



Pedro Miguel da Silva Antunes

Licenciado em Biologia Marinha e Biotecnologia

**Sistemas bacterianos competentes em
biotransformação humana para estudos
mecanísticos e toxicológicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética
Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Michel Kranendonk - FCM/UNL



Março de 2015



Pedro Miguel da Silva Antunes

Licenciado em Biologia Marinha e Biotecnologia

**Sistemas bacterianos competentes em
biotransformação humana para estudos
mecanísticos e toxicológicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Genética
Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Michel Kranendonk - FCM/UNL

“Sistemas bacterianos competentes em biotransformação humana para estudos mecanísticos e toxicológicos”

Copyright Pedro Miguel da Silva Antunes, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Finalizada esta dissertação, quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram para que mais uma fase da minha formação académica fosse concluída:

Ao Professor Doutor José Rueff, Diretor do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, pela contínua simpatia e atenção revelada.

Ao meu orientador, Doutor Michel Kranendonk, pela oportunidade de realizar a tese sob a sua orientação, por todos os conhecimentos transmitidos, pelas críticas na elaboração da dissertação e pela disponibilidade demonstrada.

À Dr.^a Célia Martins pelo importante auxílio e apoio prestados durante o trabalho experimental. Ao Doutor Sebastião Rodrigues e ao Dr. Bruno Gomes pelo apoio e disponibilidade sempre que dúvidas surgiam.

Agradeço também a todos os investigadores e funcionários do departamento, em especial à dona Lucrecia e à Isabel pela simpatia e carinho sempre demonstrados.

À Inês, minha colega de laboratório e de casa pela amizade e convivência durante todo este ano.

A todos os meus Amigos, os que fiz durante o Mestrado, ao “Tripod”, e ao meu grupo de amigos que me acompanha sempre. Por todas as partilhas, apoio e todos os momentos vividos, importantíssimos não só nesta fase mas como também em todos os momentos da minha vida e que tornaram em especial esta caminhada mais fácil.

À minha namorada Mariana, pelo apoio, paciência, incentivo, e pelo amor e estabilidade que me dá e que faz com que tudo seja mais simples de enfrentar.

Aos meus pais, irmã e avós pelo apoio e amor. De modo especial aos meus pais pelo esforço enorme que fizeram e fazem todos os dias para que possa ter a oportunidade de ter toda esta formação académica.

A Deus, por me desafiar constantemente e dar sempre a força que preciso para enfrentar todas as barreiras.

E a todos os que contribuíram de algum modo para a realização desta dissertação.

Um muito Obrigado a todos.

Resumo

Devido às limitações de sistemas *in vitro* atuais, existe uma necessidade de modelos celulares especializados em mimetizar propriamente a biotransformação humana. Além da aplicação destes novos sistemas na avaliação e estudo de toxicidade químicos, estes sistemas permitem o uso em estudos funcionais e mecanísticos de enzimas de biotransformação humanas.

Nesta dissertação é abordado o desenvolvimento de modelos celulares competentes em enzimas de biotransformação humanas, aplicado na avaliação de um dos principais metabolitos do fármaco antirretroviral Nevirapina (NVP), como também num estudo mecanístico do importante fator proteico na biotransformação humana, a NADPH citocromo P450 oxido-redutase (CPR).

NVP é frequentemente usado no tratamento de HIV-1 e tem sido associado a efeitos adversos como lesões hepáticas e erupções cutâneas severas. Evidências apontam ao envolvimento de citocromos P450 e subsequente sulfonação por sulfotransferases na formação de metabolitos reativos. Contudo, testes padrão *in vitro* não demonstraram evidências de mutagenicidade ou clastogenicidade. Neste estudo, utilizando uma estirpe de *S. typhimurium*, competente na expressão controlável e estável de sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) humana, demonstrou-se mutagenicidade de 12-hidroxi-NVP dependente de SULT1A1.

A enzima CPR está envolvida nas principais reações de biotransformação de xenobióticos, além de interagir com outras proteínas importantes com funções celulares importantes. O mecanismo pelo qual CPR doa elétrões aos seus parceiros redox não é completamente claro. Foi desenvolvido um sistema de *E. coli* para ser aplicado em estudos mecanísticos sobre a doação de elétrões de CPR. Este novo sistema co expressa CPR e heme-oxigenase I (HO-1) humanas, que depende importantemente de CPR, sendo sustentada por sete elétrões doados por cada ciclo enzimático. As condições de cultura foram otimizadas para níveis de expressão CPR/HO-1 aproximados à estequiometria verificada em humanos. Este modelo células foi aplicado no desenvolvimento de um ensaio de cinética de HO-1, focando-se em vários parâmetros para a sua otimização.

Palavras-chave: Nevirapina, Sulfotransferase 1A1, mutagenicidade, biotransformação, NADPH citocromo P450 oxido-redutase, modelos celulares bacterianos competentes.

Abstract

There is an increasing necessity for specialized cell models which recapitulate properly human biotransformation, addressing recognized limitations of currently used *in vitro* systems. Beside their application in the evaluation and study of chemical toxicity, these new systems can be used for functional and mechanistic studies of human biotransformation enzymes.

This thesis reports on the development of human biotransformation competent cell models, applied in the evaluation of mutagenicity of one of the major metabolites of the antiretroviral Nevirapine (NVP) as well as for the purpose of the mechanistic study of an important protein factor in human biotransformation namely NADPH cytochrome P450 oxidoreductase (CPR).

NVP, frequently used in HIV-1 treatment, it has been associated with adverse effects such as liver and skin injury. Evidence supports the involvement of NVP hydroxylation by cytochrome P450 and the subsequent sulfonation by sulfotransferase in the formation of reactive metabolites. However, standard *in vitro* tests have revealed no evidence that NVP is mutagenic or clastogenic. In this study, SULT1A1-dependent mutagenicity of 12-hydroxy-NVP, could be demonstrated, using newly developed *S. typhimurium* strains with controllable and stable sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) expression.

CPR is involved in a large majority of xenobiotic biotransformation reactions, with additional important interactions with proteins involved in other cellular functions. The electron donation mechanism of CPR with its redox partners is not fully understood. A new *E. coli* bacterial system was developed for application in mechanistic studies of CPR electron donation function. This new system co-expresses human CPR with heme-oxygenase I (HO-1) which depends heavily on CPR in its activity, receiving seven electrons per reaction cycle. Culture conditions were optimized in order to approximate CPR/HO-1 expression levels to that verified in humans. Subsequently, the human CPR:HO-1 competent cell model was applied in the development of a HO-1 kinetic assay, focusing on several parameters for its optimization.

Keywords: Nevirapine, Sulfotransferase 1A1, mutagenicity, biotransformation, NADPH cytochrome P450 oxidoreductase, competent bacterial cell models.

Índice Geral

I – Introdução	1
I.1 Biotransformação de xenobióticos	1
I.2 Enzimas envolvidas na biotransformação	3
I.2.1 Citocromo P450	3
I.2.1.1 Ciclo Catalítico de Citocromo P450	4
I.2.2 NADPH citocromo P450 oxido-redutase	5
I.2.2.1 Mecanismo molecular de transferência de elétrons de NADPH citocromo P450 oxido-redutase	6
I.2.3. Heme Oxigenase – Parceiro redox de CPR	8
I.2.3.1 Ciclo Catalítico Heme Oxigenase 1 – Degradação de Heme	8
I.2.4 Sulfotransferases	9
I.2.4.1 Nomenclatura e formas humanas de Sulfotransferases	10
I.2.4.2 Ciclo Catalítico - Sulfonação	10
I.3 Nevirapina e Sulfotransferases	10
I.3.1 – Uso de Nevirapina na terapêutica de HIV-1	10
I.3.2 - Vias metabólicas de ativação de Nevirapina	11
I.4 – Sistemas para estudos toxicológicos e de mutagenicidade	13
I.4.1 Bactérias usadas nos testes de mutagenicidade	14
I.4.1.1 <i>Salmonella typhimurium</i> LT2	15
I.4.1.2 <i>Escherichia coli</i> K12	15
I.4.2 Expressão heteróloga de proteínas humanas	16
I.4.2.1 Estudo molecular do funcionamento de NADPH citocromo P450 oxido-redutase	17
I.4.2.2 Expressão heteróloga de sulfotransferases humanas	17
I.5 Objetivo	18
II - Materiais e Métodos	19
II.1 Materiais	19
II.2 Métodos	23
II.2.1 Cultura bacterianas	23
II.2.1.1 Culturas bacterianas sem indução da expressão heteróloga	23
II.2.1.2 Culturas bacterianas com indução da expressão heteróloga	23
II.2.2 Testes mutagenicidade com estirpes competentes em sulfotransferase 1A1 humana	24
II.2.3 Construção da estirpe de <i>E. coli</i>	24

II.2.3.1	Preparação células competentes de <i>E. coli</i> PD301 para eletroporação.....	24
II.2.3.2	Transformação por eletroporação de <i>E. coli</i> , PD301	24
II.2.4	Caracterização fenotípicas das novas bactérias transformadas.	25
II.2.4.1	Auxotrofia para L-arginina	25
II.2.4.2	Presença de parede lipopolissacarídica incompleta (LPS ^d)	25
II.2.4.3	Confirmação da sensibilidade de detecção de mutagenicidade.....	25
II.2.5	Isolamento membranas das estirpes derivadas de PD301	26
II.2.6	Cultura de células primárias de hepatócitos e de HepG2.....	26
II.2.6.1	Colheita e extração de proteínas totais.....	27
II.2.7	Determinação da concentração proteica	27
II.2.8	Quantificação de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I expressas nas estirpes PD301 e em células primárias de hepatócitos humanos e HepG2.....	28
II.2.8.1	Imunodeteção de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I	28
II.2.8.2	Determinação de conteúdo de NADPH citocromo P450 oxido-redutase pelo ensaio de redução do Citocromo c	28
II.2.9	Ensaio de cinética de heme oxigenase I.....	28
II.2.9.1	Varrimento comprimento de onda de 400-700 nm com Ferro (II) e Ferrozina	28
II.2.9.2	Curva de calibração com diferentes concentrações de Ferro (II)	29
II.2.9.3	Desenvolvimento de ensaios para medição da atividade de heme oxigenase I em amostras membranares bacterianas.....	29
III - Resultados	30
III.1	Ensaio de mutagenicidade de 12-OH-NVP nas estirpes competentes em sulfotransferase 1A1 humana	30
III.2	Desenvolvimento de uma estirpe de <i>E. coli</i> competente em NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I humanas	32
III.2.1	Determinação da estequiometria NADPH citocromo P450 oxido-redutase:heme oxigenase I em células primárias de hepatócitos humanos e células HepG2	33
III.2.2	Construção da estirpe de <i>E. coli</i> competente em NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I	35
III.2.3	Otimização das condições de cultura de expressão heteróloga de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I humanas	36
III.2.4	Caracterização dos preparados membranares relativamente à expressão das proteínas heterólogas.....	39
III.3	Desenvolvimento de um ensaio de medição da atividade de heme oxigenase I com membranas bacterianas	40

III.3.1 Complexo Fe ²⁺ -ferrozina.....	41
III.3.2 Atividade de heme oxigenase I em amostras membranares bacterianas	42
IV - Discussão	46
IV.1 Estudo da bioativação de 12-OH-NVP	46
IV.2 Desenvolvimento de uma estirpe de <i>E. coli</i> competente em NADPH citocromo P450 oxido-reductase e heme oxigenase I humanos	48
IV.2.1 Determinação das quantidades relativas de NADPH citocromo P450 oxido-reductase e heme oxigenase I em células humanas	49
IV.2.2 Otimização das condições de cultura da estirpe de <i>E. coli</i> competente em NADPH citocromo P450 oxido-reductase e heme oxigenase I humanos	50
IV.2.3 Caracterização dos preparados membranares relativamente à expressão das proteínas heterólogas.....	52
IV.3 Desenvolvimento de um ensaio de medição da atividade de heme oxigenase I com membranas bacterianas.....	52
IV.3.1 Complexo Fe ²⁺ - ferrozina	52
IV.3.2 Atividade de heme oxigenase I em amostras membranares bacterianas.....	53
V - Conclusão e perspectivas futuras	57
VI - Referências.....	58
VII - Anexos	66

Índice de Figuras

Figura I.1 – Esquema geral da catálise do citocromo P450 microsomal	4
Figura I.2 – Representação esquemática de CPR e os seus domínios.	5
Figura I.3 – Representação da estrutura de CPR inserida na membrana.....	7
Figura I.4 – Reação de degradação de Heme, catalisada pela enzima Heme-oxigenase.....	9
Figura I.5 - Mecanismo proposto para as erupções cutâneas induzidas e hepatotoxicidade por NVP causadas.....	12
Figura III.1 – Curvas dose-resposta obtidas com as estirpes MA98_SULT1A1 e MA100_SULT1A1	31
Figura III.2 – Curva dose-resposta de 12-OH-NVP com as estirpes MA98_SULT1A1 e TA98 .	31
Figura III.3 – Efeito de PCP sobre 12-OH-NVP e 2NF	32
Figura III.4 - Imunodeteção de CPR e HO-1 presente nas amostras de lisado das células HepG2	34
Figura III.5 - Imunodeteção de CPR e HO-1 presente nas amostras de lisado das células hepatócitos primários humanos (PHH)	35
Figura III.6 - Mutagenicidade de 4-NQO nos candidatos PD301_hHO-1_POR.	36
Figura III.7 – Imunodeteção da expressão de CPR e HO-1 nas amostras membranares	40
Figura III.8 – Via Catabólica de Heme.	41
Figura III.9 – Curva de calibração do complexo Fe^{2+} - ferrozina.	42
Figura III.10 – Aumento em tempo da absorvância a 562 nm em todas as amostras membranares através da formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina	43
Figura III.11 – Varrimento do comprimento de onda entre 400-700 nm da reação com ferrozina e Fe^{2+} , sem NADPH e da reação com ferrozina, Fe^{2+} e com membrana BTC^0 , sem NADPH.....	44
Figura III.12 – Varrimento do comprimento de onda entre 400-700 nm da reação com ferrozina e 30 μ M heme com membrana BTC^0 e NADPH e da reação com ferrozina e 30 μ M heme com membrana PD301_hHO-1_POR e NADPH	45

Índice de Tabelas

Tabela I.1 - Vias gerais da biotransformação de xenobióticos e as principais localizações sub-celulares.	2
Tabela II.1 – Composição das soluções utilizadas	19
Tabela II.2 - Composição dos meios utilizados.....	20
Tabela II.3 - Lista de reagentes utilizados no trabalho experimental, e respetivos fabricantes. 21	
Tabela II.4 - Estirpes de <i>E. coli</i> e de <i>S. typhimurium</i> utilizadas no presente estudo.	22
Tabela II.5 - Plasmídeos utilizados no presente estudo.	22
Tabela II.6 - Estirpes transformadas e os seus respetivos plasmídeos.....	25
Tabela III.1 – Determinação semi-quantitativa da expressão de CPR e HO-1 nas amostras de células de HepG2 e PHH.	34
Tabela III.2 – Otimização das condições de crescimento da estirpe PD301_hHO-1_POR, e resultados de expressão das proteínas CPR e HO-1 e respetivas estequiometrias obtidas	38
Tabela III.3 – Conteúdo de CPR nas amostras membranares de cada estirpe determinados através do ensaio de redução do citocromo c por CPR e através de imunodeteção.....	39
Tabela III.4 – Detecção dos picos máximos de absorvância do complexo Fe ²⁺ - ferrozina, e respetivo coeficiente de extinção (ϵ) em três tampões diferentes, MOPS, fosfato de potássio (K/P) e Tris-Base (Tris).....	41
Tabela III.5 – Descrição dos componentes utilizados em cada abordagem teste de varrimento do espectro a 400-700 nm.	44

Lista de abreviaturas e simbologia:

12-OH-NVP - 12-hidroxi-nevirapina

4-NQO - 4-nitroquinolina-1-óxido

2-NF – 2-nitrofluoreno

ABS – Síndrome de *Antley-Bixler*

ada - Gene envolvido no sistema de indução de reparação de DNA face a agentes alquilantes

Amp - Ampicilina

*b*₅ – citocromo *b*₅

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

Cit. *c* – Citocromo *c*

CO – Monóxido de carbono

Cm - Cloranfenicol

CPR – NADPH Citocromo P450 oxido-redutase

cysDNC - Operação *cysDNC*

CYP - citocromo P450

δ-Ala - Ácido δ-aminolevulínico

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

ε - Coeficiente de absorvidade molar

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FAD - Dinucleotídeo de flavina e adenina

FDA - Food and Drug Administration

FMN - Mononucleotídeo de flavina

g - Aceleração gravítica

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HepG2 – Linha celular de carcinoma de fígado humano

HIV-1 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HO-1 – Heme oxigenase I

NNRTI - Inibidores não nucleosídicos de transcriptase reversa

IC₅₀ – Concentração inibitória

IPTG - Isopropil β-D-tiogalactósido

Kan - Sulfato de canamicina

kDa - KiloDalton

L-arg - L-arginina

LB - Meio de cultura Luria-Bertani

LPS^d - Parede lipopolissacarídica defeituosa (incompleta)

M9 - Meio mínimo de sais e glicose

mucAB – Operação envolvido no sistema de reparação de DNA mutagénico (*error-prone*)

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NB - Meio de cultura Nutrient broth

NVP - Nevirapina

ogt - Gene envolvido na reparação de alquilação de DNA

PAPS - 5'-fosfoadenosina-3'-fosfosulfato

PCP - Pentaclorofenol

PHH – Células primárias de hepatócitos humanos

POR – gene codificante de CPR

PMSF – Fluoreto de metilmetanosulfonil

ptac - Promotor de expressão induzido por IPTG

rpm - Rotações por minuto

S9 - Fração microsomal de fígado de rato

SDS-PAGE - Eletroforese proteica em gel desnaturante de poliacrilamida

SULT - Sulfotransferase

TB - Meio de cultura Terrific broth

Thy - Tiamina

UV - Radiação ultravioleta

uvrA - Gene envolvido no sistema de reparação de DNA por excisão (*error-free*) em estirpes teste BTC

uvrB - Gene envolvido no sistema de reparação de DNA por excisão (*error-free*) em estirpes teste de Ames

VB - Meio de cultura Vogel-Bonner

Δ - Deleção

I – Introdução

I.1 Biotransformação de xenobióticos

Diariamente o ser Humano está exposto a uma panóplia de químicos, designados xenobióticos. Essa exposição, ainda que muitas vezes involuntária, pode ser crónica. Os xenobióticos podem entrar em contacto com o organismo por diversas vias, nomeadamente pela via respiratória, cutânea ou oral. Depois de absorvidos, os químicos podem exercer um efeito local ou podem depois entrar na circulação sistémica ou portal, sendo posteriormente distribuídos para outros tecidos no organismo (Guengerich e MacDonald, 2007; Timbrell, 2009). Alguns destes compostos são muito lipofílicos o que torna a sua absorção mais rápida e consequentemente a eliminação mais complicada, pois conseguem mais facilmente atravessar membranas, acumulando-se no organismo. Após absorção e distribuição, estes compostos são metabolizados, num processo designado biotransformação, a compostos com maior polaridade e maior solubilidade aquosa, facilitando a sua excreção na urina, através da ação dos rins, ou pelo ação do fígado sendo excretados na biliar (Parkinson, 2001).

