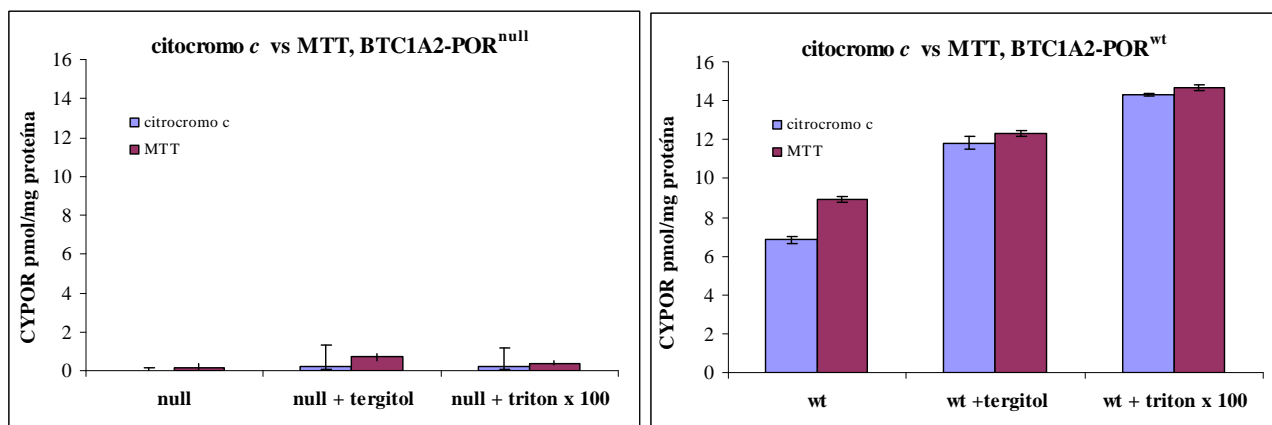


Figura 19 – Comparação da redução de cit.*c* e MTT adicionando Tergitol e Triton X-100 no tampão de ensaio (null: BTC1A2POR^{null}, wt: BTC1A2-POR^{wt}).

Tanto no ensaio de redução de cit *c* como de MTT observou-se um aumento do conteúdo de CYPOR quando se adicionou os detergentes no ensaio, não sendo a quantificação de CYPOR por MTT o dobro relativamente à quantificação por cit.*c*. Isto parece estar de acordo com a ideia proposta, ainda que haja um aumento significativo também de MTT que pode dever-se ao facto do processo de obtenção das fracções membranares formar agregados, pelo que sendo o MTT um composto com peso molecular mais baixo que o cit.*c* acede melhor a estes agregados.

Os resultados indicam que MTT é um substrato possível para ser utilizado no doseamento de CYPOR com células inteiras.

Não sabendo a especificidade da redução de MTT por CYPOR em células inteiras, pesquisaram-se outros substratos que pudessem ser utilizados no doseamento de CYPOR em bactérias intactas e cuja redução fosse mais específica que a redução de MTT.

4.2.2. Avaliação de sais de tetrazólio como possíveis substratos para a determinação da actividade específica de CYPOR em células inteiras

Os sais de tetrazólio, derivados aromáticos de 1,2,3,4-tetrazole são substratos de CYOR e a sua redução origina formazanos coloridos. Estes sais são comumente utilizados em ensaios de determinação da proliferação celular e citotoxicidade, ensaios enzimáticos, procedimentos histoquímicos e *screening* bacteriológico [71].

3'-1-[(fenilamino)-carbonil]-3,4-tetrazólio-bis(4-metóxi-6-nitro)ácido benzenosulfónico hidratado (XTT) é um sal de tetrazólio cuja redução origina um formazano de cor laranja solúvel em água. A redução do XTT pode ser medida directamente no meio da reacção por um método de espectrofotometria contínuo num curto período de tempo (figura 20) [78-80].

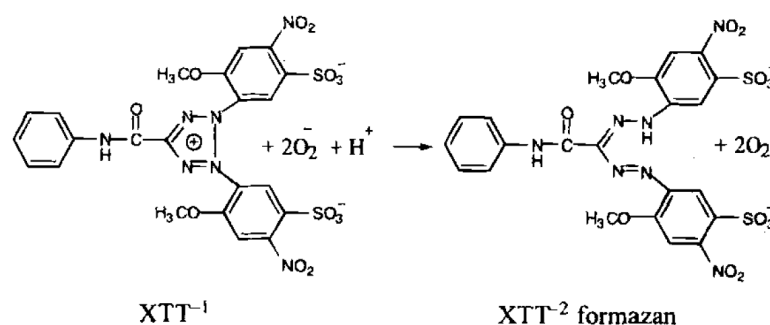


Figura 20 – Redução de XTT, com as respectivas estruturas químicas de XTT e seu formazano (adaptado de Sutherland et al, 1997 [80]).

Sendo referido na literatura um ϵ_{xtt} (470 nm) = 21.6 mM⁻¹cm⁻¹ [80], primeiramente fomos confirmar os dados referidos na literatura, e verificar se XTT apresentava uma melhor sensibilidade para a determinação da actividade enzimática de CYPOR.

Para determinar o máximo de absorvância de XTT, nas nossas condições experimentais efectuou-se um ensaio de cinética de redução de XTT, ao longo do tempo (figura 21) e traçou-se o espectro de absorção de XTT reduzido de 400 a 700 nm.

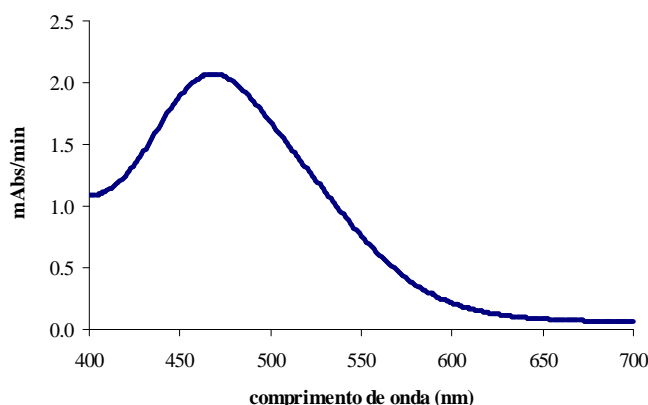


Figura 21 – Absorvância de 400 a 700 nm de XTT reduzido.

Pela análise do espectro de absorção de XTT reduzido de 400 a 700 nm verificou-se um máximo de absorvância de XTT reduzido a 465 nm, 5 nm desviado relativamente ao valor referido na literatura [80].

Seguidamente determinou-se o coeficiente de extinção molar para XTT nas nossas condições experimentais. Como se pretendia obter a quantificação rápida de CYPOR num ensaio em microplacas e só possuímos filtro para leitura das absorvâncias a 450 nm em microplacas, foi necessário determinar o coeficiente de extinção molar a 450 nm e 465 nm no espectrofotómetro. Fez-se ainda uma recta de calibração de XTT reduzido a 450 nm em microplacas.

Para tal, de uma mistura com volume final de 3 ml, contendo XTT 100 μM , tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6), membranas previamente caracterizadas e sistema regenerador de NADPH (NADP⁺ 0.2 mM, 0.5 mM glucose-6-fosfato e 0.04U/ml glucose-6-fosfato desidrogenase), efectuaram-se diluições sucessivas e determinou-se a absorvância a 465 e 450 nm no espectrofotómetro de modo a traçar uma recta de calibração (figura 22).

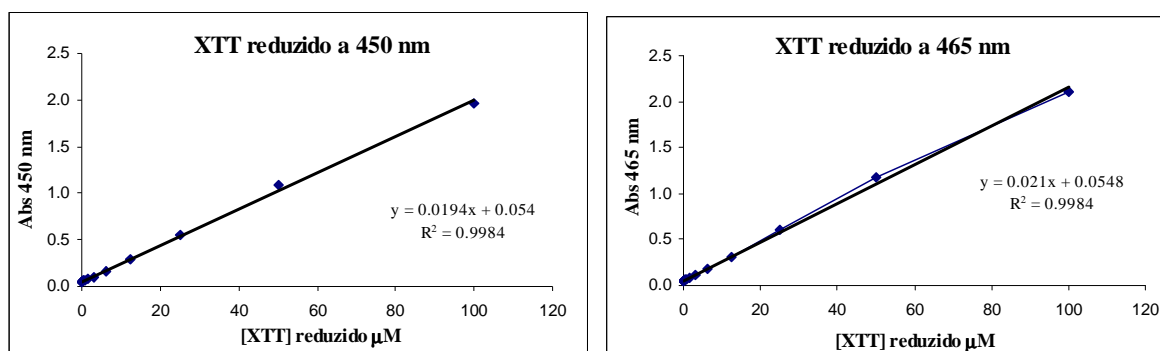


Figura 22 – Curvas de calibração das absorvâncias a 450 e 465 nm em função das concentrações de XTT reduzido obtidas no espectrofotómetro.

O valor do coeficiente de extinção molar de XTT reduzido para os dois comprimentos de onda foi interpolado a partir do declive da recta de calibração. Assim obtivemos um coeficiente de extinção molar de XTT reduzido a 450 nm de $19.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \pm 0.2$ e para 465 nm $21.0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \pm 0.3$, estando o último em concordância com o valor referido na literatura (*vida supra*).

Seguidamente efectuou-se a recta de calibração a 450 nm em microplacas. Das diluições preparadas para efectuar as rectas de calibração no espectrofotómetro retiraram-se 200 μl de cada *macrocuvette* para uma microplaca e determinou-se a absorvância a 450 nm (figura 23).