Os xenobióticos podem exercer uma variedade de efeitos nos sistemas biológicos, que podem ser benéficos como a maioria das drogas terapêuticas, ou resultar em efeitos nocivos. Estes efeitos são dependentes das propriedades físico-químicas dos compostos e muitas vezes, após serem alvo de biotransformação sofrem alteração dos seus efeitos. Assim, um composto considerado tóxico pode perder as suas capacidades reativas e ser excretado (bioinativação ou destoxificação), mas pode também ocorrer o efeito oposto, em que um xenobiótico com menor grau de toxicidade seja transformado a metabolitos ainda mais reativos capazes de interagir com as moléculas celulares (bioativação) (Parkinson, 2001).

A toxicidade potencial de um composto e seus metabolitos é diretamente dependente da sua predisposição em reagir com componentes celulares, mas também da dose em que o composto se encontra na célula ou tecido alvo. Assim, a ação em conjunto da absorção, distribuição, metabolização (biotransformação) e eliminação (“ADME”), vai ditar o potencial toxicológico do composto, no qual a biotransformação tem um papel determinante (Parkinson, 2001; Timbrell, 2009)

A biotransformação dos xenobióticos é o principal mecanismo para manter a homeostase durante a exposição do organismo a compostos estranhos como fármacos (Parkinson, 2001). Geralmente, a biotransformação de xenobióticos é realizada por um número de enzimas com uma grande variedade na especificidade de substratos. Existem diversas formas pela qual um xenobiótico pode ser biotransformado, incluindo reações de oxidação, redução, hidrólise, conjugação, etc. (Parkinson, 2001).

A biotransformação ocorre em diversos tecidos, tendo o seu principal local de ação no fígado, e divide-se em duas fases (Tabela I.1). Na fase I, ocorrem sobretudo reações de redução, oxidação e hidrólise, expondo ou introduzindo um grupo funcional (como por exemplo, – OH, –

NH₂, – SH ou –COOH, entre outros), resultando num pequeno aumento de hidrofiliidade. Na fase I, o sistema enzimático citocromo P450 (CYP) constitui a mais importante enzima de biotransformação (Rendic e Guengerich, 2015). Na fase II da biotransformação, ocorrem reações de glucuronidação, sulfonação, acetilação, metilação e conjugação com glutathione e com aminoácidos. As enzimas para estas reações reconhecem e reagem com os grupos funcionais introduzidos na fase I da biotransformação ou já presentes nos xenobióticos (Parkinson, 2001). Na maior parte das reações de fase II ocorre um grande aumento da hidrofiliidade dos xenobióticos, conduzindo assim à excreção pela urina ou bÍlis, sendo as reações de fase II fundamentais no processo de destoxificação (Parkinson, 2001).

Tabela I.1 - Vias gerais da biotransformação de xenobióticos e as principais localizações sub-celulares. (Adaptado de Parkinson 2001)

Reação	Enzima	Localização
Fase I		
Hidrólise	Esterase	Retículo endoplasmático, citosol, lisossomas
	Peptidase	Lisossomas
	Epóxido hidrolase	Retículo endoplasmático, citosol
Oxidação	Álcool desidrogenase	Citosol
	Aldeído desidrogenase	Mitocôndria
	Aldeído oxigenase	Citosol
	Xantina oxidase	Citosol
	Monoamina oxidase	Mitocôndria
	Diamina oxidase	Citosol
	Prostaglandina H sintetase	Retículo endoplasmático
	Monoxigenases de flavina	Retículo endoplasmático
	Citocromo P450	Retículo endoplasmático
Redução	Azo- e nitro- redução	Microflora, retículo endoplasmático, citosol
	Redução de grupos carbonil	Citosol, retículo endoplasmático
	Redução de pontes dissulfito	Citosol
	Redução de grupos sulfóxido	Citosol
	Redução de quinonas	Citosol
	Desalogenação redutiva	Retículo endoplasmático
Fase II		
Conjugação com glucoronido	UDP-glucuronil transferase	Retículo endoplasmático
Conjugação com sulfato	Sulfotransferase	Citosol
Conjugação com glutathione	Glutathione transferase	Citosol, retículo endoplasmático
Conjugação com aminoácidos	Aminoácido transferase	Mitocôndria, retículo endoplasmático
Acetilação	N-Acetiltransferase	Mitocôndria, citosol
Metilação	Metiltransferase	Citosol, retículo endoplasmático

Existem diferenças inter-individuais ao nível genético e epigenético que determinam a capacidade de metabolização e destoxificação de fármacos e outros xenobióticos, ocorrendo por vezes reações adversas a fármacos (*adverse drug reactions*, ADR). Estas reações consistem numa resposta nociva e indesejada a fármacos em doses normalmente usadas no Homem como profilaxia, diagnóstico ou tratamento de doenças. Uma grande parte destas ADR ocorrem devido à ativação metabólica de fármacos conduzindo à formação de metabolitos reativos (Edwards e Aronson, 2000; Johansson e Ingelman-Sundberg, 2011; Alomar, 2014).

A suscetibilidade individual para a toxicidade química é largamente dependente de polimorfismos genéticos em enzimas de fase I e II da biotransformação, catalisando reações de redução/oxidação e conjugação, respetivamente (Johansson e Ingelman-Sundberg, 2011). As variantes polimórficas de CYP têm sido consideradas uma das mais importantes causas de ADRs (Johansson e Ingelman-Sundberg, 2011). Estes variantes incluem mutações que levam à expressão alterada ou modificações na estrutura e propriedades catalíticas, resultando, por exemplo, em diferentes velocidades de metabolização, podendo ser mais ou menos rápida, ou até quase ausente (Palma et al., 2010). Casos de atividade lenta ou ausente de uma enzima podem resultar na acumulação indesejada do fármaco, podendo despoletar toxicidade e/ou na ativação de outras vias metabólicas (Palma et al., 2010).

Para melhorar o desenvolvimento e o uso seguro de um fármaco, é necessário um aumento no conhecimento dos mecanismos responsáveis pelas ADR. Devido ao seu papel principal nas ADRs, o mecanismo molecular no funcionamento do sistema de CYP tem sido alvo de muitos estudos nos últimos anos. O conhecimento detalhado sobre a biotransformação e as suas enzimas é fulcral na determinação de todas as vias metabólicas de um composto, o que permitirá compreender as diferenças inter-individuais na exposição a químicos, nas ADR, e toxicidade em geral (Palma et al., 2010). O presente estudo teve como foco o desenvolvimento e aplicação de sistemas bacterianos que permitam o estudo do papel de enzimas de biotransformação na bioativação de compostos bem como estudar o mecanismo de interação entre elas.

Nas próximas seções serão abordadas duas enzimas de biotransformação (CYP e Sulfotransferase) além da enzima NADPH citocromo P450 oxido-redutase (CPR) e um dos seus parceiros redox, a heme-oxigenase (HO).

I.2 Enzimas envolvidas na biotransformação

I.2.1 Citocromo P450

Os CYP são hemoproteínas e principais enzimas na catálise da transformação oxidativa de uma diversidade de compostos endógenos e exógenos (Hlavica et al., 2003). CYP requer um parceiro doador de eletrões para desempenhar a sua função. Em eucariotas, os CYP existem ligados à membrana interna das mitocôndrias e catalisam diversos passos na biossíntese de hormonas esteroides, recebendo eletrões do sistema composto pela adrenodoxina em conjunto

com a adrenodoxina redutase (Paine et al., 2005). No entanto, os CYP microsossomais, ligados à membrana do retículo endoplasmático (RE) são os mais abundantes. Em mamíferos, os CYP envolvidos no metabolismo de xenobióticos são expressados maioritariamente no fígado, mas estão presentes em quase todos os tecidos. Os CYP microsossomais são dependentes da atividade do seu parceiro redox, a CPR (Lynch e Price, 2007). As formas de CYP humanas podem ser divididas em 3 grupos, nomeadamente: i) famílias de CYP de importância endógena com grande afinidade para substratos e conservados durante a evolução; ii) famílias com menos afinidade para os seus substratos e com uma menor conservação evolucionária com importância polimórfica; iii) e uma família com funções no metabolismo de ácidos gordos e de xenobióticos (Ingelman-Sundberg, 2004). Os CYP são capazes de metabolizar uma grande variedade de substratos, e são responsáveis por mais de 75% da biotransformação das quatro maiores classes de fármacos prescritos (Guengerich e Isin, 2008).

I.2.1.1 Ciclo Catalítico de Citocromo P450

A reação geral catalisada por enzimas CYP designa-se de monoxigenação, em que ocorre a inserção de um átomo de oxigénio num substrato, sendo o outro reduzido a água (Fig I.1) (Guengerich e Isin, 2008).

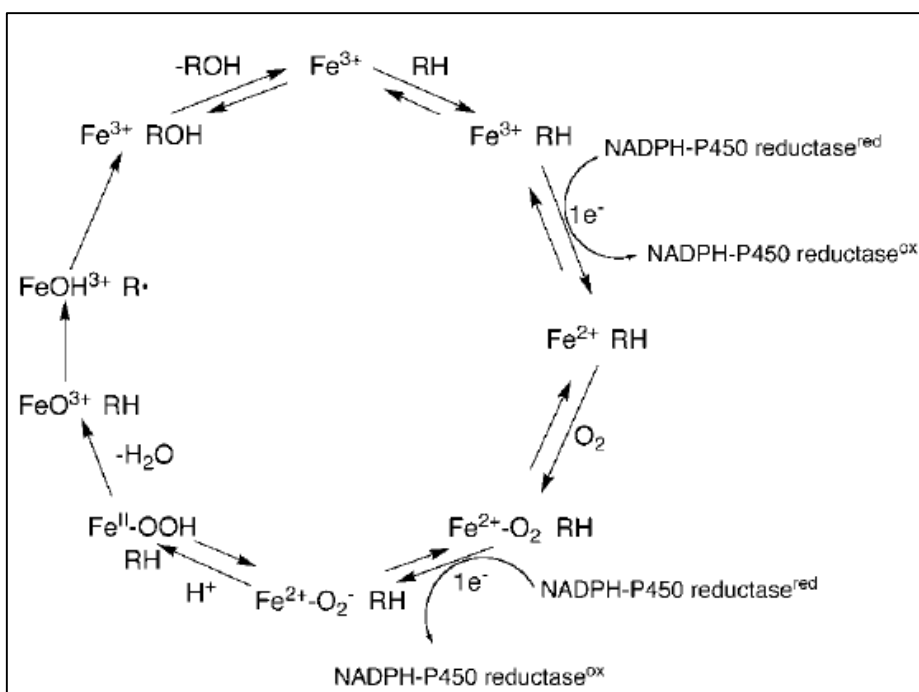


Figura I.1 – Esquema geral da catálise do citocromo P450 microsossomal. (Adaptado de Guengerich e Isin, 2008)

A ligação de um substrato ao local ativo de CYP microsossomal leva a um aumento do potencial redox do grupo heme, permitindo a transferência do primeiro eletrão doado por CPR, e anteriormente obtido de NADPH (Guengerich e Isin, 2008). Deste modo, o ferro hémico é reduzido e o oxigénio liga-se para gerar um intermediário oxi-ferroso (Hamdane et al., 2008).

Uma nova redução ocorre, sendo o segundo eletrão transferido a partir de CPR, ou em alguns casos pelo citocromo b_5 . Neste passo sugere-se que ocorra a formação do complexo $Fe^{2+} - O_2^-$. Em seguida, ocorre um rearranjo do O_2^- , e o oxigénio ativado leva à libertação de uma molécula de água, ocorrendo uma oxidação do substrato e o produto é libertado do local ativo da enzima, voltando assim ao estado inicial (Guengerich e Isin, 2008)

O citocromo b_5 além de estar envolvido nas reações mediadas por CYP na biotransformação, participa também na biossíntese de lípidos como dador de eletrões (Palma, et al. 2013). O estímulo do citocromo b_5 no ciclo catalítico de CYP permanece pouco claro, existindo a dúvida se atua apenas na doação do segundo eletrão da catálise, ou se age alostericamente. Contudo sabe-se que a ação de citocromo b_5 , dependendo das isoformas de CYP e do substrato, é essencial para uma máxima atividade catalítica do complexo de CYP (Porter, 2012). Inclusivamente, parece exercer um efeito compensatório nas capacidades alteradas de variantes polimórficos de CYP, atenuando efeitos de mutações estruturais indicando efeitos alostéricos de b_5 (Palma et al., 2013)

A nomenclatura de CYP é realizada de acordo com a classe de substratos que metabolizam e com base na identidade da sequência de aminoácidos. Os citocromos P450 são nomeados como CYP, seguido pelo número indicando a família de genes (ex. CYP1). A sub-família corresponde à letra maiúscula a seguir ao número da família (ex. CYP1A). E um novo número indica os genes individuais (ex. CYP1A1) (Johansson e Ingelman-Sundberg, 2011).

I.2.2 NADPH citocromo P450 oxido-redutase

A enzima CPR é uma flavoproteína de 78 kDa, que possui domínios distintos para ligação aos seus cofatores (Fig. I.2), o NADPH, uma flavina dinucleotídica (FAD) e uma flavina mononucleotídica (FMN). Além disso, possui um outro domínio de conexão flexível, denominado *hinge*, envolvido na, recentemente descrita, transição entre a conformação aberta e fechada, fundamental na dinâmica proteica de importância para a ligação aos seus parceiros redox, como por exemplo CYP (Hamdane et al., 2009). Por fim, possui um segmento N-terminal que garante a sua orientação na membrana do RE permitindo uma interação alinhada com os seus parceiros redox (Hamdane et al., 2009).



Figura I.2 – Representação esquemática de CPR e os seus domínios. (Adaptado de Vicent, B. et al. 2012)

Polimorfismos de CPR têm sido descritos dos quais, vários variantes são encontrados em pacientes que sofrem da Síndrome de *Antley-Bixler* (ABS) (Moutinho et al., 2012). Esta é uma doença genética autossômica recessiva, caracterizada por deficiências muito severas resultando em malformações esqueléticas e em ambiguidade genital (Ko et al., 2009; Marohnic et al., 2010). A maioria das mutações de CPR relacionados com esta síndrome resultam numa redução de atividade da enzima, estando identificadas algumas mutações no segmento responsável pela ligação do FMN e do FAD (Moutinho et al., 2012). A diminuição da atividade de CPR leva conseqüentemente a atividades reduzidas de enzimas dependentes desta. (Pandey e Sproll, 2014). Grande parte dos estudos relacionados com ABS foram realizados recorrendo a sistemas *in vitro* reconstituídos com as enzimas CPR e CYP. Contudo a maioria utiliza a enzima CPR na forma solúvel (sem a parte N-terminal), o que altera a conformação de CPR influenciando o modo como interage depois com CYP. Além disso, esses sistemas representam rácios de CPR:CYP em favor de CPR, exatamente o contrário do que ocorre *in vivo* (aproximadamente de 1:5-10), levando a resultados pouco significantes para extrapolar para a situação *in vivo* (Moutinho et al., 2012).

CPR está envolvida na maioria das reações associadas ao metabolismo de xenobióticos e fármacos, sendo que o seu principal parceiro redox é o CYP, com quem forma em conjunto o mais importante sistema oxidase do metabolismo de muitos compostos endobióticos e xenobióticos. Além disto, CPR está também envolvido com outras proteínas com importantes funções celulares como por exemplo a síntese de hormonas esteroides, a homeostase e síntese do colesterol ou o catabolismo de heme (Porter, 2012). Para além de CYP, CPR doa também eletrões à monoxigenase do escaleno, à 7-dehidrocolesterol redutase, ao citocromo *b₅*, à heme oxigenase e pode também reduzir o substrato não fisiológico citocromo c (Porter, 2012). Devido à importância de CPR na atividade de inúmeras enzimas e o seu mecanismo de transferência de eletrões para os seus parceiros não ser completamente conhecido, esta é uma área de estudo de grande interesse

1.2.2.1 Mecanismo molecular de transferência de eletrões de NADPH citocromo P450 oxido-redutase

O mecanismo de transferência de eletrões de CPR para os seus parceiros é pouco claro apesar dos vários estudos sobre o tema. Na interação com CYP, sabe-se que NADPH transfere dois eletrões em forma de hídrido (H⁻) para FAD. Este, por sua vez transfere um eletrão de cada vez para FMN. Seguidamente, FMN transfere também um eletrão de cada vez para o parceiro de CPR. Este mecanismo de transferência de eletrões denomina-se de transferência faseada (*gated*) (Hamdane et al., 2009).

Através de várias abordagens experimentais, vários autores (Aigrain et al., 2009; Ellis et al., 2009; Hamdane et al., 2009) verificaram dois tipos de conformação de CPR, designadas de fechada e aberta (Fig. 1.3). Na conformação fechada, as duas flavinas estão em contacto uma com a outra, adequado para uma transferência de eletrões intramolecular. Além disso, o local de

ligação de NADPH encontra-se muito próximo de FAD, enquanto o local de ligação FMN para o parceiro redox fica indisponível (Hamdane et al., 2009; Vincent et al., 2012; Sugishima et al., 2014). Na conformação aberta, verificou-se que a zona de ligação a FMN consegue ficar em contacto com o parceiro redox, pois a zona de ligação a FAD já não cobre o local de ligação entre eles, permitindo a transferência de eletrões intermolecular. Num estudo foi demonstrado que CPR existe em equilíbrio nas duas conformações (Ellis et al., 2009)

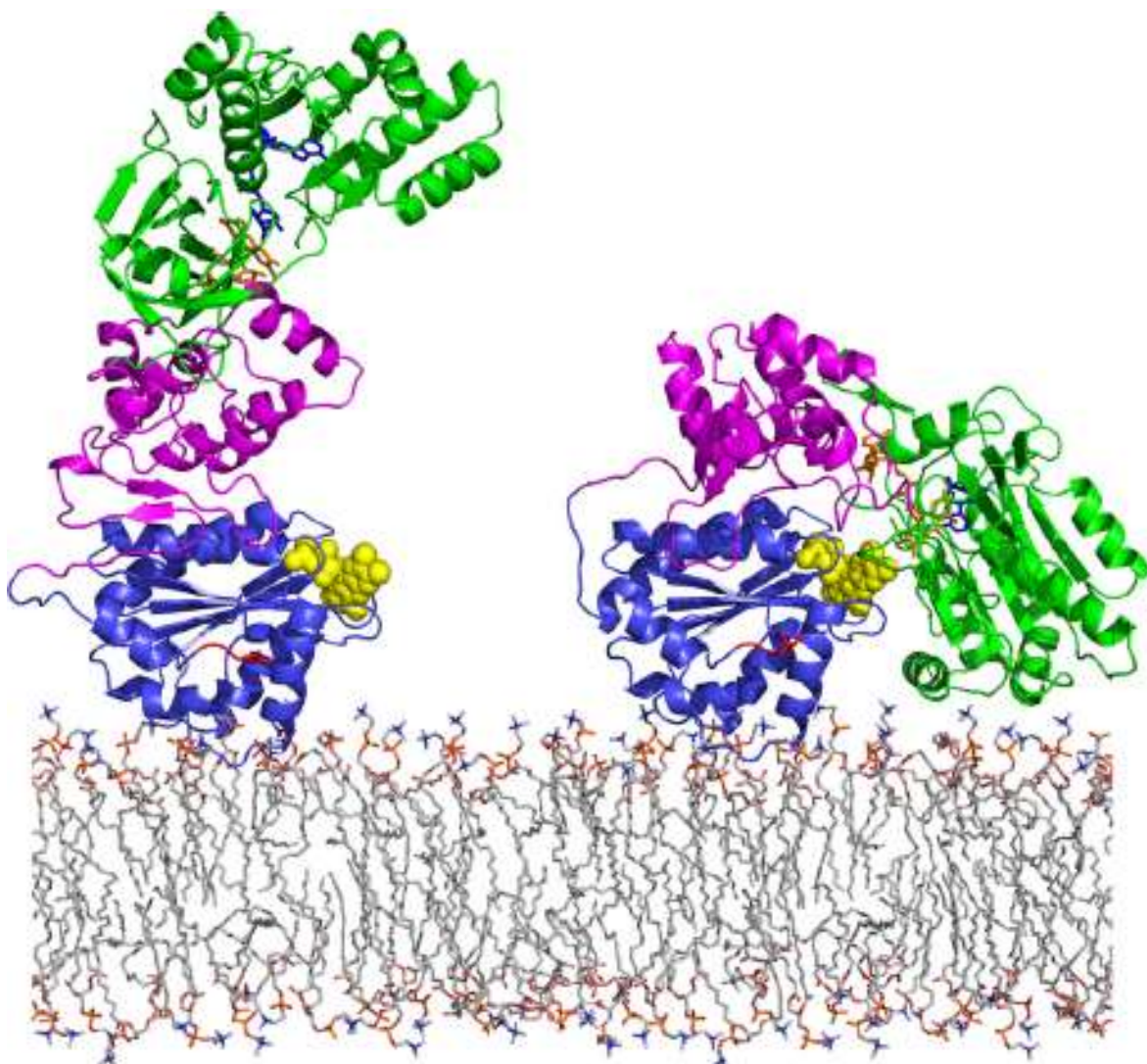


Figura I.3 – Representação da estrutura de CPR inserida na membrana, com as conformações aberta (esquerda), em que FMN está livre para que o parceiro de CPR se possa ligar; e fechada (direita), em que CPR apresenta uma forma mais compacta, estando as duas flavinas em contacto e FMN “cercado” sem possibilidade do parceiro redox se conectar. FMN – amarelo; FAD – laranja; NADPH – azul; Domínio de ligação – verde; *Hinge* – Mangenta. (Adaptado de Ellis, J. et al., 2009)

Atualmente considera-se que seja necessário ocorrer uma grande alteração conformacional em CPR durante todo o processo de transferência de eletrões. Pensa-se que esta alteração de conformação é possibilitada pela presença da estrutura *hinge*, (que funciona

como uma dobradiça) que viabiliza que a zona de ligação a FMN rode sobre a parte C-terminal da dobradiça, levando a um rearranjo drástico que separa as flavinas, conduzindo à conformação aberta para a interação com o parceiro redox (Ellis et al., 2009; Hamdane et al., 2009; Vincent et al., 2012). Estas observações acerca do mecanismo de funcionamento de CPR levantam novas questões. Uma das questões que continuam por responder é, que fatores estão envolvidos e o que conduz à alteração de conformação e o porquê deste acontecimento? Uma vez que tantas enzimas dependem do funcionamento de CPR, qual o motivo da natureza ter modulado a transferência de elétrons apenas um de cada vez, quando aparentemente o mais lógico seria uma transferência de todos os elétrons necessários de uma só vez?

Neste trabalho, vai abordar-se a interação entre CPR e um dos seus parceiros redox, a enzima heme-oxigenase, recorrendo-se ao desenvolvimento de um sistema *in vitro*. Para isto vai ser utilizado um sistema bacteriano com expressão heteróloga (abordado em pormenor na seção I.4 mais à frente) destas duas enzimas humanas em condições fisiologicamente relevantes.

I.2.3. Heme Oxigenase – Parceiro redox de CPR

A enzima heme oxigenase (HO) catalisa a degradação de heme em monóxido de carbono (CO), ferro livre e biliverdina (Yoshida e Migita, 2000). Esta enzima possui importantes propriedades antioxidantes, quer pela capacidade de prevenção da formação de espécies reativas de oxigénio através da remoção de heme livre, quer pelas características dos metabolitos formados através da sua ação, pois cada um deles possui importantes funções fisiológicas. O CO é um potente vasodilatador e possui efeitos anti-inflamatórios. A biliverdina é convertida em bilirrubina cujo potencial antioxidante é elevado. O ferro libertado é amplamente reciclado e importante para a homeostase do ferro no organismo dos mamíferos (Wang e de Montellano, 2003; Huber e Backes, 2007; Huber et al., 2009).

Existem duas isoformas conhecidas de HO, encontrando-se ambas ligadas ao retículo endoplasmático (RE). A heme oxigenase I (HO-1), a forma induzível, com cerca de 33 kDa, que é expressada principalmente no fígado e baço e é induzida por uma série de estímulos, como porfirinas e reações inflamatórias (Wang e de Montellano, 2003; Huber e Backes, 2007). Existe também a forma expressada constitutivamente, a heme oxigenase II (HO-2), encontrada principalmente no cérebro e testículos, cuja função principal se propõe ser a produção de CO no cérebro (Yoshida e Migita, 2000; Huber e Backes, 2007).

I.2.3.1 Ciclo Catalítico Heme Oxigenase 1 – Degradação de Heme

A degradação de heme pela HO-1, envolve três passos, consumindo três moléculas de oxigénio e sete elétrons (Fig. I.4), doados um a um, pelo seu parceiro redox, a enzima CPR. No primeiro passo ocorre a formação do complexo HO-1-heme férrico, levando à oxidação de heme férrico em α -meso-hidroxiheme, no qual é consumida uma molécula de oxigénio e dois elétrons. O α -meso-hidroxiheme férrico é depois convertido em verdeheme ferroso, sendo consumida mais uma molécula de oxigénio e dois elétrons e na qual ocorre a libertação de CO. Por fim, o

verdeheme é convertido em biliverdina, sendo consumida mais uma molécula de oxigénio e três eletrões, ocorrendo a libertação de ferro. (de Montellano, 2000; Wang e de Montellano, 2003; Reed et al., 2010).

O facto de CPR interagir com HO-1, pode indicar que esta última possui uma interface semelhante a CYP, onde CPR se liga (Huber et al., 2009). Além disso, enquanto CPR doa apenas dois eletrões a CYP por cada ciclo de reação, doa sete à reação catalisada por HO-1. Partindo do princípio que o modo de transferência de eletrões ocorre de forma semelhante tanto para HO-1 como para CYP, o estudo da interação CPR-HO-1 em ambiente membranar é um complexo enzimático interessante, permitindo tirar conclusões acerca de toda a dinâmica de CPR com várias outras enzimas, especialmente com foco no sistema de CYP (Huber et al., 2009)

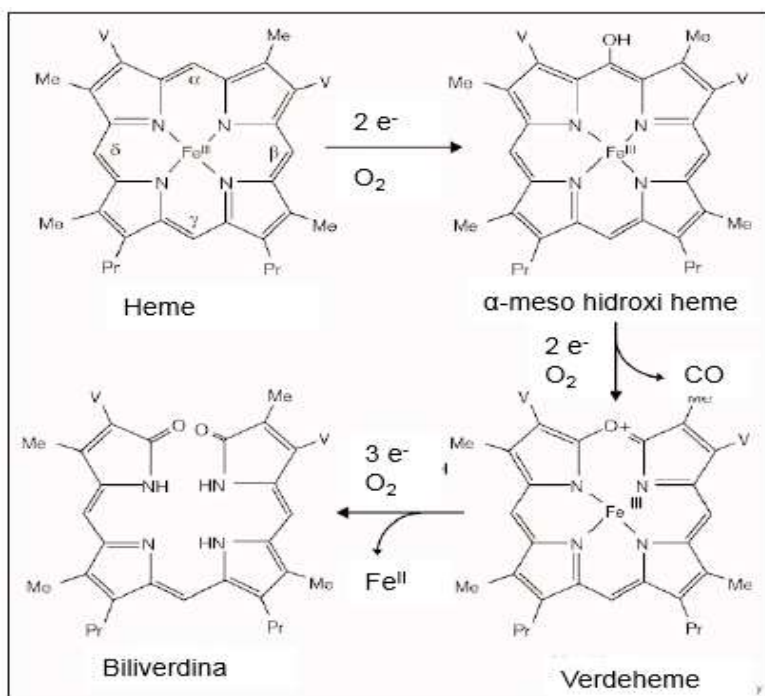


Figura I.4 – Reação de degradação de Heme, catalisada pela enzima Heme-oxigenase. (Adaptado de de Montellano, 2000).

I.2.4 Sulfotransferases

As sulfotransferases (SULTs) são enzimas da fase II da biotransformação, responsáveis pela transferência de um grupo sulfato para regiões nucleofílicas dos seus substratos endógenos ou xenobióticos, a partir do seu cofator 5'-fosoadenosina-3'-fososulfato (PAPS) (Klaassen e Boles, 1997; Glatt e Meinl, 2004a). Existem duas classes de sulfotransferase, as SULTs citosólicas, que são responsáveis pela metabolização de xenobióticos e pequenos compostos endógenos. E outra classe de SULTs membranares, localizadas no Complexo de Golgi, que são

responsáveis pela sulfonação de macromoléculas endógenas, afetando as suas características funcionais e estruturais (Glatt et al., 2000; Gamage et al., 2006).

I.2.4.1 Nomenclatura e formas humanas de Sulfotransferases

As SULTs são classificadas consoante o grau de similaridade na sequência nucleotídica ou cDNA, sendo que existe apenas uma superfamília de genes destas enzimas (Glatt e Meinl, 2004a). Relativamente à classificação, um primeiro número após o nome da superfamília refere-se à família (ex. SULT1). A subfamília é indicada pela letra maiúscula depois desse número (ex: SULT1A), sendo os genes individuais indicados pelo número que sucede à subfamília (ex: SULT1A1). No caso de diferentes isoformas, usa-se uma letra minúscula no final (ex: SULT1A1b) (Glatt et al., 2000).

Conhecem-se 10 formas de SULTs humanas, no entanto, apenas, três formas, nomeadamente, SULT1A1, SULT1A3 e SULT2A1, e posteriormente SULT1E1, estão bem caracterizadas em relação à sua distribuição nos tecidos e especificidade de substrato. Ao contrário destas, as restantes, 6 foram descobertas mais tarde (Glatt et al., 2001).

I.2.4.2 Ciclo Catalítico - Sulfonação

O processo de sulfonação mediado por SULTs é um passo terminal comum na fase II do metabolismo dos xenobióticos, sulfonando os grupos hidroxilo, amino, tiol e N-óxidos, gerando normalmente grupos sulfato, sulfamato e tiosulfato (Nowell e Falany, 2006). Embora esteja normalmente associada à detoxificação, a sulfonação de um átomo de oxigénio de certos substratos, pode conduzir à formação de catiões eletrofílicos de vida curta, devido à facilidade de quebra heterocíclica do grupo sulfato (Glatt, 1997). O átomo de oxigénio pode advir dos compostos que foram absorvidos, ou ser introduzido após reações da fase I da biotransformação, designadamente hidroxilação por CYP (Glatt, 2000). Os produtos eletrofílicos formados conseguem ligar-se covalentemente a macromoléculas celulares, como por exemplo o DNA, representando assim uma importante via de bioativação. (Glatt et al., 1995; Glatt e Meinl, 2004a). Um dos compostos que têm sido associados a toxicidade devido à formação de produtos eletrofílicos, aparentemente por sulfonação é o fármaco Nevirapina (NVP), sendo que no presente trabalho se irá incidir no estudo de mutagenicidade de NVP abordando o papel de SULT.

I.3 Nevirapina e Sulfotransferases

I.3.1 – Uso de Nevirapina na terapêutica de HIV-1

Nas últimas três décadas foram desenvolvidos mais de trinta e cinco terapias anti-HIV-1 para uso em humanos, ocorrendo uma evolução de tratamentos mono terapêuticos para regimes de terapias antirretrovirais altamente ativas (*highly active antiretroviral therapy*, HAART), combinando várias drogas. Isto conduziu a um importante impacto no tratamento da doença,

tornando-a cada vez mais uma doença crónica em vez de infeção letal (Michaud et al., 2012). Contudo, a dificuldade dos regimes de tratamentos associada à presença de toxicidade nos fármacos utilizados e à crescente resistência do vírus aos fármacos têm reduzido o êxito destas terapias (Hartman e Buckheit, 2012).

A NVP foi o primeiro inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa (NNRTI) aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Esta droga é efetiva tanto no uso em terapia combinada anti HIV-1 como em monoterapêutica, principalmente devido à grande eficácia na prevenção da transmissão vertical do vírus (de mãe para filho), e também devido ao preço acessível é dos mais usados em países em desenvolvimento (Caixas et al., 2012) (World Health Organization, 2010).

Apesar da eficácia de NVP, têm sido reportados efeitos adversos associados ao seu uso crónico em tratamentos, sendo que a suscetibilidade individual a esses efeitos diferem entre pacientes (Michaud et al., 2012). Vários estudos descreveram casos de erupção cutânea severa, sendo estes os efeitos adversos mais comuns, mas também casos, que se podem revelar fatais, de hepatotoxicidade grave. Sendo que por este motivo, a FDA incluiu a NVP na lista de fármacos com risco de hepatotoxicidade (“*black label*”) (FDA, 2000).