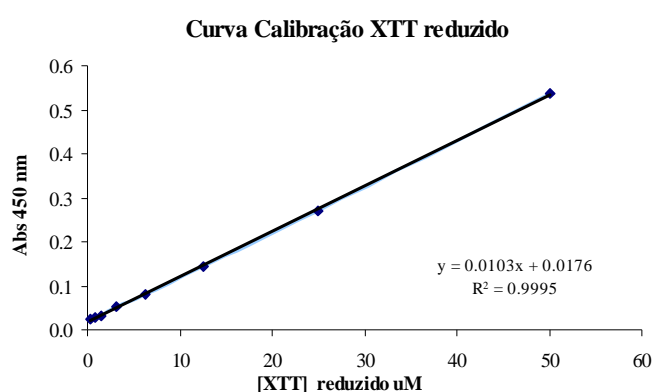


Figura 23 – Recta de calibração a 450 nm em microplacas

Com o intuito de determinar a actividade catalítica de CYPOR perante XTT (K_{cat}) realizou-se um ensaio de cinética de reacção de redução de XTT pela CYPOR ao longo do tempo, numa mistura com um volume final de 1 ml, tendo sido a reacção iniciada pela adição de NADPH numa concentração final (200 μM). Usando o coeficiente de extinção molar obtido para XTT reduzido e sabendo o conteúdo de CYPOR, calculou-se uma constante catalítica de CYPOR para XTT reduzido de 2.025 min^{-1} .

Estes resultados, referentes aos ensaios de redução de XTT em membranas indicam que este pode ser um possível substrato para a determinação da actividade catalítica de CYPOR em bactérias intactas.

Recentemente foi descrito um método para quantificar CYPOR utilizando um sal de tetrazólio, 5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio (CTC) [81]. O CTC é um derivado de tetrazólio que na presença de células vivas é convertido num formazano fluorescente (CTF). Este composto actua de modo semelhante a outros marcadores de

viabilidade celular mas é mais facilmente detectado visto ser fluorescente (figura 24). O seu coeficiente de extinção a 450 nm está descrito com sendo de 0.016 mM^{-1} e $K_{\text{cat}} = 2.520 \text{ min}^{-1}$ [81].

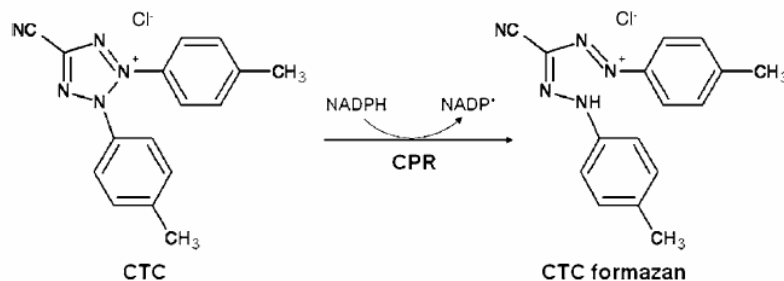


Figura 24 – Redução de CTC catalizada por CYPOR na presença de NADPH. Estruturas químicas do CTC e respectivo formazano (adaptado de Kim et al, 2009 [81]).

Primeiramente determinou-se o máximo de absorvância do formazano nas nossas condições experimentais, para tal fez-se um ensaio de redução de CTC, semelhante ao efectuado para o XTT (*vida supra*). Seguiu-se a reacção ao longo do tempo e traçou-se o espectro de absorção de CTC reduzido de 400 a 700 nm (figura 25).

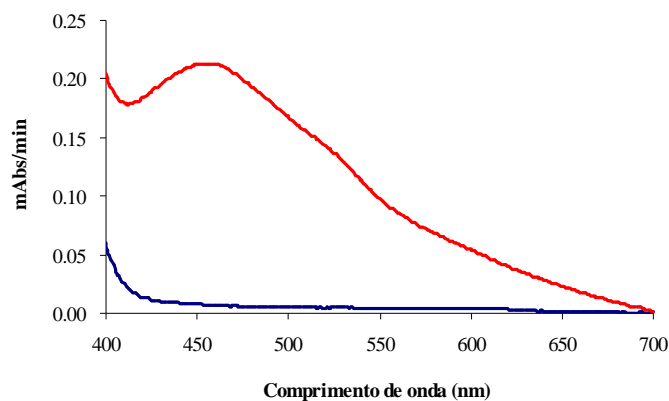


Figura 25 – Absorvância de 400 a 700 nm de CTC (azul – CTC oxidado; vermelho- CTC reduzido).

Seguindo a reacção de redução de CTC de 400 a 700 nm ao longo do tempo, verificou-se que cerca de 30 minutos após o início da reacção ocorrida já não se observavam variações nos valores de absorvância. CTC reduzido apresentou um máximo de absorvância a 450 nm.

Seguidamente pretendia-se determinar o coeficiente de extinção molar de CTC reduzido. Para tal, realizou-se um ensaio de cinética de redução de CTC pela CYPOR numa *microcuvette* com uma mistura de 1 ml contendo CTC (500 μM), tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6) e suspensão membranar previamente caracterizada. A reacção foi iniciada pela adição de NADPH numa concentração final (200 μM) e mediu-se o aumento de absorvância a 450 nm ao longo do tempo.

A redução de CTC origina um precipitado insolúvel, sendo uma desvantagem deste método pois a precipitação interfere na leitura da absorvância, induzindo assim erros no cálculo do coeficiente de extinção molar de CTC reduzido.

Efectuou-se também um ensaio de redução de CTC e mediu-se a fluorescência do formazano formado. Tal como nos ensaios de redução no espectrofotómetro, a variação de fluorescência foi quase nula, contrariamente ao que seria de esperar pelas características de fluorescência do formazano.

Estes resultados demonstram que CTC não é um substrato aplicável, no doseamento de CYPOR nas nossas condições experimentais.

4.2.3. Contribuição no desenvolvimento de uma metodologia para doseamento de CYPOR em bactérias intactas

Nesta parte do trabalho pretendia-se desenvolver uma metodologia eficaz que permitisse o doseamento de CYPOR em bactérias intactas. Para tal utilizaram-se duas estirpes, uma contendo expressão de CYPOR, BTC1A2-POR^{wt}, outra que não continha expressão de CYPOR, BTC1A2-POR^{null} como controlo negativo.

Como referido na introdução o substrato standardizado para o doseamento de CYPOR em membranas é o cit.c, uma proteína de elevado peso molecular pelo que não consegue ultrapassar a parede bacteriana. O cit.c não é por isso um substrato possível de utilizar com células inteiras, tendo assim sido avaliados outros substratos para averiguar se poderiam ser utilizados com células inteiras.

Os resultados obtidos nos ensaios de redução em membranas com os diferentes substratos utilizados, neste estudo, indicam que o MTT e o XTT são substratos possíveis de serem utilizados com células inteiras, para o doseamento de CYPOR em bactérias intactas.

Para dosear CYPOR em células inteiras é necessário otimizar vários parâmetros como o meio do ensaio, a percentagem de glucose, o tampão utilizado, o tempo de pré-incubação ou não das células e ver qual a fase de crescimento das células (densidade celular) ideal para efectuar os ensaios.

Uma vez que pretendemos ter células metabolicamente activas, a glucose é um factor muito importante pois é a fonte de energia, e fornece os electrões (NADPH) necessários à actividade de CYPOR.

A densidade celular é importante pois densidades celulares elevadas levam a uma alteração na cor da mistura quando ocorre a redução do substrato, interferindo na determinação da absorvância. Por outro lado densidades celulares muito baixas não permitem determinar a absorvância da soluções.

Estudos iniciais para determinação da actividade de CYPOR com células inteiras, neste laboratório, indicaram que o tampão ideal para efectuar o ensaio é o tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7,6), a densidade celular (DO_{600}) para valores 0.3 e a percentagem de glucose para valores 0.3. Tendo como ponto de partida estes resultados elaborou-se um ensaio que permitisse a sua confirmação e posteriormente proceder a uma variação dos vários factores determinantes neste ensaio para uma optimização das condições do mesmo.

Assim, os ensaios de redução de MTT com células inteiras em microplacas foram levados a cabo num volume final de 200 μ l contendo tampão fosfato de potássio 0.1 M (pH 7.6), glucose, densidade óptica (número de células/volume) e MTT (100 μ M). Seguidamente determinaram-se as absorvâncias a 620 nm no aparelho de microplacas, em vez de 610 nm como nos ensaios de redução de MTT no espectrofotómetro devido aos filtros. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela VIII.

Num primeiro ensaio de redução de MTT, com bactérias intactas em microplacas variou-se a percentagem de glucose (0.1%, 0.3%, 0.6%, 0.8%) e densidade celular (DO_{600} 0.1, 0.3, 0.5 e 0.7), tendo-se observado uma ligeira diferença entre as estirpes nas densidades celulares intermédias (DO_{600} 0.3 e 0.5) (Tabela VIII). Para tentar determinar o ponto em que BTC1A2-POR^{null} começa a ter absorvâncias superiores a BTC1A2-POR^{wt} (percentagens de glucose intermédias), efectuou-se um ensaio de redução de MTT no qual se varia a densidade celular para valores mais baixos (DO_{600} 0.2; 0.3; 0.4 e 0.5) e a percentagem de glucose para valores superiores a partir

do ponto de viragem (0.5%; 0.75%; 1% e 1.25%). Neste ensaio não se observaram diferenças significativas nas absorvâncias das duas estirpes em estudo (Tabela VIII).

Tendo XTT revelado, também ser um possível substrato para quantificar CYPOR em células inteiras efectuou-se um ensaio de redução de XTT igual ao efectuado com MTT. XTT não demonstrou ser um substrato possível de ser utilizado em bactérias intactas (Tabela VIII).

Para verificar a influência da concentração de substrato na actividade de CYPOR efectuou-se um ensaio de redução variando também a concentração de MTT, não tendo sido verificadas diferenças significativas entre BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{null} (Tabela VIII).

Para determinar se a temperatura de pré-aquecimento influenciava a actividade de CYPOR, efectuou-se um ensaio de redução com densidade óptica e percentagem de glucose iguais ao ensaio anterior mas com temperatura de ensaio a 25°C. Não se observou diferenças significativas entre as estirpes em estudo (Tabela VIII).