I.3.2 - Vias metabólicas de ativação de Nevirapina

Estudos recentes indicam que durante a metabolização de NVP ocorre a formação de metabolitos eletrofílicos reativos que ao reagirem com proteínas e macromoléculas podem conduzir a toxicidade (Chen et al., 2008). Em estudos de metabolização *in vivo*, verifica-se que NVP é hidroxilada por diferentes CYP, aos produtos 2-, 3-, 8- e 12-hidroxi NVP. Estes metabolitos sofrem maioritariamente glucoronidação e são eliminados na urina (Erickson et al, 1999; Riska et al, 1999). A via metabólica de 12-hidroxi-NVP (12-OH-NVP) é apontada como a responsável pela hepatocarcinogenicidade e também pelas erupções cutâneas severas (Antunes et al., 2008; Chen et al., 2008). Contudo, o metabolito 12-OH-NVP, formado por ação do CYP3A4 não é quimicamente reativo, por isso acredita-se que reações de fase II da biotransformação estejam envolvidas na bioativação de NVP (Zanger e Schwab, 2013).

Em 2008 foi sugerido que a formação de um intermediário reativo quinona-metídeo seria o responsável pelos efeitos adversos causadas por NVP. Sabe-se que este intermediário pode ser formado diretamente através de 12-OH-NVP por ação de CYP, ou pela sulfonação de 12-OH-NVP a 12-sulfoxi NVP (Fig. I.5), que ao perder espontaneamente o sulfato, resulta na formação do intermediário quinona-metídeo (Chen et al., 2008; Wen et al., 2009).

Num estudo em pacientes tratados com NVP, foram encontrados aductos nas proteínas do sangue, nomeadamente a albumina sérica e hemoglobina. A formação destes aductos envolve a ligação a resíduos de cisteína, lisina, histidina ou de valina, presente na parte N-terminal destas proteínas. Contudo, neste estudo foi usado uma molécula mimética de 12-OH-NVP, o 12-mesiloxi-NVP (Caixas et al., 2012; Antunes et al., 2013; Meng et al., 2013).

Atualmente, depois de estudos do grupo do doutor Jack Utrecht com roedores e com homogenatos de células de pele de humanos e de ratos, sabe-se que o intermediário quinona-metídeo, quando formado diretamente pela oxidação de 12-OH-NVP por CYP, possui o potencial para se ligar covalentemente a proteínas do fígado. No entanto não foi ainda possível demonstrar que esta é a causa das lesões hepáticas provocadas por NVP (Sharma et al., 2012; Sharma et al., 2013). Observou-se também que o quinona-metídeo também pode ser formado pela perda de sulfato de 12-sulfoxi-NVP que se liga covalentemente a proteínas da pele, onde se encontram queratinócitos que expressam uma variedade de enzimas, entre elas SULTs (principalmente SULT1A1). Pensa-se que esta reação com proteínas da epiderme conduz a uma resposta autoimune resultando nas erupções cutâneas detetadas (Sharma et al., 2013). Na figura I.5, está representado o mecanismo proposto de indução de erupções cutâneas por NVP, tal como a via proposta para a hepatotoxicidade.

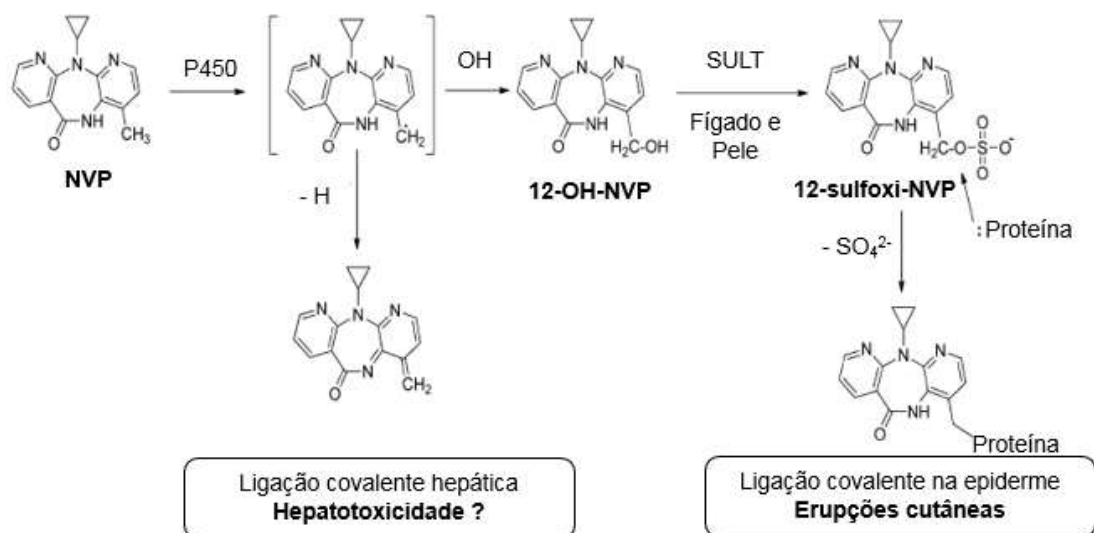


Figura I.5 - Mecanismo proposto para as erupções cutâneas induzidas por NVP resultantes da ligação a 12-sulfoxi e via proposta para a causa da hepatotoxicidade. (Adaptado de Sharma, et al., 2013)

NVP induz hepatocarcinogenicidade em roedores (Anonymous, 2009), e estudos epidemiológicos indicam que fármacos antirretrovirais da classe NNRTI, a que NVP pertence, estão ligados ao aparecimento de câncros não relacionados com HIV-1 (Powles et al., 2009). No entanto, este facto nunca foi comprovado em ensaios *in vitro* convencionais para deteção de mutagenicidade. Isto pode dever-se a estes ensaios utilizarem sistemas metabólicos exógenos, sendo os intermediários reativos sulfonados gerados externamente. Por serem muito polares e muito reativos, a capacidade em penetrar nas células alvo é limitada (Glatt et al., 2001). O grupo do doutor Hansruedi Glatt desenvolveu estirpes de Ames competentes na expressão de SULT1A1, contribuindo para a deteção de mutagenicidade deste tipo de compostos, contudo estes sistemas possuem algumas desvantagens. Uma ex-aluna do mestrado em Genética Molecular e Biomedicina, Dr^a. Mónica Alves, desenvolveu variantes melhoradas dessas estirpes, obtendo um sistema válido na deteção de mutagenicidade (Alves, 2013). No presente estudo,

primeira parte experimental visa complementar esse estudo iniciado anteriormente, com a finalidade de confirmar o papel de SULT1A1 na bioativação do metabolito de NVP, 12-OH-NVP.

I.4 – Sistemas para estudos toxicológicos e de mutagenicidade

Com o crescente número de xenobióticos a que o homem está exposto, quer a nível terapêutico, alimentar ou ambiental, torna-se cada vez mais necessária a existência de ferramentas de estudos toxicológicos e mutagénicos fidedignos que permitam extrapolação dos dados para humanos e que permitam estudar a mecanística das enzimas envolvidas na biotransformação dos xenobióticos (Hashizume et al., 2009).

Existem diferentes abordagens para avaliar toxicidade, testes *in vivo*, *in silico* e *in vitro*. Cada sistema possui vantagens e desvantagens e por isso, dependendo do tempo de execução, do custo e da complexidade do ensaio, um tipo de teste pode ser mais adequado que outro ou até essencial para complementar outro (Collins et al., 2008)

Os sistemas *in silico* recorrem a *softwares* que consideram múltiplos alvos numa mesma avaliação, permitindo o estudo das propriedades farmacocinéticas de drogas através do uso de modelos validados de relações de estrutura-atividade e relações quantitativas de estrutura-toxicidade, entre muitos outros modelos (Valerio, 2011). Esta abordagem é utilizada sobretudo no desenvolvimento de fármacos centrado na estrutura. Por ser *in silico* é usada maioritariamente como ferramenta adicional de estudos *in vivo* e *in vitro*, auxiliando por exemplo no estudo e seleção de moléculas no processo de descoberta de fármacos (Semple et al., 2005)

Estudos *in vivo* em mamíferos, por exemplo em ratinhos, fornecem dados importantes sobre a avaliação do risco e segurança dos fármacos antes da exposição a humanos, mas devido à heterogeneidade na biotransformação entre espécies torna difícil a extrapolação desses resultados para humanos (Timbrell, 2009). Além disto, o elevado custo de ensaios *in vivo* e a legislação, aplicada pela União Europeia, que visa substituir, reduzir e aperfeiçoar este tipo de abordagem, leva à urgência em desenvolver novos sistemas *in vitro* fidedignos na avaliação dos efeitos de toxicidade dos xenobióticos (Timbrell, 2009).

Os sistemas *in vitro* possuem diversas vantagens, nomeadamente, custos mais reduzidos e permitem mais resultados num menor espaço de tempo. Estes sistemas permitem aumentar o conhecimento sobre os mecanismos de indução de toxicidade ou mutagenicidade por uma droga ou xenobióticos em geral, ultrapassando as várias limitações de heterogeneidade na biotransformação relativamente ao uso de animais de laboratório (Davila et al., 1998). Contudo, existem desvantagens nestes sistemas. Sendo a mais importante, a ausência ou reduzida capacidade de biotransformação, que embora possa ser ultrapassada pela adição de sistemas metabólicos, a metabolização vai ocorrer sempre externamente, dificultando o contato dos metabolitos reativos formados com os seus alvos intracelulares (Kranendonk et al., 2000). Entre os sistemas *in vitro* para avaliação de toxicidade e mutagenicidade, os tipos celulares mais utilizados são:

- Os sistemas de células de mamífero, nomeadamente células primárias de hepatócitos e linhas de hepatoma, que se revelam importantes numa abordagem sobre a compreensão do metabolismo de compostos químicos no fígado. As células primárias de hepatócitos humanos possuem a grande vantagem de refletirem as reações de biotransformação que ocorrem *in vivo*, contudo, a expressão das enzimas neste tipo de células vai diminuindo rapidamente a partir do momento em que é iniciada a cultura destas. Isto associado ao custo, à escassez deste tipo de células primárias e ao facto de a sua manutenção ser tecnicamente exigente, torna muitas vezes o seu uso desfavorável (Timbrell, 2009). No que diz respeito às linhas celulares de hepatoma humano, como é o caso de HepG2, por serem linhas celulares imortalizadas, proliferam indefinidamente e podem ser congeladas e reutilizadas quando necessário. No entanto são indiferenciadas, limitando assim a capacidade de biotransformação destas células (Valentin-severin et al., 2003)
- Os sistemas bacterianos, que são o tipo de células mais utilizadas, apresentam diversas vantagens, nomeadamente o baixo custo, possibilidade de obtenção de muitos resultados num curto espaço de tempo e facilidade na utilização e manipulação genética. No entanto, não possuem capacidades de biotransformação (Kranendonk et al., 2000). Além disso, antes do uso destes sistemas, devem ser completamente caracterizados em relação às propriedades enzimáticas de determinada bactéria (Davila et al., 1998).

Dentro dos testes de toxicidade *in vitro*, incluem-se os testes de mutagenicidade. Pelas vantagens que o uso de células bacterianas apresenta, é frequente aplicar os ensaios de mutagenicidade em sistemas bacterianos (Kranendonk et al., 2000). Além disso, com os avanços de técnicas que permitem a manipulação genética, é possível a expressão heteróloga de enzimas de biotransformação de mamíferos, especialmente humanas, em sistemas *in vitro*, quer sejam bacterianos ou de mamíferos. (Parkinson, 2001), o que permite um melhoramento na performance dos ensaios toxicológicos e de mutagenicidade (Kranendonk et al., 2000), tal como o desenvolvimento importantes ferramentas para o estudo mecanístico nas enzimas de biotransformação envolvidas. As próximas seções incidirão no uso de sistemas bacterianos competentes em enzimas de biotransformação humanas como abordagem para estudos de mutagenicidade.

I.4.1 Bactérias usadas nos testes de mutagenicidade

As estirpes de bactérias mais comumente usadas no desenvolvimento de sistemas celulares para testes de mutagenicidade são as *E. coli* e *S. typhimurium*. Estas possuem algumas características específicas importantes que levam à capacidade de deteção de mutagenicidade altamente sensível (Kranendonk et al., 2000)

I.4.1.1 *Salmonella typhimurium* LT2

O teste de mutagenicidade de Ames permite a identificação de substâncias que causam danos genéticos que levam a mutações. Este teste usa bactérias de *S. typhimurium* com várias mutações pré-existentes, que resultam em auxotrofia para histidina e no aumento de sensibilidade na detecção de mutagenicidade. Estas estirpes são incapazes de crescer em meio sem histidina a menos que mutagênicos químicos ao introduzirem lesões no DNA causem a reversão da mutação pré-existente, permitindo restaurar a função dos genes responsáveis pela síntese de histidina (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000). O teste de Ames utiliza várias estirpes de *S. typhimurium* e estas têm diferentes eventos de reversão da auxotrofia. (Tabela I.2),

Mutações adicionais nestas estirpes levam a que sejam mais sensíveis na detecção de mutagenicidade:

- Deleção do gene *uvrB*, que inativa o mecanismo de reparação por excisão de bases, permitindo o aumento de mutações no DNA (Mortelmans e Zeiger, 2000)
- Mutação no operão *rfa* (*rfa*⁻) que origina camada lipopolissacarídica deficiente (LPS^d), tornando a parede celular bacteriana mais permeável, aumentando a sensibilidade na detecção de mutagenicidade, pois certos compostos volumosos (como por exemplo compostos policíclicos) possuem penetrabilidade limitada na parede de células *wild-type* (Mortelmans e Zeiger, 2000)
- Introdução do plasmídeo pKM101, aumentando a detecção de mutagenicidade por via da ativação do sistema de reparação de DNA mutagênico (*error prone*) devido à presença do operação *mucAB* (Mortelmans e Zeiger, 2000)

Tabela I.2 – Genótipo das estirpe teste de *S. typhimurium* mais utilizados e eventos de reversão de mutação respetivos. (Adaptado de Mortelmans e Zeiger 2000)

Estirpe	Mutação operão de histidina	Evento de reversão	Genótipo		
			<i>uvrB</i>	<i>rfa</i>	pKM101
TA 1535	hisG46	Substituição de bases	-	-	-
TA100					+
TA 1538	hisD3052	<i>Frameshift</i>	-	-	-
TA 98					+

I.4.1.2 *Escherichia coli* K12

Kranendonk e colaboradores têm vindo a desenvolver vários sistemas de *E. coli* com uma elevada capacidade na detecção de mutagenicidade. O alvo genético destas estirpes é a auxotrofia de arginina, que pode ser revertida para prototrofia deste aminoácido através de mutações por substituições de bases (por todos os tipos possíveis de transição e transversão)

(Kranendonk et al., 1996). Além disto, esta estirpe possui outras características importantes para uma sensibilidade aumentada na detecção de mutagenicidade, nomeadamente:

- Mutação no operão *rfa* (*rfa*) que origina camada lipopolissacarídica deficiente (LPS^d), aumentando permeabilidade da parede celular e conseqüentemente a sensibilidade a mutagénios (Duarte et al., 2005)
- Mutação no gene *uvrA*, que se traduz na eliminação da capacidade na reparação do DNA por excisão (*error-free*) (semelhante à deleção do gene *uvrB* nas estirpes de *S. typhimurium*).
- A presença do plasmídeo pLCM contendo o operão *mucAB* que resulta num aumento da frequência de mutações no DNA devido ao aumento do sistema de reparação de DNA mutagénico (*error-prone*) (Kranendonk et al., 1998).
- Genes *ada* e *ogt* inativados, que codificam enzimas de reparação de DNA alquilado. Isto resultará no aumento de sensibilidade de detecção de agentes alquilantes de DNA (Duarte et al., 2005).
- Sistema bi-plasmídeo para expressão heteróloga de proteínas humanas (Kranendonk et al., 1999a).

I.4.2 Expressão heteróloga de proteínas humanas

A maioria dos sistemas celulares usados em testes de mutagenicidade não são, ou perderam a competência de biotransformação. Uma das opções para ultrapassar este problema, e que contribuiu substancialmente para o sucesso destes sistemas, foi a adição de sistemas metabólicos, como é exemplo o extrato de fígado de rato (S9). Contudo, estes sistemas apresentam algumas desvantagens, nomeadamente, a detecção limitada de intermediários altamente reativos com tempo de vida curta, pois a ativação destes ocorre fora da célula pelas enzimas presentes em S9, limitando o contato com o alvo genético no interior das células. Além disso, como a maioria destes sistemas provém de roedores, pode não refletir os padrões metabólicos humanos de biotransformação dos compostos (Kranendonk et al., 2000).

De forma a ultrapassar estas limitações, recorreu-se à expressão heteróloga de enzimas de biotransformação humanas, através da clonagem de cDNA dessas proteínas por técnicas de DNA recombinante em sistemas de bactérias, de leveduras e de células de mamíferos. Este método permite a expressão das enzimas humanas diretamente na célula alvo, aumentando a sensibilidade na detecção de mutagenicidade (Kranendonk et al., 2000). A expressão heteróloga em bactérias possui diversas vantagens, contudo está limitada maioritariamente a enzimas em que as atividades catalíticas não sejam dependentes de modificações pós-transducionais, como por exemplo fosforilações e glicosilações (Cain et al., 2014) Foram já expressas as enzimas de biotransformação de fase I, os CYP, e de fase II, as N-acetil-transferases (NATs), glutationa-S-transferases (GSTs), sulfotransferases (SULTs) e UDP-glucoroniltransferase (UGT) (Kranendonk et al., 2000; Zhang et al., 2012)

A estirpe *E. coli* PD301, desenvolvida por Kranendonk e colaboradores permite a expressão heteróloga controlada das enzimas CYP, de CPR, o que possibilitou ao longo dos anos a aplicação em estudos de deteção de químicos mutagénios (semelhante ao sistema desenvolvido por Ames), e em estudos mecanísticos relacionados com o sistema enzimático CYP na biotransformação, permitindo por exemplo estudos do efeito dos polimorfismos de CPR relacionados com a síndrome ABS e o efeito do citocromo *b₅* em CYP (Duarte et al., 2005; Moutinho et al., 2012; Palma et al., 2013). A principal característica deste tipo de sistemas em relação a outros grupos de investigação foca-se no facto da expressão heteróloga de proteínas respeitar a estequiometria que se verifica *in vivo*. Para tirar conclusões acerca do funcionamento, como sistema, das proteínas expressas é importante manter o máximo possível as condições fisiológicas (Moutinho et al., 2012). Uma estequiometria que não reflita essas condições resultará em cinéticas enzimáticas irrelevantes quando extrapoladas para situações *in vivo* em humanos.

I.4.2.1 Estudo molecular do funcionamento de NADPH citocromo P450 oxido-redutase

A estirpe de *E. coli*, PD301, possibilita a expressão de CPR e CYP humanos através de um sistema bi-plasmídeo (Kranendonk et al., 1999a). Esta co-expressão é obtida com proteínas completas (não truncadas) e possibilita a correta expressão, máxima atividade e correta ancoragem à membrana de ambas as enzimas, permitindo a transferência de eletrões de CPR para CYP, e refletindo a estequiometria encontrada em microsomas de fígado humano (Kranendonk et al., 1998; Kranendonk et al., 1999b). A co-expressão é possível devido ao facto dos plasmídeos usados serem de classes diferentes (permitindo a co-existência de ambos os plasmídeos na mesma célula), com número de cópias diferentes e devido à diferença de promotores aplicados. No presente estudo, a segunda fase do trabalho, incidiu no desenvolvimento de uma nova estirpe PD301 que contém a co-expressão de CPR e HO-1 humanos (em vez de CYP).

I.4.2.2 Expressão heteróloga de sulfotransferases humanas

As estirpes de *S. typhimurium*, de Ames, têm sido utilizadas para a expressão heteróloga de SULTs humanas, o que tem permitido a caracterização da sua ação nas vias de bioativação de muitos compostos (Glatt e Meini, 2004b). O desenvolvimento destes sistemas de testes de mutagenicidade permite uma elevada sensibilidade na deteção de compostos bioativados por SULTs.

Estudos demonstraram que de entre todas as SULTs, a enzima SUL1A1 humana é a que consegue metabolizar uma maior variedade de substratos. Esta enzima possui uma expressão mais elevada no fígado, sendo que possui níveis de expressão baixa em vários tecidos extra-hepáticos (Glatt e Meini, 2004a).

As estirpes de *S. typhimurium* utilizadas na primeira fase deste estudo foram desenvolvidas pela Dr^a. Mónica Alves durante o estudo do papel de SUL1A1 na bioativação do antirretroviral NVP (Alves, 2013). Recorrendo a estirpes obtidas de Ames, a TA1535 e TA1538 e

ao vetor de expressão de SULT1A1 obtido de Glatt, desenvolveu as estirpes MA100_SULT1A1 (comparável da estirpe TA1535, mas expressando SULT1A1) e MA98_SULT1A1 (comparável da estirpe TA1538, mas expressando SULT1A1), ultrapassando algumas desvantagens das estirpes originais.

I.5 Objetivo

Esta dissertação aborda a aplicação e desenvolvimento de sistemas teste bacterianos de *S. typhimurium* e *E. coli*, competentes em enzimas de biotransformação humanas, dividindo-se em dois objetivos principais. O papel de SULT1A1 na bioativação de 12-OH-NVP (metabolito de NVP) e estudar o mecanismo de transferência de elétrões de CPR para os seus parceiros, neste caso a enzima HO-1.

A Dra. Mónica Alves, desenvolveu um sistema teste de mutagenicidade de *S. typhimurium* competente em SULT1A1, MA98_SULT1A1, ultrapassando algumas desvantagens de testes padrão de mutagenicidade do grupo de Hansruedi Glatt. Com a estirpe MA98_SULT1A1, realizou o estudo de bioativação do metabolito 12-OH-NVP, confirmando a mutagenicidade deste. No entanto, aquando da complementação deste estudo, não se obtiveram resultados reprodutíveis. Otimizando alguns parâmetros da cultura e adquirindo um novo 12-OH.NVP com maior grau de pureza, repetiram-se todos os testes de mutagenicidade de forma a verificar ou confirmar a mutagenicidade deste metabolito de NVP e avaliar o papel de SULT1A1 na bioativação de NVP.

A segunda fase do trabalho vem no seguimento do extenso trabalho realizado pelo grupo do Doutor Kranendonk no estudo do mecanismo molecular do complexo enzimático CYP, especialmente sobre a interação proteica-proteica de CYP e CPR e o mecanismo de transferência de elétrões de CPR. No presente estudo foi desenvolvido um sistema bacteriano de *E. coli* competente nas enzimas CPR e HO-1 humanas, para aplicação em estudos mecanísticos de CPR. A ação de HO-1 é suportada por sete elétrões doados por CPR, enquanto na reação com CYP, CPR apenas doa 2 elétrões. Sabendo que HO-1 e CYP interagem com CPR, é plausível assumir que possuem um local de ligação semelhante a esta enzima. Deste modo, ao estudar-se a interação CPR:HO-1, em que há a transferência de mais elétrões, será possível tirar-se conclusões sobre o mecanismo de transferência de elétrões de CPR para os seus parceiros redox. Assim este segundo objetivo principal dividiu-se em três fases: 1) determinar a estequiometria de CPR:HO-1 em células de hepatócitos humanos que até à data há pouca informação sobre a estequiometria em humanos. (Reed et al., 2011); 2) mimetizar essa estequiometria num sistema bacteriano de *E. coli*, recorrendo à expressão heteróloga dessas proteínas humanas e otimizando as condições de cultura da estirpe; 3) desenvolvimento de ensaios de cinética da atividade de HO-1, utilizando extratos membranares do sistema bacteriano desenvolvido, de forma a avaliar a dinâmica de CPR.

II - Materiais e Métodos

II.1 Materiais

Tabela II.1 – Composição das soluções utilizadas

Solução	Composição por 1L
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂) 0,1 M	8,13 g MgCl
Sais M9 (5x)	64 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O; 150 g KH ₂ PO ₄ ; 2,5 g NaCl; 5 g NH ₄ Cl ¹
Sais VB (50x)	10 g MgSO ₄ .7H ₂ O; 100 g C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O; 500 g K ₂ HPO ₄ ; 175 g NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .H ₂ O) ¹
Tampão de lise	6,05 g Tris-Base; 8,77 g NaCl; 1,86 g EDTA (ajustar pH a 8)
Tampão PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ (ajustar pH a 7,4)
Tampão TB	23,1 g KH ₂ PO ₄ ; 125,4 g K ₂ HPO ₄ ¹
Tampão Tris Glicerol (TG)	9,08 g Tris-HCl; 230 mL glicerol 50% (ajustar pH a 7,5) ²
Tampão Tris Glicerol-EDTA (TGE)	9,08 g Tris-HCl; 9,30 g EDTA; 230 mL glicerol 50%
Tampão Tris-Sacarose	6,06 g Tris-HCl; 95,58 g NaCl (ajustar pH a 7,8) ²
Tampão citocromo c	6,06 g Tris- HCl; 11,18 g KCL; 2,03 g MgCl; 130,02 mg NaN ₃ ; 10 mL Triton X-100 4% (ajustar pH a 7.5)
Tampão Fosfato de Potássio (K/P) + 3 mM MgCl ₂	71,7 mL K ₂ HPO ₄ ; 28,3 mL KH ₂ PO ₄ ; 30 mL MgCl 0,1 M
Tampão MOPS	20,92 g MOPS (ajustar pH a 7,2)
Tampão Tris-Base	12,12 g Trizma.base (ajustar pH a 7,2)
<i>Trace elements</i>	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
Tampão de corrida (5x)	5 g SDS; 15,14 g Trizma.base; 93,84 g Glicina
Tampão de transferência (5x)	2 g SDS; 29,06 g Trizma.base; 14,64 g Glicina; 500 mL Metanol

Verseno (10x)	80 g NaCl; 4 g KCl; 2 g EDTA; 0,2 g vermelho de fenol
---------------	---

¹ Autoclavar 20 minutos a 120°C; ² Conservar a 4°C.

Tabela II.2 Composição dos meios utilizados

Meio de cultura	Composição por 1L
Luria – Bertani (LB)	5 g Bacto extracto de levedura; 10 g NaCl; 10 g Bacto triptona ^{1,2}
Nutrient broth no.2 (NB)	25 g Nutrient broth ^{1,2}
Meio A	1,6 g NB (<i>S. typhimurium</i>) ou TB/peptona (<i>E. coli</i>); 5g NaCl
M9	15 g agar; 10mL glucose (40% v/v); 200 mL sais M9 (5x) ¹
NZY+	10 g Bacto triptona; 5 g NaCl; 5 g Bacto extracto de levedura (ajustar pH a 7,5) ¹ ; suplementar com 12,5 mL MgCl (1M), 12,5 mL MgSO ₄ (1M) e 20 mL glucose 20%
Terrific Broth (TB)/peptona	12 g Bacto triptona; 24 g Bacto extracto de levedura; 2 g Bacto peptona; 8 mL glicerol 50% ¹ ; suplementar com 100 mL tampão TB
Top-agar para aplicação em testes de mutagenicidade	6 g NaCl; 5 g agar ¹ ; suplementar com 100 mL solução histidina/biotina (0,5 mM) (<i>S. typhimurium</i>) ou 1,6 mL L-arg (10mg/mL) e 1,6 mL Thy (10 mg/mL) (<i>E. coli</i>)
Vogel-Bonner (VB)	15 g agar ¹ ; suplementar com 20 mL sais VB (50x) e 50 mL glucose 40%

¹ Autoclavar 20 min. a 120°C; ² Para preparação de meio em placas ou em tops-agar, adicionar 15 g ou 6 g de agar, respetivamente, antes da autoclavagem

Tabela II.3 Lista de reagentes utilizados no trabalho experimental, e respetivos fabricantes.

Fabricante	Reagente
Affimetrix USB	Nonidet P40 substitute
BD Biosciences	Frascos de 75 cm ² com superfície revestida por colagénio; Matrigel
Becton Dickinson and Company	Bacto agar; Bacto agar MacConkey; Bacto extracto de levedura; Bacto peptona; Bacto triptona
Bioline	Agarose; marcador de pesos moleculares HyperLadder I™
Bio-Rad	Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (4 – 20%); dodecil sulfato de sódio (SDS)
Invitrogen	WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse Western IgG Blot Kit
Merck	Químicos usados na preparação das soluções (tabela II. 1)
Oxoid	Nutrient broth no. 2
Roche	Mistura de inibidores de proteases
Sigma Chemical Co	Ácido δ-aminolevulínico (δ-Ala); ácido ascórbico; ampicilina (Amp); L-arginina (L-arg); benzonase; catalase; cloranfenicol (Cm); ferrozina; fluoreto fenilmetanossulfonil (PMSF); Heme; L-histidina.HCl (L-his); isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG); lisozima; 2-nitrofluoreno (2NF); 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO); fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH); pentaclorofenol (PCP); riboflavina; soro fetal de bovino (FBS); sulfato de canamicina (Kan); tiamina (Thy); tripsina; Trizma.base; triton X-100
TRC Toronto	12-hidroxi-Nevirapina (12-OH-NVP)
Xenotech	Células primárias de hepatócitos humanos
Cedido por Professor Nuno Oliveira (UL)	Linha celular HepG2

Tabela II.4 Estirpes de *E. coli* e de *S. typhimurium* utilizadas no presente estudo

Estirpe	Genótipo	Origem
<i>E. coli</i>		
PD301	<i>thr-1, ara-14, leuB6, Δ(gtp-proA)62, thi-1, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44, argE3, hisG4, rac, λ⁻, tsx-33, rpsL31, mgl-51, rfbD1, kdgK51, qsr, uvrA6, galE, ada10 [tet^s], Δogt::cm^r, LPS^d</i>	P. Duarte
BTC ⁰	PD301/ pCW ^A /pLCM	P. Duarte
PD301_hHO-1_POR	PD301/pCW_hHO-1/pLCM_POR	Este estudo
PD301_hHO-1	PD301/pCW_hHO-1/pLCM	Este estudo
PD301_POR	PD301/ pCW ^A /pLCM_POR	P. Duarte
<i>S. typhimurium</i>		
TA1535	<i>hisG46, Δ(gal-uvrB), rfa⁻</i>	B. N. Ames
TA100	TA1535/pKM101	B. N. Ames
MA98_SULT1A1	TA1535/pCWΔ/pLCM_hSULT1A1_cys	M. Alves
TA1538	<i>hisD3052, Δ(gal-uvrB), rfa⁻</i>	B. N. Ames
TA98	TA1538/pKM101	B. N. Ames
MA100_SULT1A1	TA1538/pcWΔ/pLCM_hSULT1A1_cys	M. Alves

Tabela II.5 Plasmídeos utilizados no presente estudo.

Plasmídeos	Marcadores genéticos relevantes	Origem
pCW ^A	pCWori ⁺ , vetor de expressão de <i>E. coli</i> , Amp ^r , sem cDNA, ptac.ptac/lacI ^q	C. W. Fisher
pCW_hHO-1	pCWori ⁺ , contendo cDNA de HO-1 humana	M. Kranendonk
pLCM	mucAB ⁺ , Kan ^r , derivado de pACYC177	M. Kranendonk
pLCM_POR	pLCM, contendo cDNA de POR humano sob o promotor tac.	M. Kranendonk
pLCM_hSULT1A1_cys	pLCM, contendo o operão <i>cysDNC</i> e cDNA de SULT1A1 humano sob o promotor tac	M. Alves

II.2 Métodos

II.2.1 Cultura bacterianas

Foram usados meios líquidos e sólidos (Tabela II.2), suplementados com 50 µg/mL de ampicilina (Amp), 15 µg/mL de canamicina (Kan) e/ou 10 µg/mL cloranfenicol (Cm) de acordo com o respetivo genótipo.

Todos os crescimentos de culturas bacterianas foram realizados na agitadora orbital *New Brunswick scientific*.

II.2.1.1 Culturas bacterianas sem indução da expressão heteróloga

As culturas foram incubadas durante 16h, a 37°C a 210 rpm numa incubadora orbital. No caso das estirpes de *E.coli* foram utilizados 5 mL de meio LB e no caso das de *S. typhimurium*, 5 mL de NB, suplementado com os respetivos antibióticos. Como inóculos, usaram-se colónias recém-crescidas em placa, ou *stocks* armazenados com 15% v/v de glicerol a -80°C, no caso de *E.coli*, e *stocks* armazenados com dimetilsulfóxido (DMSO) (0,09 ml/ml de cultura) a -80°C no caso de *S. typhimurium*.

Para a preparação de células competentes de *E. coli* para eletroporação, inocularam-se 20-30 colónias de PD301 (previamente crescidas em placas LB suplementadas com 10 µg/mL cloranfenicol em 75 mL (Erlenmeyers de 250 mL) de meio líquido LB contendo o mesmo antibiótico. A incubação decorreu a 37°C, com agitação de 210 rpm, até atingir uma densidade ótica (DO₆₀₀) entre 0,6 e 0,8. Fizeram-se *stocks* dessas células, armazenados com 15% v/v de glicerol a -80°C.

II.2.1.2 Culturas bacterianas com indução da expressão heteróloga

As culturas de *S. typhimurium* com expressão heteróloga foram realizadas em tubos de vidro, de 150 x 15 mm, com 6 mL de meio NB, suplementado com os respetivos antibióticos. A expressão foi induzida por IPTG (0,2 mM), adicionada inicialmente ao meio. Inoculou-se a cultura com 20 µl de células armazenadas a -80°C, incubando-se a 28°C, com agitação de 140 rpm em agitadora orbital, até uma densidade ótica (DO) de 0,9 ($\approx 0,5 \times 10^9$ células/ml). A medição da DO foi realizada num espectrofotómetro (HITACHI, U-2001) a 600 nm. Subsequentemente as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos, a 2772g, a 4°C e ressuspensas em meio A para uma densidade celular 10 vezes superior, estando preparadas para utilização nos testes de mutagenicidade.

As culturas de *E. coli* com indução da expressão de proteínas heterólogas foram incubadas em 100 mL de meio TB/peptona em Erlenmeyers de 1 L, suplementado com os respetivos antibióticos, 1µg/mL de tiamina (Thy), e *Trace Elements* (TE) (0,4 mL/L). Foram também suplementadas com δ-ala (15 µM). A expressão das proteínas heterólogas foi induzida por IPTG (0,2 mM) adicionada inicialmente ao meio. Foi usado um inóculo de 500 µl de cultura

bacteriana armazenada a -80°C, incubando-se a 28°C, com agitação de 150 rpm em incubadora orbital. Depois de atingida a DO pretendida (ver seção III. 4) as culturas foram centrifugadas e ressuspendidas ajustando-se o número de células por amostra através de medição de DO.