Face aos resultados obtidos com os ensaios de microplacas decidiu-se fazer um ensaio variando-se ao mesmo tempo a densidade óptica, percentagem de glucose e concentração de MTT, pois anteriormente havia, sempre um desses factores que era fixo e não se conseguia saber se iria ou não influenciar qualquer um dos outros. Assim efectuou-se um ensaio fixando a densidade óptica e variando a cada densidade celular (DO₆₀₀ 0.2, 0.4 e 0.6) a percentagem de glucose (0.5%, 0.75% e 1%) e concentração de MTT (50, 100 e 150 µM), tendo-se obtido uma ligeira diferenciação entre BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{null} para baixas percentagens de glucose, MTT (50 µM) e densidade óptica 0.6.

Para tentar comprovar os resultados obtidos e verificar se os mesmos eram reprodutíveis efectuou-se um ensaio com densidade celular (DO₆₀₀ 0.6) e MTT (50 µM) com várias percentagens de glucose (0.5%, 0.75% e 1%), em triplicado, como se fosse feito em dias diferentes e a partir de culturas diferentes. Os resultados obtidos não demonstraram reprodutibilidade no ensaio.

TABELA VIII – Variação das condições de ensaio para determinação da actividade de CYPOR com células inteiras

Condições do ensaio	Resultados
Redução de MTT variando % glucose (0.1; 0.3; 0.6 e 0.8) e DO ₆₀₀ (0.1; 0.3; 0.5 e 0.7)	Não há diferenças significativas entre BTC1A2-POR ^{wt} e BTC1A2-POR ^{null} (ligeira diferença para densidade celular mais baixas e percentagens de glucose mais baixas)
Redução de MTT variando % glucose (0.5; 0.75, 1 e 1.25) e DO ₆₀₀ (0.2, 0.3, 0.4 e 0.5)	Diferenciação de BTC1A2-POR ^{wt} e BTC1A2-POR ^{null} para DO ₆₀₀ 0.4 e para percentagens de glucose mais baixas
Redução de MTT e XTT variando % glucose (0.5, 0.75, 1 e 1.25) e DO ₆₀₀ (0.2, 0.3, 0.4 e 0.5)	Não há reprodutibilidade nos resultados de redução de MTT. XTT não é substrato possível de utilizar em células inteiras
Gradiente da concentração de MTT - (10 a 75uM) e (125 a 250 uM)	Não há diferenças significativas entre BTC1A2-POR ^{wt} e BTC1A2-POR ^{null}
Redução de MTT variando temperatura (t=25 °C)	Não há diferenças significativas entre BTC1A2-POR ^{wt} e BTC1A2-POR ^{null}
Redução de MTT variando DO ₆₀₀ (0.2, 0.4 e 0.6), % glucose (0.5, 0.75, 1) e MTT - (50, 100 e 150 uM)	Ligeira diferença entre BTC1A2-POR ^{wt} e BTC1A2-POR ^{null} para DO ₆₀₀ 0.6, 50 µM MTT e baixas percentagens de glucose
Redução de MTT a DO ₆₀₀ 0.6, 50 uM de MTT e variando % de glucose (0.5; 0.75 e 1)	Não parece haver uma reprodutibilidade nos resultados

Nas condições experimentais utilizadas ambas as estirpes apresentaram valores de absorvância idênticos, facto este que pode ser explicado por *E.coli* k12 possuir reductases capazes de reduzir o MTT. Assim nas condições experimentais utilizadas não foi possível dosear CYPOR em bactérias intactas, pelo que se pensou utilizar um inibidor. Possuindo *E.coli* k12 reductases capazes de reduzir CYPs, é pouco provável inibir estas reductases de *E.coli* k12. Assim, desenvolveu-se outra estratégia para inibir especificamente CYPOR e por diferença dos valores de absorvância do ensaio com e sem inibidor seria possível o doseamento de CYPOR em células inteiras.

O inibidor escolhido foi o cloreto de difenileneiodium (DPI), um inibidor de flavoproteínas, o qual na literatura é referido que DPI com uma concentração final de

1 μM inibe totalmente CYPOR purificado, através de um mecanismo de *cross-linking* com o grupo FAD [82-86].

Para tentar inibir totalmente CYPOR, procedeu-se à optimização da concentração de inibidor a ser utilizado, do tempo de pré-incubação das amostras com o inibidor antes de adicionar o substrato e a temperatura de pré-incubação, para tentar inibir especificamente CYPOR.

Primeiramente tentou-se reproduzir os dados existentes na literatura, nas nossas condições experimentais, tendo-se efectuado um ensaio de redução de MTT (50 μM) no espectrofotómetro em membranas BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{null}, com concentrações proteicas iguais para garantir que não iria haver interferência na actividade de CYPOR entre as duas estirpes. O ensaio foi levado a cabo com um gradiente de concentração de DPI, estando o inibidor dissolvido num solvente orgânico, DMSO, cuja concentração foi mantida constante durante o ensaio constante numa percentagem de 0.2% (v/v), não sabendo o efeito da concentração de solvente na actividade de CYPOR, e com dois tempos de pré-incubação a 37 °C. A reacção foi iniciada pela adição de um sistema regenerador de NADPH (0.5 mM glucose-6-fosfato, glucose – 6 – fosfato desidrogenase 0.04 U/poço e NADP⁺ 0.2 mM) e registou-se a redução de MTT ao longo do tempo, a 610nm (figura 26).

Como controlo negativo utilizou-se a estirpe BTC1A2-POR^{null}, não tendo sido observada qualquer variação de absorvância nas condições utilizadas.

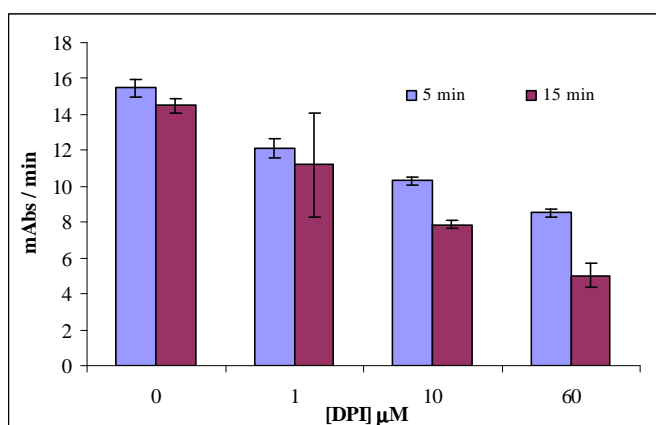


Figura 26 – Redução de MTT ao longo do tempo, a 610 nm, em função da concentração de DPI e do tempo de pré-incubação.

Os resultados indicam que com as concentrações de inibidor utilizadas e os tempos de pré-incubação utilizados no ensaio de redução de MTT não levam à inibição

total de CYPOR, indicando ser necessário aumentar a concentração de DPI e/ou o tempo de pré-incubação para conseguir uma inibição total da CYPOR.

Procedeu-se então, a um ensaio de redução de MTT com membranas, no espectrofotómetro, com um gradiente de concentração de DPI superior (7.5, 75 e 150 μM), tendo para isso sido necessário aumentar a concentração de DMSO na mistura para 0.5%, devido à solubilidade de DPI e mantendo a concentração constante durante o ensaio (*vida supra*). E ainda com tempos de pré-incubação superiores (10, 20 e 30 min) a 37 °C (figura 27).

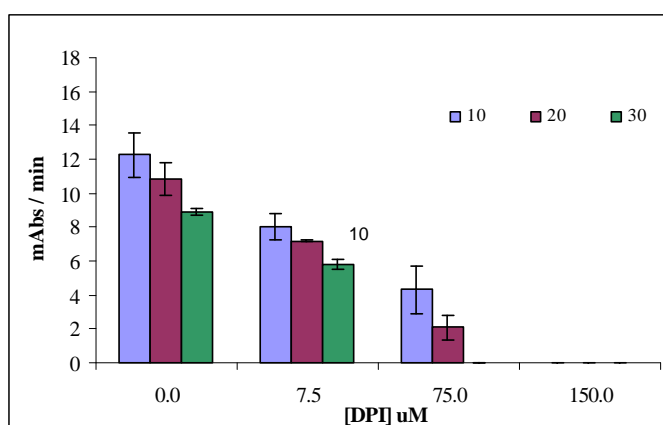


Figura 27 – Redução de MTT ao longo do tempo, a 610 nm, em função da concentração de DPI e do tempo de pré-incubação.

Os resultados obtidos indicam que é atingida a inibição total de CYPOR para DPI (75 e 150 μM), com 30 minutos e 10 minutos de pré-incubação respectivamente. Uma vez que, quanto maior é o tempo de pré-incubação menor é a capacidade metabólica da célula será então preferível utilizar em ensaios posteriores DPI (150 μM), pois obtem-se inibição total de CYPOR com um tempo de pré-incubação menor.

De forma a confirmar os resultados obtidos no espectrofotómetro efectuou-se um ensaio de redução de MTT com membranas (diluídas por forma a conter 0.12 mg/ml proteína) em microplacas, por permitir analisar um gradiente mais amplo de concentração de DPI com os três tempos de pré-incubação (10, 20 e 30 minutos) a 37°C (figura 28), ao mesmo tempo.

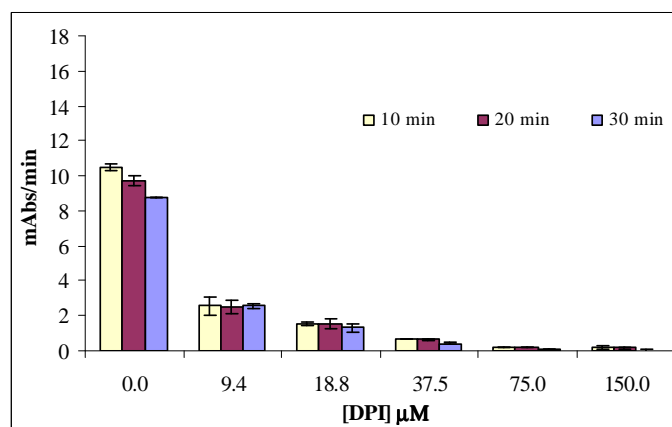


Figura 28 – Redução de MTT ao longo do tempo, a 620 nm (*vida supra*), em função da concentração de DPI e do tempo de pré-incubação.