II.2.2 Testes mutagenicidade com estirpes competentes em sulfotransferase 1A1 humana

Para determinar a resposta mutagénica ao composto NVP foi usado o ensaio de pré-incubação líquida baseado em Meini e Glatt (2005). O composto foi adicionado a 100 µl de cultura bacteriana, crescida conforme II.2.1.2. Esta mistura foi depois adicionada a um tubo com 500 µl de MgSO₄ (100 mM), sendo pré-incubado durante 1 hora, a 37°C, com agitação de 175 rpm, em incubadora orbital. Subsequentemente, os top-agar histidina/biotina, mantidos aproximadamente a 45°C, foram adicionados aos tubos com as bactérias com o composto e espalhou-se em placas com meio mínimo VB. Estas foram incubadas durante 48 horas (72 horas no caso das TA 1538) a 37°C e o número de revertentes foi depois contado. No caso dos testes com o composto inibidor de SULT1A1, PCP (Tabela II.3), este foi adicionado às células bacterianas ressuspendidas antes do mutagénio, tendo-se pré-incubado 10 minutos, a 37°C, com agitação de 175 rpm em agitadora orbital. Seguidamente, procedeu-se de igual forma como o ensaio normal descrito em cima.

II.2.3 Construção da estirpe de *E. coli*

II.2.3.1 Preparação células competentes de *E. coli* PD301 para eletroporação

As células PD301 foram eletroporadas com os plasmídeos contendo CPR e HO-1 humanas do seguinte modo. A estirpe PD301 foi cultivada (secção II.2.1.1), e depois de parado o seu crescimento em gelo, dividiu-se 50 mL do volume total em dois tubos de Falcon (50 mL). Procedeu-se a centrifugação durante 15 minutos, a 4°C, a 2772 g. O precipitado foi ressuspendido em 2 mL de H₂O nanopura estéril fria, juntando-se a suspensão num só tubo, perfazendo um volume total de 25 mL com H₂O nanopura estéril fria, realizando-se nova centrifugação com as mesmas condições da primeira. O precipitado obtido foi ressuspendido em 1 mL de glicerol (15%) frio. Aliquotou-se (35 µl) todo o volume da suspensão, tendo-se depois congelado em azoto líquido ("*snap freeze*") e armazenado a -80°C.

II.2.3.2 Transformação por eletroporação de *E. coli*, PD301

A eletroporação das células PD301 realizou-se adicionando DNA plasmídico respetivo (Tabela II.6) a 35 µl de células eletrocompetentes (II.2.2.1). As células e o DNA foram transferidos para uma cuvette de eletroporação e eletroporou-se a 1,35 kV, 200 Ω e capacitador de 25 µF (constante de tempo de 4,4 ms), utilizando Bio-Rad Gene Pulser®. Seguidamente, as células eletroporadas foram ressuspendidas em 1 mL de meio NZY⁺ (Tabela II.2) e incubadas a 37°C,

com agitação de 210 rpm em incubadora orbital, durante 1 hora. Subsequentemente, 50 µl e 200 µl de cultura transformante foram plaqueados em meio LB, suplementado com os respetivos antibióticos. Os restantes 750 µl foram centrifugados durante 30 segundos a 12000 g, e o precipitado ressuscitado em 100 µl de meio NZY⁺ sendo depois igualmente plaqueados.

Tabela II.6 Estirpes transformadas e os seus respetivos plasmídeos.

Estirpe	pCW_hHO-1	pLCM_POR ^{wt}	pCW ^Δ	pLCM
PD301_hHO-1_POR	+	+	-	-
PD301_hHO-1	+	-	-	+
PD301_POR	-	+	+	-
BTC ⁰	-	-	-	-

II.2.4 Caracterização fenotípicas das novas bactérias transformadas.

De forma a confirmar o fenótipo da estirpe após a eletroporação, realizaram-se culturas de colónias transformadas em 5 ml de meio LB, suplementado com os respetivos antibióticos, em tubos de vidro estéreis, de 150 x 15mm, durante 16 horas, a 37°C, com agitação de 210 rpm. Seguidamente, retirou-se 100 µl dessa cultura centrifugando-se a 12000 g durante 30 segundos e ressuscitando-se o precipitado em 100 µl de PBS. Subsequentemente, procedeu-se à verificação das características fenotípicas a seguir descritas.

II.2.4.1 Auxotrofia para L-arginina

A auxotrofia de *E. coli* para L-arginina (L-arg) foi confirmada pelo crescimento bacteriano em placas M9 seletivas (Tabela II.2). Para isto, 5 µl de suspensões bacterianas, foram inoculadas em placas com meio mínimo M9, apenas suplementado com Thy (1 µg/mL). Foi também realizado controlo positivo, utilizando-se placas com o mesmo meio, mas suplementado com L-arg (100 µg/mL), além da Thy (1 µg/mL).

II.2.4.2 Presença de parede lipopolissacarídica incompleta (LPS^d)

Procedeu-se à inoculação de 5 µl de suspensão bacteriana das culturas de *E. coli* em placas com agar MacConkey de forma a testar a sensibilidade da estirpe ao cristal violeta, sais biliares e outros compostos tóxicos constituintes deste meio. Em estirpes com LPS^d, por possuírem parede celular mais permeável, não conseguem crescer devido à letalidade destes compostos tóxicos.

II.2.4.3 Confirmação da sensibilidade de deteção de mutagenicidade

A sensibilidade de deteção de mutagenicidade pelas estirpes transformadas de *E. coli* PD301 verificou-se pela monitorização da reversão do seu alvo genético argE3 em testes de

mutagenicidade com um químico específico e caracterizado para esta estirpe, sem indução da expressão heteróloga.

De forma a selecionar a estirpe mais sensível na detecção de mutagenicidade, cresceram-se vários candidatos de PD301_hHO-1_POR (seção II.2.1.1), tendo-se realizado testes de mutagenicidade recorrendo à abordagem sem pré-incubação. Para isto adicionou-se composto teste 4NQO (0,15 µg por placa) a agar de superfície arginina/tiamina (Tabela II.2), juntando-se depois 100 µl de cultura. De seguida, a mistura foi vertida e espalhada homogeneamente em placas com meio VB. Estas foram incubadas durante 48 horas a 37°, tendo o número de colónias sido contado.

II.2.5 Isolamento membranas das estirpes derivadas de PD301

De forma a obterem-se frações membranares das estirpes derivadas de PD301 seguiu-se o procedimento desenvolvido pelo Doutor Kranendonk e colaboradores (Moutinho et al., 2012).

Cultivou-se a estirpe bacteriana em 200 mL (100 mL em dois erlenmeyers de 1 L) conforme II.2.1.2. A cultura foi centrifugada durante 20 minutos, a 4°C, a 2772 g. O sobrenadante foi removido e o sedimento obtido foi ressuscitado em 40 mL de Tris-Sacarose. Posteriormente, foi adicionada lisozima (0,5 mg/ml de suspensão bacteriana) e benzonase (0,05 µl/ml de suspensão bacteriana), incubando-se durante 30 minutos, a 10 rpm em agitador orbital (Grant-bio PTR-30), a 4°C. Seguidamente, adicionou-se os inibidores de proteases, EDTA (100 µM) e PMSF (500 µM), concentrações finais. A suspensão bacteriana foi lisada por sonicação (5 ciclos de 30 segundos, 25% *output* (*output* de aproximadamente 2225 Joules) com intervalos de 59 segundos). Em seguida, centrifugou-se o lisado durante 10 minutos, a 5053 g a 4°C, removendo-se assim células não lisadas. O lisado de células resultante foi centrifugado durante 1 hora, a 100000 g, a 4°C. Posteriormente o sedimento membranar obtido foi lavado duas vezes com 2 ml tampão TG (Tabela II.2) e ressuscitou-se o sedimento em 1,5 mL de TG, recorrendo ao *Dounce homogenizer*. Por fim, armazenou-se a suspensão a -80°C.

II.2.6 Cultura de células primárias de hepatócitos e de HepG2.

As células HepG2 foram inicialmente cultivadas durante 4 horas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FBS) e com 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina, a 37°C, a 5% de CO₂/ 95% de ar. Seguidamente, o meio foi substituído e adicionado novo meio com matrigel (0,25 mg/ml), incubando-se mais 38 horas. Na indução com heme foi utilizada uma concentração final de 10 µM, incubando-se durante 6 horas. As células foram cultivadas em frascos com superfície revestida com colagénio.

As células primárias de hepatócitos humanos (PHH) foram descongeladas de acordo com as instruções do fabricante (XENOTECH) e cultivadas em meio de Ressuspensão (fornecido pelo fornecedor) durante 4 horas a 37°C, a 5% de CO₂/ 95% de ar. O meio foi depois substituído por meio Modified Chee's Media (MCM) suplementado com penicilina e estreptomicina (XENOTECH) e adicionada matrigel (0,25 mg/ml) e as células incubadas durante 38 horas. Seguidamente, a indução com heme realizou-se utilizando uma concentração final de 10 µM e incubando-se durante 6 horas. As células cresceram em frascos com superfície revestida com colagénio.

II.2.6.1 Colheita e extração de proteínas totais

A recolha das células foi feita através de tripsinização. Incubaram-se os frascos com 4 ml de verseno durante 10 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, foi adicionada a solução de tripsina (concentração final de 0,5 mg/ml) incubando-se durante 10 minutos a 37°C. A tripsinização foi parada por diluição adicionando-se um volume de meio DMEM (meio MCM no caso dos hepatócitos), 3 vezes superior ao volume da solução de tripsina. O número de células da colheita foi determinado utilizando um hemocitómetro manual (Câmara de Neubauer), no microscópio ótico Dialux 20-Leitz, com uma ampliação de 500 vezes. O volume da amostra de células foi diluída 5 vezes em *trypan blue* (XENOTECH).

A extração das proteínas foi realizada lavando-se a suspensão celular com PBS frio e centrifugando-se duas vezes durante 5 minutos, a 1200 rpm a 4°C. Depois as células foram incubadas em gelo durante 30 minutos em tampão de lise (mistura de inibidores de proteases 7X, 1% Nonidet i-40) e centrifugadas a 4°C, durante 10 minutos, a 12000g, e sendo o sobrenadante contendo o lisado armazenado a -80°C

II.2.7 Determinação da concentração proteica

As amostras de proteínas extraídas, tanto das amostras de PHH e HepG2 induzidas, como de amostras de cultura bacteriana PD301 foram quantificadas em relação às proteínas totais recorrendo ao método de Bradford. Elaborou-se uma curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) diluída em tampão TGE (Tabela II.1).

No caso das amostras membranares de *E. coli*, a determinação da concentração proteica foi realizada usando uma curva de calibração com BSA diluída em tampão TG (Tabela II.1) e as amostras membranares foram diluídas 20 vezes nesse mesmo tampão

II.2.8 Quantificação de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I expressas nas estirpes PD301 e em células primárias de hepatócitos humanos e HepG2

II 2.8.1 Imunodeteção de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I

As amostras foram pré-tratadas em *loading buffer* SDS-PAGE, e foram carregadas em géis de SDS-PAGE (4-20%) (Tabela II.3). Utilizaram-se proteínas humanas purificadas de CPR e de HO-1 como controlos positivos. CPR nativa (não truncada) foi cedida pelo Doutor Chris Marohnic (University of Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas) e HO-1 adquirida a RayBiotech, Inc, sendo que esta possui uma cauda His-Tag formada por 8 aminoácidos, substituindo 21 aminoácidos na parte C-terminal, levando a uma massa molecular de 31,4 kDa, inferior aos 32 kDa da forma nativa de HO-1. Após a corrida por eletroforese, realizou-se a transferência eletroforética (*semi-dry*) das proteínas do gel para a membrana PVDF (Immobilon-FL Milipore). Seguidamente, procedeu-se à imunodeteção das proteínas transferidas, utilizando-se o kit WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse IgG Western blot (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Utilizaram-se os anticorpos primários monoclonais de anti-CPR (1:2000) (GeneTex) e anti-HO-1 (1:500) (GeneTex) e secundário Biotin-XX *goat* anti rato. A visualização das imunodeteções foi obtida através de exposição de UV a 365 nm.

A quantificação semi quantitativa de CPR e HO-1 humanos nas amostras foi realizada por densitometria, utilizando a intensidade de sinal de várias quantidades de proteína purificada que permite uma interpelação do sinal da amostra. Isto foi realizado recorrendo ao *software* de tratamento de imagem Labworks (versão 4.6) (UVP, Inc. USA)

II.2.8.2 Determinação de conteúdo de NADPH citocromo P450 oxido-redutase pelo ensaio de redução do Citocromo c

A medição do conteúdo de CPR nos microssomas isolados (seção II.2.2) consegue-se pelo ensaio de redução do citocromo c (cit. c). A mistura de reação é composta por tampão citocromo c redutase (Tabela II.1), por solução de cit. c (concentração final de 50 µM) (Tabela II.1) e amostra membranar adequada. O volume foi dividido por duas *microcuvettes* e a reação iniciou-se pela adição de NADPH (concentração final de 200 µM). A velocidade da reação foi medida pelo aumento da absorvância da mistura a 550 nm durante 1 minuto, num espectrofotómetro de feixe duplo (Shimadzu UV-Vis UV-2401RC).

II.2.9 Ensaios de cinética de heme oxigenase I

II.2.9.1 Varrimento comprimento de onda de 400-700 nm com Ferro (II) e Ferrozina

A mistura reacional de 1 mL, é composta pelo tampão a testar (seção III.6.1) com concentração final de 0,1 M e pH 7,2, ferrozina (concentração final 250 µM (Reed et al., 2010)),

diluída já no respetivo tampão, e ferro (II) (Fe^{2+}) (concentração final de 50 μM). O Fe^{2+} foi obtido através de solução de 100 mM de FeCl_3 reduzida por uma solução de 1 M de ácido ascórbico (Riemer et al., 2004). Os varrimentos foram realizados no espectrofotómetro (Hitachi U-2001), e repetidos durante 20 minutos, com intervalos de 5 minutos.

II.2.9.2 Curva de calibração com diferentes concentrações de Ferro (II)

Preparou-se uma solução de Fe^{2+} (obtido através do procedimento descrito em cima), A cada microcuvette foi adicionado tampão K/P (concentração final de 0,1 M e pH 7,2), ferrozina (concentração final de 250 μM) e várias concentrações de Fe^{2+} . A mistura foi incubada protegida da luz durante 10 minutos e realizaram-se medições da absorvância no espectrofotómetro (Hitachi U-2001).

II.2.9.3 Desenvolvimento de ensaios para medição da atividade de heme oxigenase I em amostras membranares bacterianas

Para o desenvolvimento de um ensaio que permitisse medir a atividade da enzima HO-1 nas amostras membranares seguiu-se um método baseado em Reed et al. 2010, efetuando-se algumas alterações (seção III.6). A mistura de reação continha ferrozina (concentração final de 250 μM), 0,25 unidades/ μl de catalase, heme (concentração final de 30 μM), 0,04% Triton X-100, e extrato membranar (numa concentração final de 50 nm tendo em conta a quantidade de CPR membranar) adicionado a tampão K/P (contendo 3 mM MgCl_2) para perfazer o volume de 800 μl . A reação foi iniciada pela adição de NADPH (concentração final de 625 μM). O aumento de absorvância a 562 nm mediu-se num espectrofotómetro de feixe duplo (Shimadzu UV-Vis UV-2401PC) durante 3,5 minutos.

III - Resultados

III.1 Ensaios de mutagenicidade de 12-OH-NVP nas estirpes competentes em sulfotransferase 1A1 humana

Apesar do mecanismo exato pelo qual a NVP induz toxicidade ainda não ser completamente claro, tem sido verificado em diversos estudos, o envolvimento das enzimas SULT na bioativação de um metabolito 12-OH-NVP, em eletrófilos reativos relacionados com alguns aspetos de ADR causados por NVP (Sharma et al., 2012; Sharma et al., 2013). Anteriormente já foi demonstrada carcinogenicidade de NVP em roedores (Anonymous, 2009), Contudo, em testes *in vitro* convencionais ainda não se provou que NVP fosse mutagénica ou clastogénica (Antunes et al., 2008). Assim o objetivo desta fase do trabalho foi complementar um estudo de mutagenicidade de 12-OH-NVP por bioativação mediada por SULT1A1, iniciado pela Dr^a Mónica Alves neste laboratório.

Anteriormente foi estudado neste laboratório o papel de SULT1A1 na bioativação de NVP. A Dr.^a Mónica Alves desenvolveu estirpes de *S. typhimurium* competentes em SULT1A1 humana, nomeadamente a estirpe MA98_SULT1A1 e MA100_SULT1A1 (Tabela II.4), e experiências iniciais indicaram a mutagenicidade de 12-OH-NVP em MA98_SULT1A1 (Alves, 2013). No entanto, no decorrer do trabalho experimental, subsequente ao estágio da Dr.^a Mónica Alves, com o objetivo de confirmar o papel bioativador de SULT1A1 na mutagenicidade de 12-OH-NVP, foram encontradas inconsistências e falta de reprodutibilidade nos resultados (comunicação pessoal com Doutor Michel Kranendonk). Vários parâmetros foram otimizados, resultando numa alteração das culturas desta estirpe, de modo a obter-se mais reprodutibilidade na expressão de SULT1A1. Além disso, o nível de impureza de 12-OH-NVP, utilizado anteriormente, foi considerado um fator de relevância nessas inconsistências (comunicação pessoal com Doutor Michel Kranendonk), por isso foi adquirido 12-OH-NVP com pureza $\geq 98\%$.