As concentrações de DPI e tempos de pré-incubação que inibem totalmente CYPOR, obtidas em microplacas, estão de acordo com os dados anteriormente obtidos no espectrofotómetro (figura 27). Contudo, a curva de inibição de CYPOR é mais acentuada no ensaio em microplacas do que no espectrofotómetro. Isto pode ser explicado pelo facto da cinética no espectrofotómetro ser efectuada durante um tempo inferior ao da cinética em microplacas.

Uma vez que não se sabe o efeito da temperatura na actividade de redução de CYPOR elaborou-se um ensaio de redução de MTT com o gradiente de concentração de DPI, utilizado no ensaio anterior com o maior tempo de pré-incubação (30 minutos) mas sendo a pré-incubação efectuada a 4 °C (figura 29).

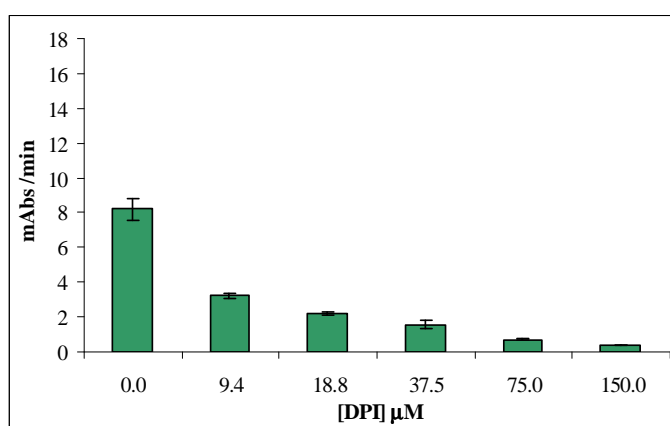


Figura 29 – Redução de MTT ao longo do tempo, a 620 nm (*vida supra*), em função da concentração de DPI e do tempo de pré-incubação a 4 °C.

A redução de MTT em função da concentração de DPI e do tempo de pré-incubação a 4 °C é semelhante ao obtido a 37 °C, indicando que a temperatura de pré-incubação não influencia a actividade de CYPOR.

Tendo em conta os resultados obtidos nos ensaios anteriores decidiu-se efectuar um ensaio de redução de MTT (50 μ M) com células inteiras com variação do tempo de pré-incubação (20 e 30 minutos) e com DPI (150 μ M) (figuras 30 e 31).

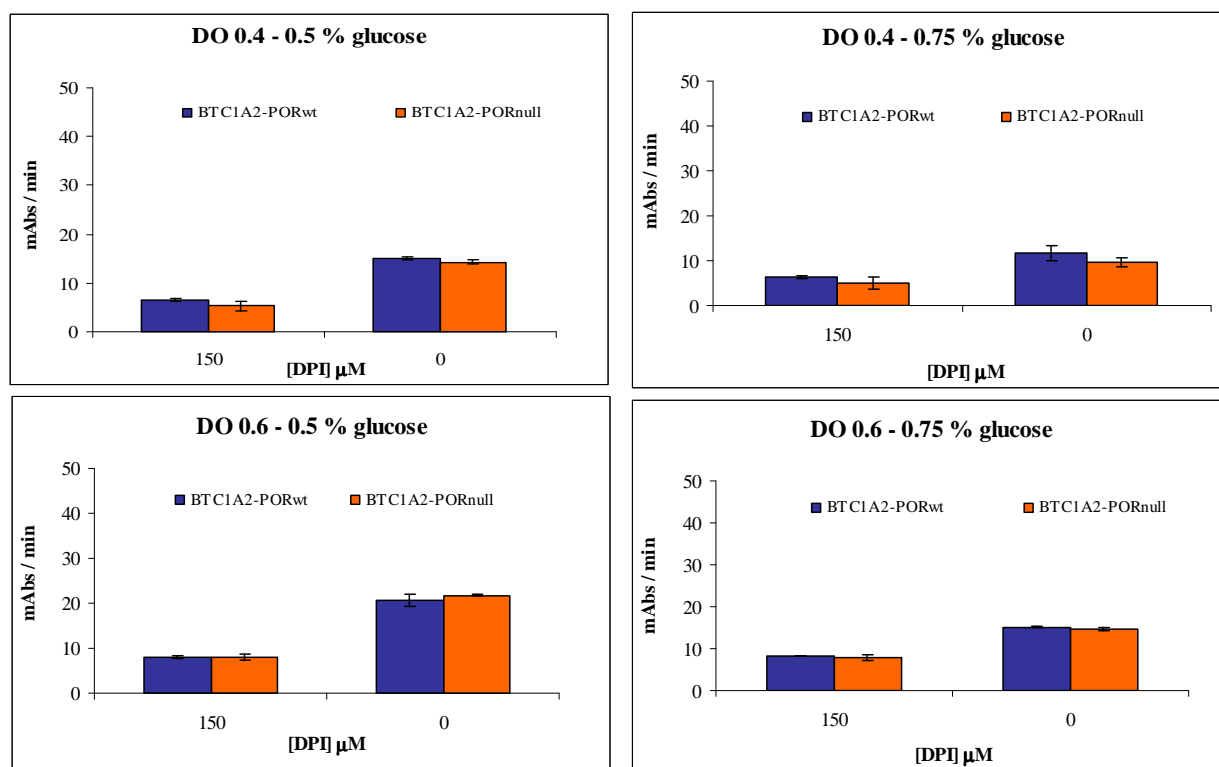


Figura 30 – Redução de MTT com bactérias intactas ao longo do tempo, a 620 nm, com DPI (150 μ M), com 20 minutos de pré-incubação em função da densidade óptica e percentagem de glucose.

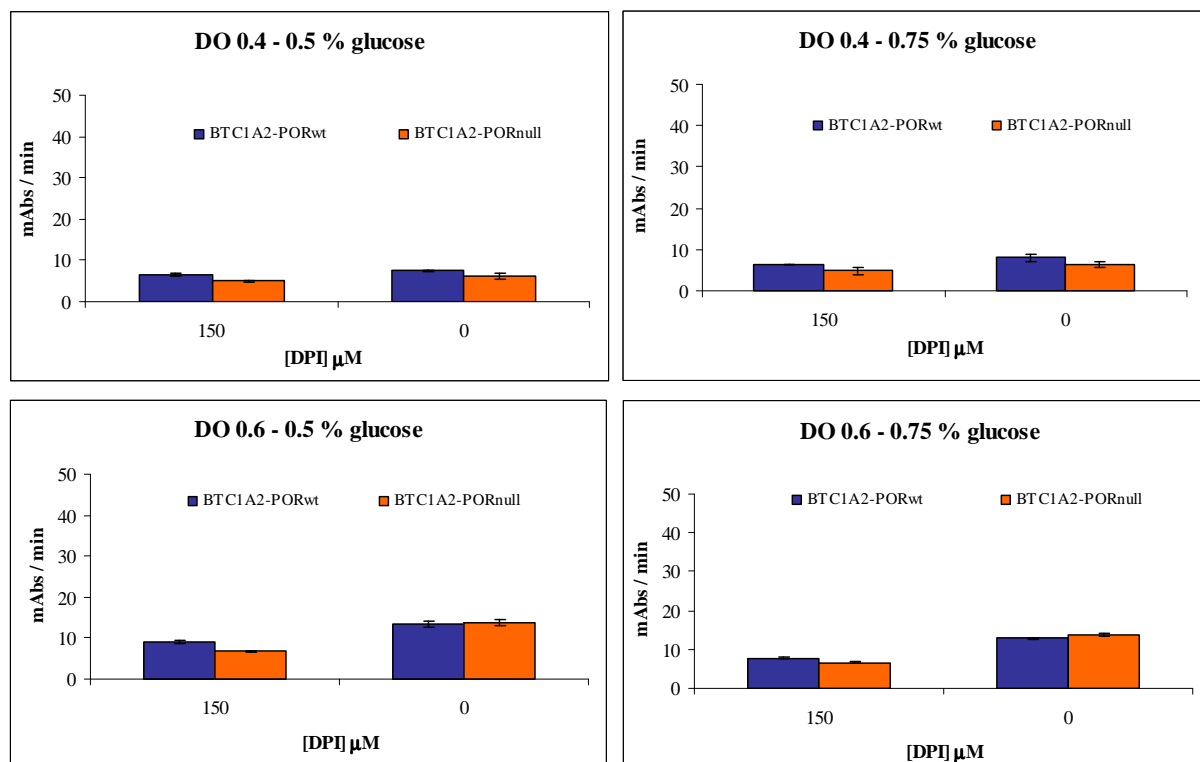


Figura 31 – Redução de MTT com bactérias intactas ao longo do tempo, a 620 nm, com DPI (150 μM), com 30 minutos de pré-incubação em função da densidade óptica e percentagem de glucose.

Os resultados representados nas figuras 30 e 31, relativos às diferentes densidades ópticas, diferentes percentagens de glucose e diferentes tempos de pré-incubação (20 e 30 minutos) não nos permite observar diferenças significativas entre as duas estirpes.

Tal como para as membranas não se sabia qual o efeito da temperatura de pré-incubação, na actividade de CYPOR, assim realizou-se um ensaio de redução de MTT em células inteiras igual ao anteriormente descrito, mas com temperatura de pré-incubação a 4 °C (figura 32).

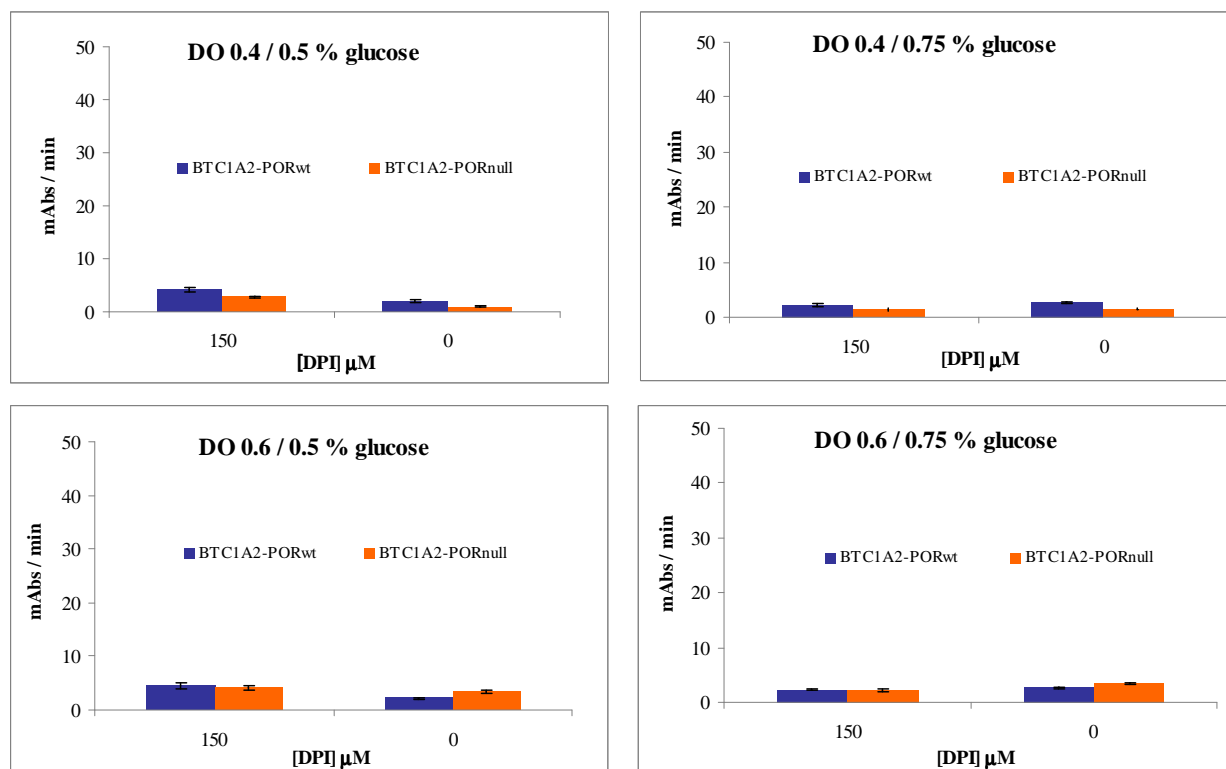


Figura 32 – Redução de MTT ao longo do tempo, a 620 nm, com células inteiras, com DPI (150 μM) com 30 minutos de pré-incubação variando a densidade óptica e a percentagem de glucose a 4 °C.

Face aos resultados obtidos com o inibidor conclui-se que nas condições utilizadas, DPI não permitiu diferenciar a actividade enzimática de CYPOR das reductases de *E.coli* k12, não sendo assim possível dosear CYPOR em bactérias intactas com as condições utilizadas. CYPOR é uma proteína membrana pelo que em células inteiras pode não ser possível ao inibidor alcançar a enzima, por outro lado sendo DPI, um inibidor de flavoproteínas inibe também outras reductases possuindo o coactor flavina. Tendo em conta estes factores poderá ser necessário aumentar mais a concentração de inibidor no ensaio e também diminuir o tempo de pré-incubação, para tentar inibir preferencialmente CYPOR ou as reductases de *E.coli* k12. Face à solubilidade do inibidor e não sabendo qual a influência da concentração de solvente orgânico na actividade de CYPOR pensou-se, então realizar um ensaio de redução de MTT em membranas com três solventes (DMSO, acetonitrilo e etanol) e em gradiente de concentração, para determinar qual o que permitia aumentar a percentagem de solvente na mistura sem afectar a actividade enzimática de CYPOR [75, 76, 87].

O ensaio de redução de MTT foi levado a cabo em membranas (diluídas por forma a conter 0.12 mg/ml proteína), com MTT 50 μ M, com DMSO, acetonitrilo e etanol em gradiente de concentração (0, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5% e 10% v/v) sem e com tempo de pré-incubação de 10 minutos a 37 °C (figura 33).

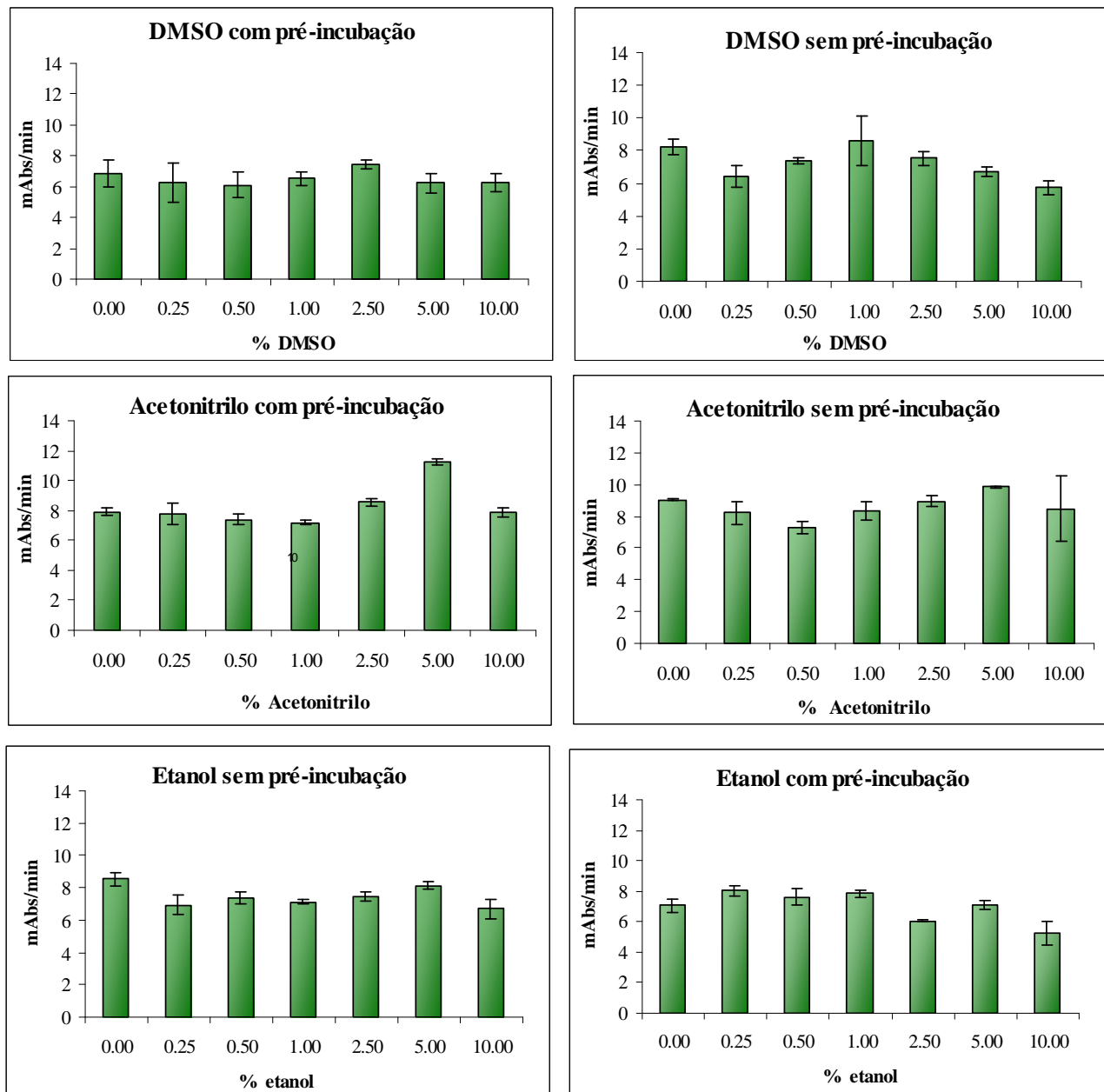


Figura 33 – Redução de MTT ao longo do tempo, a 620 nm, com gradiente de concentração dos vários solventes orgânicos sem e com pré-incubação 10 minutos.

Os resultados representados na figura 33 parecem indicar que o solvente orgânico que permite uma maior percentagem do mesmo na mistura, sem afectar significativamente a actividade enzimática de CYPOR é o acetonitrilo (5%). Uma vez

que nos nossos ensaios o DPI foi dissolvido em DMSO, analisando os gráficos correspondentes a este solvente denota-se que DMSO na concentração de 1% na mistura, a actividade enzimática de CYPOR não é significativamente alterada.

Assim, fez-se um ensaio de redução de MTT com células inteiras em presença de DPI (300 μ M) mantendo a concentração de DMSO constante ao longo do ensaio a 1% e variando o tempo de pré-incubação (0, 1, 2, 3, 4 e 5 min) a 37 °C (figura 34).

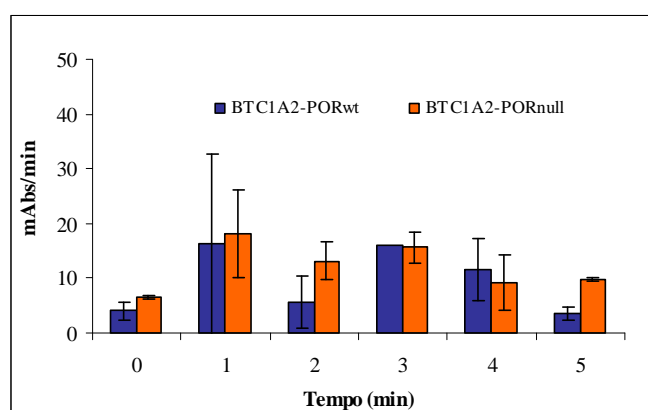


Figura 34 – Redução de MTT ao longo do tempo com 300 μ M DPI a diferentes tempos de pré-incubação.