Mais tarde, já com novo 12-OH-NVP adquirido, aplicando um gradiente logarítmico, nas estirpes MA98_SULT1A1 e MA100_SULT1A1, observou-se mutagenicidade na estirpe MA98_SULT1A1 (Fig. III.1).

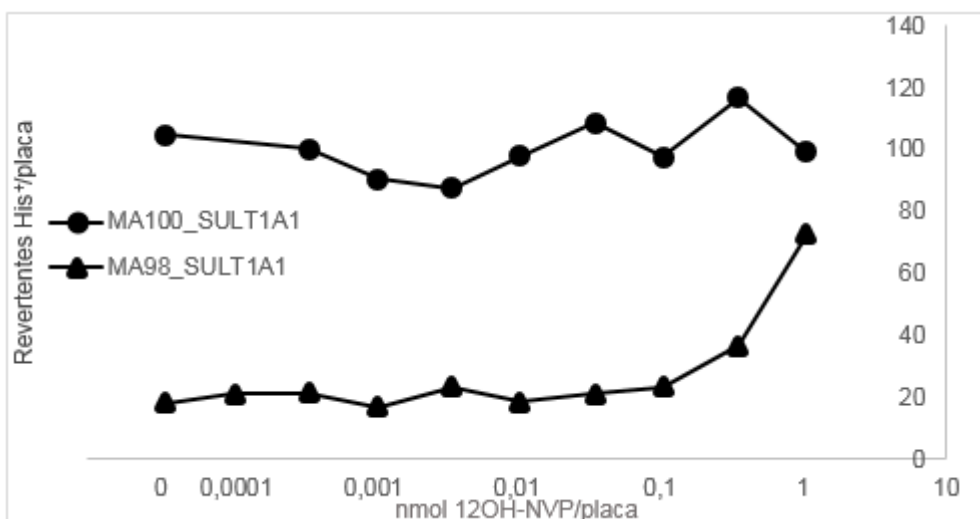


Figura III.1 – Curvas dose-resposta obtidas nas estirpes MA98_SULT1A1 e MA100_SULT1A1, utilizando um gradiente logarítmico de 12-OH-NVP.

Testou-se a estirpe MA98_SULT1A1 e a estirpe TA98, sua comparável, mas sem expressão de SULT1A1, a TA98, com um gradiente linear de 12-OH-NVP (Fig. III.2). Observou-se que apenas a estirpe MA98_SULT1A1 demonstrou atividade mutagénica, verificando-se uma relação dose-resposta linear, indicando o papel bioativador de SULT1A1 em NVP.

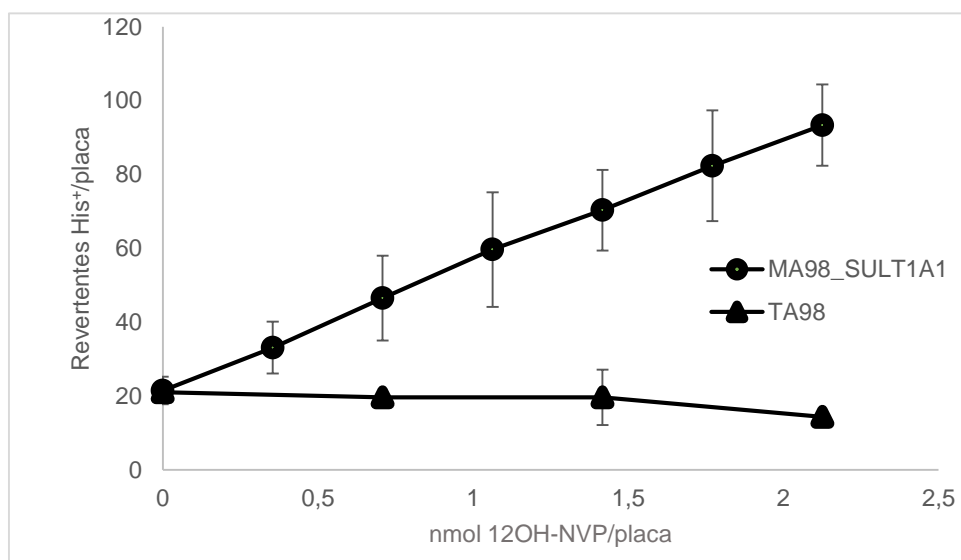


Figura III.2 – Curva dose-resposta de 12-OH-NVP com as estirpes MA98_SULT1A1 e TA98, com um gradiente linear. O resultado representa a média de 4 ensaios realizados independentemente.

De forma a confirmar a ação de SULT1A1 na bioativação de 12-OH-NVP, foi utilizado um composto inibidor de SULT1A1, o pentaclorofenol (PCP) (Meinl et al., 2006), numa dosagem de 1,8 μ M, 10 vezes superior ao IC₅₀, previamente determinado (comunicação pessoal com

Doutor Michel Kranendonk). De acordo com os resultados obtidos (Fig. III.3.A) verifica-se que na presença de PCP, ocorre inibição da resposta mutagénica causada por 12-OH-NVP. Para excluir a hipótese deste efeito ser devido a citotoxicidade de PCP nas células de *S. typhimurium* LT2, testou-se a estirpe TA98 com o mutagénico direto 2-nitrofluoreno (2NF), em combinação com PCP (na mesma dose utilizada anteriormente) (Fig. III.3.B). Neste caso, verificou-se que PCP, nesta concentração não diminuiu a resposta de 2NF.

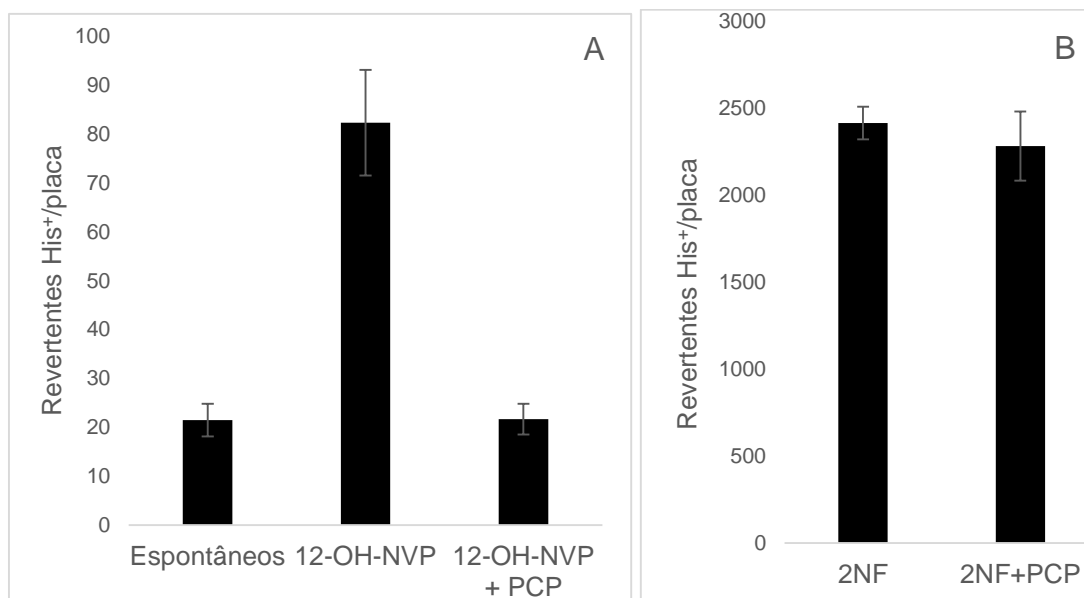


Figura III.3 – A) Efeito do inibidor de SULT1A1, PCP (1,8 μ M) na estirpe MA98_SULT1A1 quando exposta a 1,77 nmol de 12-OH-NVP. B) Mutagenicidade induzida por 2NF (0,5 μ g) na estirpe TA98.

III.2 Desenvolvimento de uma estirpe de *E. coli* competente em NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I humanas

A segunda parte do trabalho focou-se no desenvolvimento de um sistema bacteriano de *E. coli* competente na expressão das proteínas humanas CPR e HO-1, para ser aplicado no estudo da atividade de HO-1 suportada por CPR. Além disso, este sistema pode também ser aplicado em estudos sobre os efeitos de polimorfismos genéticos de CPR, com a finalidade de entender melhor as interações e o mecanismo de transferência de eletrões deste complexo. O grupo de investigação do Doutor Michel Kranendonk, através do desenvolvimento de modelos celulares bacterianos competentes em enzimas de biotransformação humanas, tem realizado vários estudos acerca do mecanismo molecular do complexo enzimático de CYP e especialmente nas interações com CPR, e também diversos estudos relacionados com polimorfismos de CPR (associados à síndrome de ABS) e os seus efeitos na interação com os parceiros redox de CPR (Kranendonk et al., 2008; Marohnic et al., 2010; Moutinho et al., 2012). HO-1 é uma das enzimas que depende de eletrões de CPR, mas distintamente de CYP, que depende apenas de dois, esta depende de sete eletrões por cada ciclo enzimático, o que a torna

adequada para ser usada neste sistema possibilitando uma maior compreensão acerca da eficiência do mecanismo de transferência de elétrons.

III.2.1 Determinação da estequiometria NADPH citocromo P450 oxido-reductase:heme oxigenase I em células primárias de hepatócitos humanos e células HepG2

Com o objetivo de desenvolver um sistema bacteriano competente em CPR e HO-1 mimetizando as condições verificadas em humanos foi necessário determinar previamente a estequiometria que as duas enzimas apresentam no fígado humano. Como já foi referido, utilizar uma estequiometria respeitando as condições fisiológicas assume um papel determinante neste tipo de sistemas uma vez que estequiometrias diferentes das que se verificam *in vivo*, levam a dados pouco relevantes quando se pretende extrapolar para as condições *in vivo*.

Até à data, poucos dados existem sobre estequiometria CPR:HO-1, tendo sido determinada por exemplo em estudos recorrendo a microssomas de roedores expostos a cádmio (Reed et al., 2011). No presente estudo, realizou-se cultura de células de HepG2 e de hepatócitos primários humanos (PHH) (secção II.2.6), induzindo-se a expressão de HO-1 através da adição de heme. A expressão de CPR e HO-1 nas amostras de lisado das células HepG2 e PHH foi semi-quantificada por imunodeteção (secção II.2.7.1), utilizando a intensidade de sinal de diversas quantidades de proteína purificada, permitindo uma comparação do sinal da amostra. (Anexo - Fig. VII.1)

Primeiramente realizou-se o estudo de determinação da estequiometria CPR:HO-1 em células HepG2. Num estudo preliminar, baseado em Miyamoto et al. (2009) utilizaram-se duas concentrações de heme, 10 μM e 100 μM , tendo-se verificado um efeito de citotoxicidade na concentração mais elevada (dados não apresentados). Subsequentemente, realizou-se cultura de HepG2 tendo-se realizado indução com heme numa concentração final de heme de 10 μM Através de imunodeteção (Fig. III.4) e respetiva análise semi-quantitativa verificou-se que, tanto nas amostras controlo, como induzidas, a estequiometria CPR/HO-1 foi de aproximadamente 1:2 (Tabela III.1).

Na abordagem seguinte, utilizando células de PHH, realizou-se o mesmo ensaio descrito em cima para as células HepG2. Analisando a imunodeteção respetiva (Fig. III.5) observou-se uma estequiometria CPR/HO-1 de aproximadamente 1:16 nas células induzidas, enquanto as não induzidas apresentaram um rácio inferior de aproximadamente 1:12.

Observando as figuras III.4 e III.5 verificam-se mais bandas além das correspondentes ao sinal das respetivas proteínas controlo. Depois de uma análise da distância de migração das bandas e, comparando com a distância de migração das bandas do marcador de peso molecular, verifica-se que essas bandas correspondem provavelmente a hétero-dímeros de CPR/HO-1 e

oligómeros de HO-1. Por este motivo tomou-se em conta o sinal desses possíveis hétero-dímeros e oligómeros na análise semi-quantitativa.

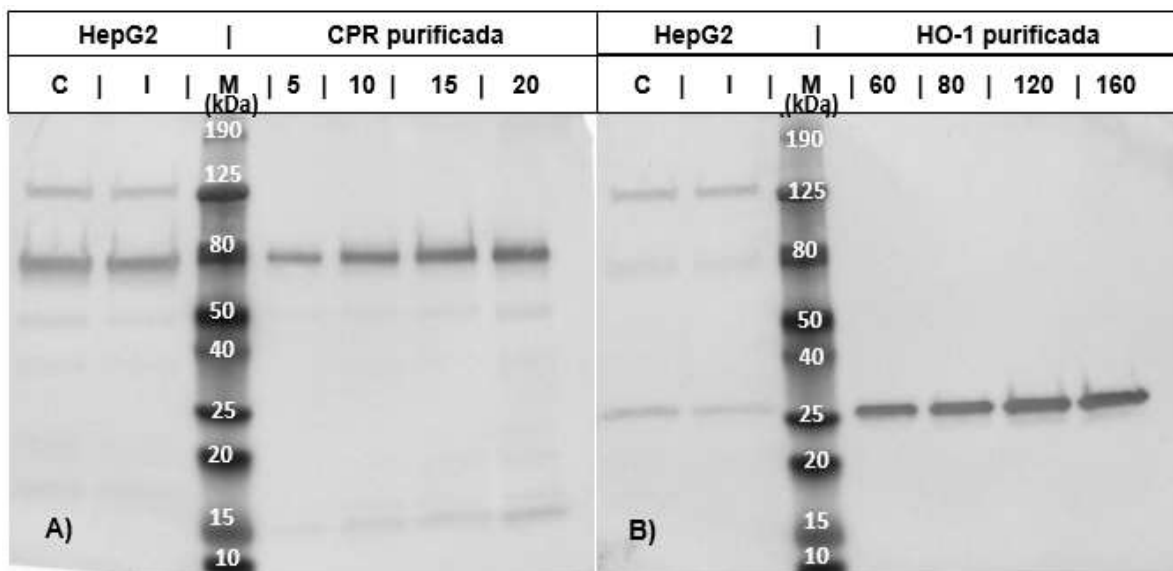


Figura III.4 - Imunodeteção de **A)** CPR e **B)** HO-1 presente nas amostras de lisado das células HepG2 (40 µg/poço). (C – HepG2 controlo; I – HepG2 induzidas); M – Marcador; CPR purificada: 5, 10, 15 e 20 ng; HO-1 purificada: 60, 80, 120 e 160 ng).

Tabela III.1 – Resultados da determinação semi-quantitativa da expressão de CPR e HO-1 nas amostras de células de HepG2 e PHH.

Amostra	pmol HO-1/mg	pmol CPR/mg	CPR/HO-1
HepG2 Controlo	10,8 ± 0,5	4,5 ± 0,5	1:2
HepG2 10 µM Heme	8,8 ± 0,4	4,3 ± 0,5	1:2
PHH Controlo	320 ± 3	27 ± 2	1:12
PHH 10 µM Heme	495 ± 5	32 ± 2	1:16

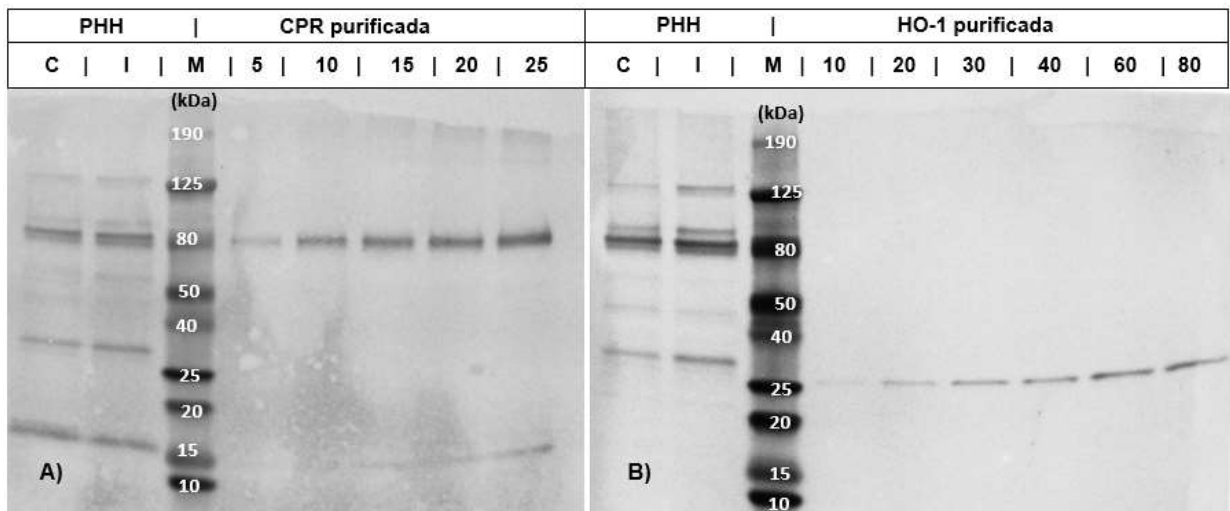


Figura III.5 - Imunodeteção de A) CPR e B) HO-1 presente nas amostras de lisado das células hepatócitos primários humanos (PHH) (17 µg/poço). (C – PHH controle; I – PHH induzidos; M – Marcador; CPR purificada: 5, 10, 15, 20 e 25 ng; HO-1 purificada: 10, 20, 30, 40, 60 e 80 ng).