Os resultados obtidos para a redução de MTT ao longo do tempo (5 min) com 300 μ M de DPI (figura 34), não se observa um óptimo que discrimine as duas estirpes indicando que nas condições utilizadas DPI não inibe especificamente nem CYPOR nem as reductases de *E.coli*. Se inibisse especificamente CYPOR, seria de esperar que ao longo do tempo houvesse um aumento significativo da absorvância da estirpe BTC1A2-POR^{null} relativamente à estirpe BTC1A2-POR^{wt}. Por outro lado se inibisse preferencialmente as reductases de *E.coli* k12 seria de esperar que as absorvâncias de BTC1A2-POR^{wt} fossem ao longo do tempo inferiores a BTC1A2-POR^{null}.

V. Conclusões

Este trabalho experimental tinha como objectivos, por um lado a avaliação do efeito da mutação Q153R de CYPOR na actividade da NADPH oxidorecutase de citocromos P450. Por outro lado pretendia-se dar um contributo para o desenvolvimento de uma metodologia, que permitisse o doseamento de CYPOR em bactérias intactas.

Contrariamente aos resultados obtidos por Miller e colaboradores, o mutante CYPOR Q153R apresentou nas nossas condições experimentais uma actividade igual á proteína selvagem, quer na sua capacidade de redução de cit.c quer na capacidade de sustentar a actividade catalítica na bioactivação de compostos carcinogénicos por parte de CYP1A2. Ainda o mutante CYPOR Q153R demonstrou ser capaz de suportar a actividade catalítica de CYP1A2 com substratos específicos EROD, MROD e CEC, tendo os parâmetros cinéticos K_M e V_{max} obtidos para BTC1A2-POR^{wt} e BTC1A2-POR^{Q153R} sido iguais. Indicando que CYPOR^{Q153R} não afecta a capacidade de CYPOR na sustentação da actividade catalítica de CYP1A2, para os diferentes subsubstratos utilizados.

Face a estes resultados pensa-se que, os dados obtidos por Miller e colaboradores podem não representar o que acontece na realidade em condições fisiológicas, neste caso de patologia ABS, pois os 27 aminoácidos da parte N-terminal da proteína são responsáveis pela localização da proteína e sua ancoragem à membrana. Assim, a sua deleção poderá afectar a actividade e função da CYPOR. Por outro lado a expressão das proteínas heterólogas numa estequeometria diferente da fisiológica, em que CYPOR está em excesso relativamente a CYPs, pode afectar a actividade de CYPs.

Os resultados obtidos neste trabalho, parecem realçar a importância de utilizar tanto a proteína inteira bem como uma expressão heteróloga das proteínas humanas numa estequeometria CYPOR:CYP fisiologicamente relevante semelhante àquela encontrada em microssomas de fígado humano. Só desta forma se pode obter uma correcta avaliação da actividade catalítica de CYPOR e seu efeito combinado com os seus parceiros redox, CYP no metabolismo de xenobióticos e endobióticos e consequentemente uma associação clínica relevante com ABS. Estudos actualmente a ser desenvolvidos neste laboratório, pretendem tentar comprovar os resultados obtidos por Miller e colaboradores e corroborar a hipótese anteriormente referida (*vida supra*).

No que concerne à segunda parte do trabalho nem XTT, nem CTC demonstraram ser substratos possíveis para ser utilizados no doseamento de CYPOR com células inteiras nas nossas condições experimentais.

Relativamente a MTT, não se conseguiu otimizar as condições no que concerne a densidade celular, percentagem de glucose e concentração de MTT, para dosear CYPOR em células inteiras. A redução de MTT não é especificamente efectuada por CYPOR e assim não permite a diferenciação entre a actividade de CYPOR e a actividade das reductases de *E.coli* k12.

Não tendo a redução de MTT permitido o doseamento de CYPOR em células utilizou-se um inibidor, DPI, cujo como objectivo foi tentar encontrar condições de ensaio em que este inibisse preferencialmente CYPOR ou preferencialmente as reductases de *E.coli* k12. A diferenciação da actividade de CYPOR e das reductases de *E.coli* k12, na presença de inibidor, permitiria assim dosear CYPOR em bactérias intactas.

Os resultados obtidos demonstraram que nas condições experimentais utilizadas, DPI não inibiu preferencialmente nem CYPOR nem as reductases de *E.coli* k12. Estes dados podem ser explicados por um lado, porque as condições experimentais não foram suficientemente adequadas, ou por outro lado porque DPI não é um inibidor suficientemente específico para CYPOR.

Em suma, os resultados apresentados não são conclusivos, ou seja, não permitem responder ao objectivo proposto inicialmente. Contudo os resultados obtidos indicam alguns pontos críticos neste tipo de ensaios e que parecem conduzir a novas abordagens que possam permitir o desenvolvimento de uma metodologia eficaz para o doseamento de CYPOR e ensaios de cinética com células inteiras.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Liska, D., M. Lyon, and D.S. Jones, *Detoxification and biotransformational imbalances*. Explore (NY), 2006. **2**(2): p. 122-40.
2. Oshima-Franco, Y.F., Luiz Madaleno, *Biotransformação: importância e toxicidade*. Saúde Rev, 2003. **5**(9): p. 69-76.
3. Liska, D.J., *The detoxification enzyme systems*. Altern Med Rev, 1998. **3**(3): p. 187-98.
4. Meyer, U.A. and J. Gut, *Genomics and the prediction of xenobiotic toxicity*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 463-6.
5. Di Giulio RT, B.W., Sanders BM, Van Veld PA, *Biochemical Mechanisms: Metabolism, Adaptation, and Toxicity, in Fundamentals of Aquatic Toxicology – Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor & Francis Ltd., London, Reino Unido, 1995.
6. Parkinson, A., *An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials*. Toxicol Pathol, 1996. **24**(1): p. 48-57.
7. Celander, M., *Impact of stress on animal toxicology in Stress Physiology in Animals (ed. Balm PH)*. USA. CRC Press, 1999.
8. Liebler, D.C. and F.P. Guengerich, *Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(5): p. 410-20.
9. P.D, J., *"Phase I" and "Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out?* Drug Metab Rev, 2005. **37**: p. 575-580.
10. Klaassen CD, W.J., *Biotransformation of xenobiotic in Casarett & Doull's Toxicology - the basic science of poisons . USA*. McGraw-Hill Companion Handbook, 1999.
11. Timbrell, J., *Principles of biochemical toxicology, 2ª edição*. Taylor & Francis Ltd., London, Reino Unido, 1991. capítulo 6 : p. 194-271.
12. Timbrell, J.A., *Principles of biochemical toxicology*. Taylor & Francis Ltd., London, Reino Unido, 1991. 2ª edição (capítulo): p. 1-2.
13. Nebert, D.W., Jaiswal, A. K. Meyer, U. A. Gonzalez, F. J, *Human P-450 genes: evolution, regulation and possible role in carcinogenesis*. Biochem Soc Trans, 1987. **15**(4): p. 586-9.
14. Omura, T. and R. Sato, *The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 2370-8.
15. Estabrook, R.W., Cooper, DY, Rosenthal, O., *The lighth reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex*. Biochem. Z., 1993. **338**: p. 741-755.
16. Nelson, D.R., Koymans, L. Kamataki, T. Stegeman, J. J. Feyereisen, R. Waxman, D. J. Waterman, M. R. Gotoh, O. Coon, M. J. Estabrook, R. W. Gunsalus, I. C. Nebert, D. W., *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics, 1996. **6**(1): p. 1-42.
17. Guengerich, F.P., *Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview*. J Biochem Mol Toxicol, 2007. **21**(4): p. 163-8.
18. Anzenbacher, P. and E. Anzenbacherova, *Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(5-6): p. 737-47.

19. Lewis, D.F. and G. Sheridan, *Cytochromes P450, oxygen, and evolution*. ScientificWorldJournal, 2001. **1**: p. 151-67.
20. Roberts, G.C., *The power of evolution: accessing the synthetic potential of P450s*. Chem Biol, 1999. **6**(10): p. R269-72.
21. Guengerich, F.P., Guengerich, F. P. Parikh, A. Turesky, R. J. Josephy, P. D., *Inter-individual differences in the metabolism of environmental toxicants: cytochrome P450 1A2 as a prototype*. Mutat Res, 1999. **428**(1-2): p. 115-24.
22. Lewis, D.F., C. Ioannides, and D.V. Parke, *Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen*. Environ Health Perspect, 1998. **106**(10): p. 633-41.
23. Guengerich, F.P., *Cytochromes P450, drugs, and diseases*. Mol Interv, 2003. **3**(4): p. 194-204.
24. Guengerich, F.P., *Cytochrome p450 and chemical toxicology*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 70-83.
25. Nebert, D.W.N., D.R., *Cytochrome P450 (CYP) Gene superfamily*. Enciclopedia of live Sciences, 2005: p. 1-9.
26. Nebert, D.W., Adesnik, M. Coon, M. J. Estabrook, R. W. Gonzalez, F. J. Guengerich, F. P. Gunsalus, I. C. Johnson, E. F. Kemper, B. Levin, W., *The P450 gene superfamily: recommended nomenclature*. DNA, 1987. **6**(1): p. 1-11.
27. Purnapatre, K., S.K. Khattar, and K.S. Saini, *Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs*. Cancer Lett, 2008. **259**(1): p. 1-15.
28. Wienkers, L.C. and T.G. Heath, *Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(10): p. 825-33.
29. Shimada, T., Yamazaki, H. Mimura, M. Inui, Y. Guengerich, F. P., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. **270**(1): p. 414-23.
30. Williams, J.A., Hyland, R. Jones, B. C. Smith, D. A. Hurst, S. Goosen, T. Peterkin, V. Koup, J. R. Ball, S. E., *Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(11): p. 1201-8.
31. BL., H., *Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase in liver*. j.Biol. chem, 1950. **183**: p. 593-605.
32. Hart, S.N., Wang, S. Nakamoto, K. Wesselman, C. Li, Y. Zhong, X. B., *Genetic polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase influence microsomal P450-catalyzed drug metabolism*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18**(1): p. 11-24.
33. Hart, S.N. and X.B. Zhong, *P450 oxidoreductase: genetic polymorphisms and implications for drug metabolism and toxicity*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(4): p. 439-52.
34. Agrawal, V., N. Huang, and W.L. Miller, *Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19*. Pharmacogenet Genomics, 2008. **18**(7): p. 569-76.
35. Fluck, C.E., C. Nicolo, and A.V. Pandey, *Clinical, structural and functional implications of mutations and polymorphisms in human NADPH P450 oxidoreductase*. Fundam Clin Pharmacol, 2007. **21**(4): p. 399-410.
36. Gomes AM, Winter S, Klein K, Turpeinen M, Schaeffeler E, Schwab M, Zanger UM., *Pharmacogenomics of human liver cytochrome P450 oxidoreductase:*

- multifactorial analysis and impact on microsomal drug oxidation*. Pharmacogenomics, 2009. **10(4)**: p. 20 (579-599).
37. Fluck, C.E. and W.L. Miller, *P450 oxidoreductase deficiency: a new form of congenital adrenal hyperplasia*. Curr Opin Pediatr, 2006. **18(4)**: p. 435-41.
 38. Scott, R.R. and W.L. Miller, *Genetic and clinical features of p450 oxidoreductase deficiency*. Horm Res, 2008. **69(5)**: p. 266-75.
 39. Hart, S.N., Li, Y. Nakamoto, K. Wesselman, C. Zhong, X. B., *Novel SNPs in cytochrome P450 oxidoreductase*. Drug Metab Pharmacokinet, 2007. **22(4)**: p. 322-6.
 40. Huang, N., Pandey, A. V. Agrawal, V. Reardon, W. Lapunzina, P. D. Mowat, D. Jabs, E. W. Van Vliet, G. Sack, J. Fluck, C. E. Miller, W. L., *Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis*. Am J Hum Genet, 2005. **76(5)**: p. 729-49.
 41. Marohnic, C.C., Panda, S. P. Martasek, P. Masters, B. S., *Diminished FAD binding in the Y459H and V492E Antley-Bixler syndrome mutants of human cytochrome P450 reductase*. J Biol Chem, 2006. **281(47)**: p. 35975-82.
 42. Miller, W.L., *P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis with multiple clinical manifestations*. Trends Endocrinol Metab, 2004. **15(7)**: p. 311-5.
 43. Miller, W.L., Huang, N. Agrawal, V. Giacomini, K. M., *Genetic variation in human P450 oxidoreductase*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **300(1-2)**: p. 180-4.
 44. Tsuchiya, Y., Tsuchiya, Y.Sueishi, K.Yatabe, K.Yamaguchi, H., *A case of Antley-Bixler syndrome with severe skeletal Cl. III malocclusion*. Bull Tokyo Dent Coll, 2004. **45(2)**: p. 87-93.
 45. Arlt, W., *P450 oxidoreductase deficiency and Antley-Bixler syndrome*. Rev Endocr Metab Disord, 2007. **8(4)**: p. 301-7.
 46. Ko, J.M., Cheon, C. K. Kim, G. H. Yoo, H. W., *A case of Antley-Bixler syndrome caused by compound heterozygous mutations of the cytochrome P450 oxidoreductase gene*. Eur J Pediatr, 2009. **168(7)**: p. 877-80.
 47. Reardon, W., Smith, A. Honour, J. W. Hindmarsh, P. Das, D. Rumsby, G. Nelson, I. Malcolm, S. Ades, L. Sillence, D. Kumar, D. DeLozier-Blanchet, C. McKee, S. Kelly, T. McKeehan, W. L. Baraitser, M. Winter, R. M., *Evidence for digenic inheritance in some cases of Antley-Bixler syndrome? J Med Genet*, 2000. **37(1)**: p. 26-32.
 48. Fukami, M., Horikawa, R. Nagai, T. Tanaka, T. Naiki, Y. Sato, N. Okuyama, T. Nakai, H. Soneda, S. Tachibana, K. Matsuo, N. Sato, S. Homma, .Nishimura, G. Hasegawa, T. Ogata, T., *Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90(1)**: p. 414-26.
 49. Fukami, M., Fukami, M.Nishimura, G. Homma, K. Nagai, T. Hanaki, K. Uematsu, A. Ishii, T. Numakura, C. Sawada, H. Nakacho, M. Kowase, T. Motomura, K. Haruna, H. Nakamura, M. Ohishi, A. Adachi, M. Tajima, T.Hasegawa, Y. Hasegawa, T. Horikawa, R. Fujieda, K. Ogata, T., *Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94(5)**: p. 1723-31.
 50. Zhao, Q., Modi, S., Smith, G., Paine, M., McDonagh Pc, Wolf, CR., Tew, D., Lian, LY, Roberts, GC., Driessen, HP., *Crystal structure of the FMN-binding*

- domain of human cytochrome P450 reductase at 1.93 Å resolution. *Protein. Sci.*, 1999. **8**: p. 298-306.
51. Miller, W.L., *P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1061**: p. 100-8.
 52. Kranendonk, M., Laires, A. Rueff, J. Estabrook, W. R. Vermeulen, N. P., *Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations*. *Crit Rev Toxicol*, 2000. **30**(3): p. 287-306.
 53. Parikh, A., E.M. Gillam, and F.P. Guengerich, *Drug metabolism by Escherichia coli expressing human cytochromes P450*. *Nat Biotechnol*, 1997. **15**(8): p. 784-8.
 54. Sankare, P., Hitton, ME., Vanbogelen., RA., Clark, RL., Neidhardt, FC., *Expression analysis of cloned chromosomal segments of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1993. **175** (16): p. 5145-5152.
 55. Yun, C.H., Yim, S. K. Kim, D. H. Ahn, T., *Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in Escherichia coli*. *Curr Drug Metab*, 2006. **7**(4): p. 411-29.
 56. Fisher, C.W., Caudle, D. L. Martin-Wixtrom, C. Quattrochi, L. C. Tukey, R. H. Waterman, M. R. Estabrook, R. W., *High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli*. *Faseb J*, 1992. **6**(2): p. 759-64.
 57. Fujita, K. and T. Kamataki, *Genetically engineered bacterial cells co-expressing human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase: prediction of metabolism and toxicity of drugs in humans*. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2002. **17**(1): p. 1-22.
 58. Barnes, H.J., M.P. Arlotto, and M.R. Waterman, *Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(13): p. 5597-601.
 59. Wang, M., Roberts, D. L. Paschke, R. Shea, T. M. Masters, B. S.Kim, J. J., *Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(16): p. 8411-6.
 60. Soucek, P., *Expression of cytochrome P450 2A6 in Escherichia coli: purification, spectral and catalytic characterization, and preparation of polyclonal antibodies*. *Arch Biochem Biophys*, 1999. **370**(2): p. 190-200.
 61. Li, D.N., Pritchard, M. P. Hanlon, S. P. Burchell, B. Wolf, C. R. Friedberg, T., *Competition between cytochrome P-450 isozymes for NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase affects drug metabolism*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **289**(2): p. 661-7.
 62. Dong, J. and T.D. Porter, *Coexpression of mammalian cytochrome P450 and reductase in Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **327**(2): p. 254-9.
 63. Kranendonk, M., Fisher, C. W. Roda, R. Carreira, F. Theisen, P. Laires, A. Rueff, J. Vermeulen, N. P. Estabrook, R. W., *Escherichia coli MTC, a human NADPH P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 2A6, 3A4, or 3A5: catalytic activities and mutagenicity studies*. *Mutat Res*, 1999. **441**(1): p. 73-83.
 64. Fisher, C.W., Shet, M. S. Caudle, D. L. Martin-Wixtrom, C. A. Estabrook, R.W., *High-level expression in Escherichia coli of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(22): p. 10817-21.

65. Kranendonk, M., Mesquita, P. Lares, A. Vermeulen, N. P. Rueff, J., *Expression of human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli: a system for biotransformation and genotoxicity studies of chemical carcinogens*. *Mutagenesis*, 1998. **13**(3): p. 263-9.
66. Duarte, M.P., Duarte, M. P. Palma, B. B. Lares, A. Oliveira, J. S. Rueff, J. Kranendonk, M., *Escherichia coli BTC, a human cytochrome P450 competent tester strain with a high sensitivity towards alkylating agents: involvement of alkyltransferases in the repair of DNA damage induced by aromatic amines*. *Mutagenesis*, 2005. **20**(3): p. 199-208.
67. Kranendonk, M., Marohnic, C. C. Panda, S. P. Duarte, M. P. Oliveira, J. S. Masters, B. S. Rueff, J., *Impairment of human CYP1A2-mediated xenobiotic metabolism by Antley-Bixler syndrome variants of cytochrome P450 oxidoreductase*. *Arch Biochem Biophys*, 2008. **475**(2): p. 93-9.
68. Marohnic, C., Marohnic, C. C. Panda, S. P. Martasek, P. Masters, B. S., *Human Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency Caused by the Y181D Mutation: Molecular Consequences & Rescue of Defect*. *Drug Metab Dispos*, 2009.
69. Venkatakrisnan, K., von Moltke, L. L. Court, M. H. Harmatz, J. S. Crespi, C. L. Greenblatt, D. J., *Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches*. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(12): p. 1493-504.
70. Kranendonk, M., Fisher, C. W. Roda, R. Carreira, F. Theisen, P. Lares, A. Rueff, J. Vermeulen, N. P. Estabrook, R. W., *Escherichia coli MTC, a NADPH cytochrome P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450: comparison of three types of expression systems*. *Mutat Res*, 1999. **439**(2): p. 287-300.
71. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. *Biotechnol Annu Rev*, 2005. **11**: p. 127-52.
72. Omura, T. and R. Sato, *The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. II. Solubilization, Purification, and Properties*. *J Biol Chem*, 1964. **239**: p. 2379-85.
73. Yim, S.K., Yun, C. H. Ahn, T. Jung, H. C. Pan, J. G., *A continuous spectrophotometric assay for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*. *J Biochem Mol Biol*, 2005. **38**(3): p. 366-9.
74. Burke, M.D., Thompson, S. Weaver, R. J. Wolf, C. R. Mayer, R. T., *Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver*. *Biochem Pharmacol*, 1994. **48**(5): p. 923-36.
75. Chauret, N., A. Gauthier, and D.A. Nicoll-Griffith, *Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes*. *Drug Metab Dispos*, 1998. **26**(1): p. 1-4.
76. Busby, W.F., Jr., J.M. Ackermann, and C.L. Crespi, *Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450*. *Drug Metab Dispos*, 1999. **27**(2): p. 246-9.
77. Sambrook J., F.T.F., Maniatis T., *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 2^o edição, Cold Spring Harbor Laboratory (CHS), Cold Spring Harbor, 1989(New-York, EUA).
78. Knight, S.A. and A. Dancis, *Reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) is dependent on*

- CaFRE10 ferric reductase for Candida albicans grown in unbuffered media.* Microbiology, 2006. **152**(Pt 8): p. 2301-8.
79. Kuhn, D.M., Balkis, M. Chandra, J. Mukherjee, P. K. Ghannoum, M. A., *Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(1): p. 506-8.
80. Sutherland, M.W. and B.A. Learmonth, *The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase.* Free Radic Res, 1997. **27**(3): p. 283-9.
81. Kim, D.H., Yim, S. K. Kim, K. H. Ahn, T. Yun, C. H., *Continuous spectrofluorometric and spectrophotometric assays for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride.* Biotechnol Lett, 2009. **31**(2): p. 271-5.
82. Li, Y. and M.A. Trush, *Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(2): p. 295-9.
83. McGuire, J.J., Anderson, D. J. McDonald, B. J. Narayanasami, R. Bennett, B.M., *Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate.* Biochem Pharmacol, 1998. **56**(7): p. 881-93.
84. O'Donnell, B.V.,Tew, D. G. Jones, O. T. England, P. J., *Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase.* Biochem J, 1993. **290** (Pt 1): p. 41-9.
85. Ratz, J.D., Ratz, J. D.McGuire, J. J. Anderson, D. J. Bennett, B. M., *Effects of the flavoprotein inhibitor, diphenyleneiodonium sulfate, on ex vivo organic nitrate tolerance in the rat.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(2): p. 569-77.
86. Wang, Y.X., Wang, Y. X. Poon, C. I.Poon, K. S. Pang, C. C, *Inhibitory actions of diphenyleneiodonium on endothelium-dependent vasodilatations in vitro and in vivo.* Br J Pharmacol, 1993. **110**(3): p. 1232-8.
87. Easterbrook, J., Easterbrook, J. Lu, C. Sakai, Y. Li, A. P., *Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes.* Drug Metab Dispos, 2001. **29**(2): p. 141-4.

VII. ANEXOS

Tabela IX – Meios e sua composição.

Para obtenção dos meios sólidos adicionou-se agár na concentração de 15 g/l com exceção de TOP-agár em que se adiciona agár na concentração de 6 g/l.

Meios	Composição por litro
LB	10 g triptona, 5 g extracto de levedura, 10 g NaCl
NZY	10 g hidrolizado de caseína, 5 g extracto levedura, 5 g NaCl autoclavar e suplementar com 12,5 ml Glucose 1M, 12,5 ml MgSO ₄ 1M, 10 ml Glucose 2M
M9	790 ml H ₂ O nanopura, 10 ml glucose 40% (p/v) e 200 ml Sais M9 (5X concentrada) estéries
TB	12 g triptona, 24 g extracto levedura, 2 g peptona e 4 ml glicerol. Autoclavar e adicionar 100 ml tampão TB
VB	930 ml H ₂ O nanopura, autoclavar e adicinar 50 ml glucose 40% (p/v) e 20 ml sais VB (50 x concentrado)
MacConkey	50 g MacCkonkey
TOP – Agár	5 g NaCl, autoclavar e suplementar com tiamina (16 µg/ml) e L-arginia (16 µg/ml)

Tabela X – Soluções e sua composição.

Todas as soluções foram preparadas em água nanopura, água obtida através de um sistema de filtração Milipore com condutividade de 18.2 MΩcm.

Soluções	Composição por litro
TAE	1 L: 242 g Tris-HCl, 57.1 ml ácido acético glacial, 100.0 ml EDTA pH 8.0
TE	1L: 1.21 g Tris-HCl, 0.29 g EDTA, pH 8.0
Sais VB 50X	1 L: 10 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 100 g ácido cítrico monohidratado, 500 g K ₂ HPO ₄ , 175 g NaH ₂ PO ₄ .4H ₂ O
Sais M9 5X	1 L: 64 g Na ₂ PO ₄ .7H ₂ O, 15 g KH ₂ PO ₄ , 2.50 g NaCl, 5 g NH ₄ Cl
Tp. TB	1 L: 23.1 g KH ₂ PO ₄ , 125.4 g K ₂ HPO ₄
PBS	1 L: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na ₂ HPO ₄ , 0.24 g KH ₂ PO ₄ , pH 7.5
Tp. TN	1 L: 6.06 g Tris-HCl, 8.50g NaCl, pH 7.5, armazenar a 4 °C
Tp TGE	1L: 4.54 g Tris-HCl, 100 ml glicerol, 8.30 g EDTA 25 mM, pH 7.5
Tp cit.c	1 L: 7.20 g Tris- HCl, 13.42 g KCL, 2.44 g MgCl ₂ pH = 7.5, 156mg NaN ₃
Tp Fosfato Potássio	1L: 86.60 g K ₂ HPO ₄ , 13.40 g KH ₂ PO ₄ , 30 ml MgCl ₂ 0.1M pH 7.6
Oligoelementos (<i>Trace elements</i>)	1L: 27 g de FeCl ₃ .6H ₂ O, 2g ZnCl ₂ .4H ₂ O, 2g CoCl ₂ .6H ₂ O, 2g Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O, 1g CaCl ₂ .2H ₂ O, 1.3g CuCl ₂ .6H ₂ O, 0.5g H ₃ BO ₃ e 100 ml HCl
Tp Tris-Sucrose	1L : 6.06 g Tris-HCl, 95.58 g sacarose, pH 7.8
Tp. Ames	1L: 120 ml NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O 0.2M, 880 ml Na ₂ HPO ₄ 0.2 M, pH 7.4
Tp. Tris-Glicina	1L: 3.03 g Tris-HCl, 18.77 g glicina, 1 g SDS, pH 8.3
Tp. de transferência	1L: 5.82 g Tris-HCl, 2.93 g glicina, 0.40 g SDS, 100 ml metanol
Tp. TBS	1l: 6.07 g Tris-HCl, 8.77 g NaCl, pH 7.5
Tp. T-TBS	1L: 6.07 g Tris-HCl, 8.77 g NaCl, 1ml Tween , pH 7.5

TABELA XI – Reagentes utilizados, agrupados de acordo com o fornecedor

Fornecedor	Reagentes
Sigma Chemical CO.	Brometo de etídio, NADP ⁺ /NADPH, glucose – 6 fosfato, glucose 6 – fosfato desidrogenase, PSA, TEMED, Citocromo <i>c</i> , MTT, XTT, CTC, DPI, IPTG*, L-arginina*, Tiamina *, 4NQO, 2AA, etoxiresorufina, metoxiresorufina, 3 – Ciano-7-etoxicumarina, Triton X-100, Tergitol, benzonase, Ampicilina, Canamicina, Cloranfenicol
USB Corporation	Tween -20
Bio-Rad	Solução 30% acrilamida /bisacrilamida (29:1), Reagente Bradford, glucose, BSA, azul de comassie
Becton Dickinson and Company	Bacto Agár, bacto agár MacConkey, bacto extracto de levedura, bacto peptona, bacto triptona
Stratagene	Agarose Tipo I
Toronto Research Chemicals Inc.	IQ e NNK.
MercK	Ditionito de sódio, Etanol <i>proanalysis</i> , azida de sódio (NaN ₃)
Roche	Tablets de cocktail de inibidores de proteases
Fluka	Lisozima
BioLabs	Marcador de peso molecular
GE healthcare	<i>illustra™ plasmidPrep MiniSpin Kit</i>
Quiagen	<i>QIAFilter™ Plasmid Midi Kit</i>
Bioline	<i>Hyperladder I</i> (marcador de peso molecular)
Amersnahm	Reagente de quimioluminescência
Santa Cruz	Anticorpo monoclonal anti-CYPOR humano
ECL	Anticorpo secundário anti-ratinho marcado conjugado com peroxidase

* Soluções esterilizadas por filtração através de filtro Dynagárd com poro de 0,2 µM.

TABELA XII – Equipamentos utilizados nos vários procedimentos experimentais

Equipamento	Fornecedor	Técnica
Sistema <i>Gene Pulse™ Controler</i>	Bio Rad	Transformação de Células competentes
Incubadora Model G25 Incubator	New Brunswick	Crescimento de Culturas bacterianas (com e sem indução)
Shaker	Scientific.Inc	
Incubadora Model C24 Incubator		
Centrifuga Hermle Z 233 MK-2	Alfagene	Precipitação de DNA plasmídico
Centrifugas:		
- Heraus Instruments MegaFuge 1.0R – C	Certilab	Obtenção de frações microsossomais
L7-55 Ultracentrifuge	Beckman	
Aparelho de ultrasons <i>Sonics</i>		
Agitador vertical angular multi-funções <i>PTR30</i>	Vibra Cell	
Homogeneizador	Grant Bio	
Espectrofotômetro Hitachi U-2001	Hitachi	Determinação crescimento celular

Espectrofotómetro	Shimadzu	UV-	Shimadzu	Quantificação CYP e CYPOR
2401	2001			
Leitor de Microplas			Anthos Zenyth	Ensaio de redução em células inteiras

MATERIAL:

O material de vidro utilizado na preparação das soluções para a preparação de células competentes foi previamente tratado com 10% (v/v) ácido bromo sulfúrico, durante cerca de 24 horas. Seguidamente, lavou-se o material várias vezes com água destilada, encheu-se o material com água, novamente e autoclavou-se.

Material descartável:

Microplacas de 96 poços Costar (transparente, opaca) e microplacas Greiner (preto, fundo liso). *Microcuvettes* (1 cm largura, 1 ml) e *macrocuvettes* (1 cm largura, 3 ml).