Ao verificar as figuras III.4 e III.5 é possível observar mais claramente na figura III.5 a presença de sinais correspondentes a degradação da amostra e também das proteínas purificadas na imunodeteção de CPR.

III.2.2 Construção da estirpe de *E. coli* competente em NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I

Desenvolveu-se uma estirpe de *E. coli*, co-expressando as enzimas CPR e HO-1 humanas, utilizando um sistema de co-expressão bi-plasmídica. A estirpe PD301 foi transformada, por eletroporação (seção II.2.3.2), simultaneamente com os plasmídeos pLCM_POR e pCW_hHO-1, resultando na estirpe PD301_hHO-1_POR

As características de auxotrofia para L-arg (II.2.4.1) e presença de LPS^d (II.2.4.2) foram confirmadas pela utilização de meios seletivos. A presença dos dois plasmídeos (pCW_hHO-1e pLCM_POR) e das quantidades relativas supostas de cada um confirmou-se por eletroforese (dados não apresentados).

De forma a confirmar a sensibilidade das estirpes derivadas de PD301, verificando se teria ocorrido alguma alteração durante o procedimento de eletroporação que pudesse ter alterado a forma como a estirpe responde a mutagenicidade, foi utilizado o mutagénico 4-nitroquinolona-1-óxido (4NQO), mutagénico padrão para as estirpes PD301 (Duarte et al., 2005). Os candidatos selecionados foram testados a este composto (seção II.2.5.3), tendo o candidato número 8 apresentado uma melhor resposta em relação ao número de revertentes induzidos e um baixo número de revertentes espontâneos (Fig. III.6), característicos desta estirpe em estudos desenvolvidos neste laboratório.

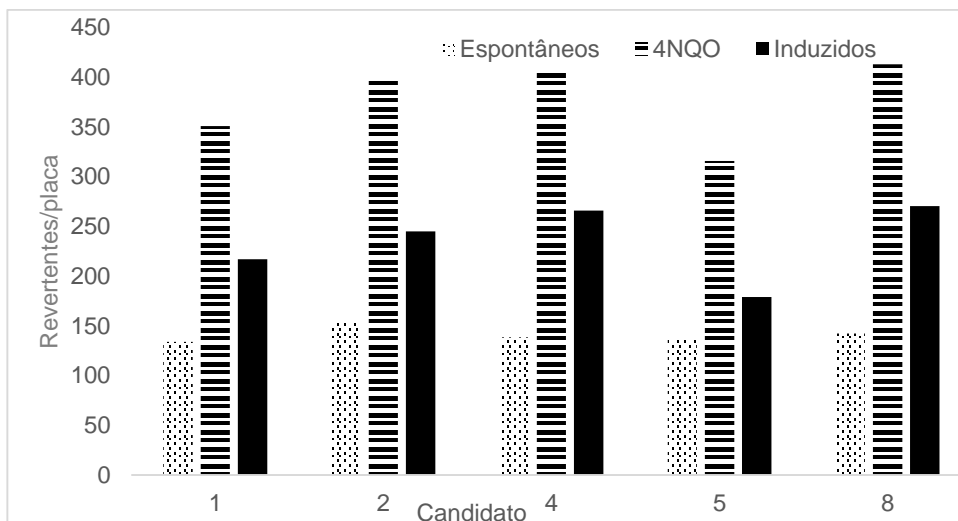


Figura III.6 - Mutagenicidade de 4-NQO nos candidatos PD301_hHO-1_POR. (dose de 0,15 µg/placa). Ensaio realizado em duplicado.

III.2.3 Otimização das condições de cultura de expressão heteróloga de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I humanas

No sentido de aproximar a estequiometria bacteriana à que se verificou nos PHH, foram estudados vários parâmetros das condições de cultura, nomeadamente, o arejamento (rpm), o tempo de crescimento e nível de indução [IPTG], e a influência destes na expressão relativa das proteínas humanas. Na tabela III.2 estão descritas as fases de otimização e respetivos resultados da estequiometria determinada por análise semi-quantitativa através da imunodeteção das proteínas CPR e HO-1. Durante a otimização foram usadas diretamente células bacterianas sem isolamento da fração membrana de forma a obter-se uma aproximação à estequiometria bacteriana verificada. Realizar o processo de isolamento a cada fase de otimização era inexecutável. O número de células por amostra foi normalizada (através de medição de DO) de forma a permitir comparar corretamente os valores da estequiometria entre as diferentes amostras de diferentes crescimentos.

Efetuararam-se as seguintes abordagens durante a otimização das condições de cultura:

1) Realizou-se o crescimento da cultura com as condições que são normalmente usadas neste laboratório (II.2.1.2). Estas condições demonstraram sucesso na cultura de outras estirpes PD301 competentes em proteínas humanas, tendo-se obtido estequiometrias dessas proteínas semelhantes às observadas *in vivo* (Kranendonk et al., 1999). Na presente abordagem, verificou-se uma estequiometria CPR/HO-1 de aproximadamente 1:63, distante dos 1:16 observados nos hepatócitos primários (Tabela III.1).

2) Para um estudo pormenorizado do crescimento desta estirpe ao longo do tempo realizou-se uma cultura com indução da expressão heteróloga durante 20 horas, retirando-se

amostras de hora em hora a partir das 8 horas do início da indução. Observou-se que foi mesmo às 8 horas que se verificou a estequiometria mais baixa (aproximadamente 1:64).

3) Com a indicação de um aparente elevado favorecimento da expressão de HO-1 em relação a CPR optou-se por mudar a abordagem de indução por IPTG logo no início da cultura e em vez disso realizar uma pré-cultura. Para esta nova abordagem estudou-se o crescimento da cultura sem indução (seção II.2.1.1), medindo a DO a 600 nm, de hora em hora até ao início da fase exponencial e a partir daí de duas em duas horas (Anexo – Fig. VII.2). Determinou-se que numa DO de 4, a cultura apresentava um crescimento a meio da fase exponencial. Assim, nesta nova abordagem iniciaram-se culturas com arejamento inferior (de 150 rpm em vez de 175 rpm) e pré-cultura até uma DO de 4. Nessa altura adicionou-se IPTG e δ -ala (percursor da síntese de heme), testando também as mesmas condições sem a presença de δ -ala. O tempo de indução foi de 3 horas, e a estequiometria CPR:HO-1 mais baixa verificada foi de aproximadamente 1:40 e 1:44, com e sem δ -ala, respetivamente. Isto é indicativo de que a presença ou ausência de δ -ala nesta concentração nestas condições de cultura, aparentemente, não afeta de forma relevante a estequiometria neste intervalo de tempo de indução.

4) Testou-se o efeito de diferentes concentrações de IPTG na cultura, utilizando-se três concentrações finais diferentes (0,1 mM, 0,2 mM e 0,3 mM) com as mesmas condições que o crescimento anterior (arejamento de 150 rpm e adição de δ -ala e IPTG só após DO=4). Obtiveram-se rácios mais em favor de HO-1 que na cultura anterior, mesmo na concentração de IPTG inferior, o que não resultou numa aproximação da estequiometria pretendida. Como não se observaram diferenças relevantes entre as diferentes concentrações de IPTG utilizadas, manteve-se a concentração de 0,2 mM até aqui utilizada.

5) De forma a avaliar o efeito de uma concentração mais elevada de δ -ala, realizaram-se três culturas, a primeira com as condições do último crescimento, mas com 100 μ M de δ -ala, induzindo-se durante 5 horas de forma a averiguar também se o aumento na quantidade de ambas as proteínas permanecia linear por mais que 3 horas de indução. As outras duas culturas foram induzidas durante 3 horas com uma pré-cultura até DO=6, adicionando-se uma concentração final de 100 μ M e 15 μ M de δ -ala. Em relação à primeira cultura, confirma-se um aumento linear na quantidade de ambas as proteínas ao longo do tempo, por isso aumentar o tempo de indução não parece ter efeito na diminuição da estequiometria. Nestas condições de cultura no que à presença de δ -ala diz respeito, e ao contrário do que se observou na abordagem 3 (com condições de cultura diferentes), verifica-se que uma concentração mais elevada de δ -ala reflete-se num grande aumento da quantidade das duas enzimas, especialmente em HO-1. Além disso, a indução numa fase de crescimento mais tardia aparenta favorecer uma expressão mais elevada de HO-1.

6) Tendo em conta os últimos dados, realizaram-se culturas com as mesmas condições da anterior, mas efetuando uma pré-cultura até uma fase de crescimento mais baixa (DO=2) e apenas durante 2 horas, de forma a averiguar se ocorria o efeito contrário favorecendo o aumento

da expressão de CPR ou uma menor expressão de HO-1. Utilizaram-se novamente concentrações diferentes de IPTG (0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM), sem presença de δ -ala. Determinaram-se estequiometrias inferiores, verificando-se uma menor expressão de HO-1, no entanto, CPR manteve-se nos níveis observados nas abordagens anteriores. As diferentes concentrações de IPTG voltaram a não resultar em alterações relevantes, sendo que 0,2 mM demonstrou mesmo a estequiometria mais baixa.

7) A indução durante três horas por 0,2 mM de IPTG com uma pré-cultura até DO=4, aparenta ser a melhor abordagem para se obter uma estequiometria mais baixa. Desta forma, optou-se por aplicar esta abordagem para o isolamento de membranas para verificar a estequiometria. No entanto, numa última tentativa de melhorar a expressão de CPR, a cultura foi suplementada com riboflavina (4 μ g/ml) e com uma concentração final de tiamina mais elevada (1 mM), flavinas que podem ser limitantes na síntese de CPR. Depois de uma pré-cultura até DO=4, foram adicionados 0,2 mM de IPTG e 15 μ M de δ -ala. A semi-quantificação realizou-se utilizando preparações membranares (secção II.2.5), caracterizando propriamente o material utilizado no restante estudo. A estequiometria de CPR:HO-1 obtida foi aproximadamente 1:57. Além destas abordagens, poderiam ter-se estudado parâmetros de modo a obter uma estequiometria melhor, mas devido à limitação de tempo decidiu prosseguir-se o estudo com as membranas obtidas nestas condições.

Tabela III.2 – Otimização das condições de crescimento da estirpe PD301_hHO-1_POR, e resultados de expressão das proteínas CPR e HO-1 e respetivas estequiometrias obtidas.

	Tempo de crescimento (h)	Pré-cultura até DO	Tempo de indução (h)	IPTG (mM)	δ -ala (μ M)	Arejamento (rpm)	pmol HO-1 _{1,2}	pmol CPR _{1,2}	CPR: HO-1
1	16	Não	16	0,2	15	175	22,094 ¹	0,350 ¹	63
2	20	Não	20	0,2	15	175	3,128 ¹	0,049 ¹	64
3	16	4	3	0,2	15	150	1,201 ¹	0,030 ¹	40
	16	4	3	0,2	0	150	0,922 ¹	0,021 ¹	44
4	15	4	3	0,1	15	150	5,030 ¹	0,086 ¹	58
	15	4	3	0,2	15	150	5,915 ¹	0,104 ¹	57
	15	4	3	0,3	15	150	4,105 ¹	0,062 ¹	66
5	16	4	5	0,2	100	150	7,132 ¹	0,099 ¹	72
	19	6	3	0,2	100	150	7,760 ¹	0,085 ¹	91
	19	6	3	0,2	15	150	6,513 ¹	0,065 ¹	99
6	13	2	2	0,05	0	150	4,278 ¹	0,092 ¹	46
	13	2	2	0,1	0	150	3,409 ¹	0,055 ¹	62
	13	2	2	0,2	0	150	4,531 ¹	0,107 ¹	42
7*	15	4	3	0,2	15	150	1407,9 ²	24,6 ²	57

* - amostras de membrana; 1 – pmol/DO; 2 – pmol/mg de proteína

III.2.4 Caracterização dos preparados membranares relativamente à expressão das proteínas heterólogas

Depois das condições de crescimento da cultura PD301_hHO-1_POR estarem fixadas, utilizaram-se essas condições para o crescimento de culturas de todos os controlos (apenas com expressão de CPR, apenas com expressão de HO-1, e sem expressão das duas proteínas). E procedeu-se em seguida ao isolamento das membranas (seção.II.2.5) para determinação da concentração proteica e da expressão de CPR e HO-1.

A determinação da concentração de proteínas totais nas amostras membranares de cada estirpe foi realizada pelo método de Bradford, verificando-se uma concentração de proteína semelhante entre todas as estirpes.

O conteúdo de CPR nas amostras membranares foi determinado através de imunodeteção, e pelo ensaio de redução do cit. c. Este ensaio além de possibilitar avaliar a atividade de CPR nos microsomas isolados, permite também validar os resultados obtidos através da imunodeteção, em relação à expressão de CPR nas mesmas amostras. Sabendo o aumento de absorvância a 550 nm do cit. c reduzido, o coeficiente de absorvidade molar do cit. c ($21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a atividade específica de CPR para a redução de cit. c (3200 min^{-1}) é possível determinar com rigor o conteúdo de CPR na amostra de proteínas totais.

Após o ensaio de redução do cit. c por CPR, obteve-se uma concentração de CPR de $27,3 \pm 0,7 \text{ pmol/mg}$ nas membranas da estirpe PD301_hHO-1_POR, e $35,6 \pm 0,3 \text{ pmol/mg}$ para PD301_POR (Tabela III.3). É de realçar nas membranas de PD301_hHO-1 e de BTC⁰ foi detetada atividade considera ruído e o valor encontrado em BTC⁰ foi depois subtraído aos valores do conteúdo de CPR nas membranas contendo expressão de CPR. Através de imunodeteção determinaram-se valores semelhantes no conteúdo de CPR presente, para PD301_hHO-1_POR verificou-se $24,6 \pm 0,001 \text{ pmol/mg}$, enquanto para PD301_POR $35,2 \pm 0,001 \text{ pmol/mg}$ (Tabela III.3). No que diz respeito ao conteúdo de HO-1 determinado por semi-quantificação, verificou-se que as duas estirpes competentes em HO-1 demonstraram valores de expressão relativa próximos (Tabela III.3).

Tabela III.3 – Conteúdo de CPR nas amostras membranares de cada estirpe determinados através do ensaio de redução do citocromo c por CPR e através de imunodeteção.

Estirpe	Conteúdo CPR pmol/mg		Conteúdo HO-1 pmol/mg
	Redução cit. c	Imunodeteção	Imunodeteção
PD301_hHO-1_POR	$27,3 \pm 0,7$	$24,6 \pm 0,001$	$140,8 \pm 0,2$
PD301_POR	$35,6 \pm 0,3$	$35,2 \pm 0,001$	-
PD301_hHO-1	-	-	$119,2 \pm 0,2$
BTC ⁰	-	-	-

Observando ainda a imunodeteção verifica-se que todas as estirpes apresentam o sinal correspondente às proteínas que expressam (Fig. III.7). Nas amostras de PD301_POR apenas se verifica a banda correspondente ao peso molecular de CPR de aproximadamente 76 kDa, enquanto as de PD301_hHO-1 apenas apresentam a banda correspondente aos 32 kDa de HO-1. Nas amostras de PD301_hHO-1_POR verificam-se as duas bandas correspondentes a CPR e HO-1. A estequiometria de CPR:HO-1 na estirpe PD301_hHO-1_POR, determinada por semi-quantificação foi de aproximadamente 1:57.

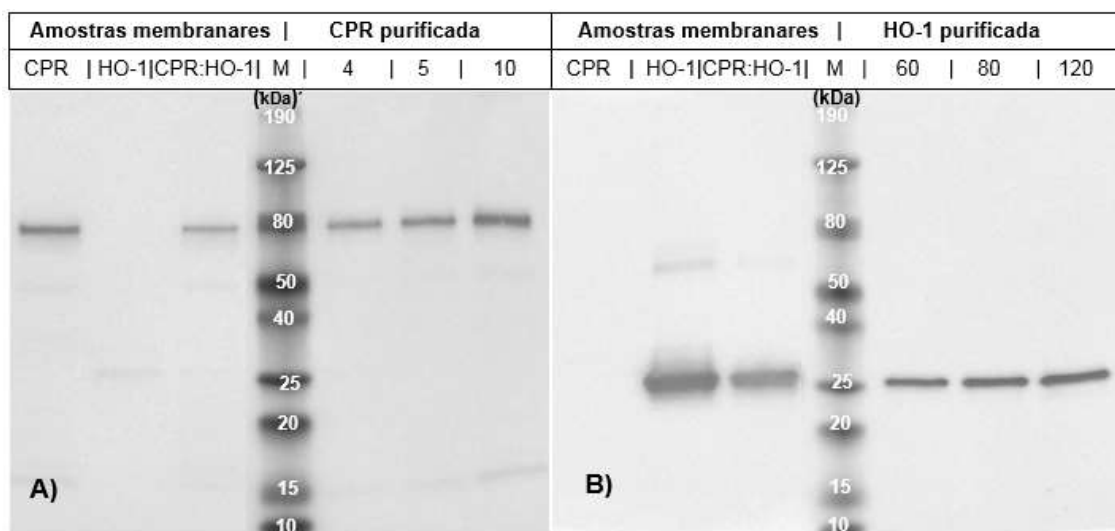


Figura III.7 – Imunodeteção da expressão de CPR (A) e HO-1 (B) nas amostras membranares das várias estirpes. (CPR – 2 µg de PD301_POR; HO-1 – 4 µg de PD301_hHO-1; CPR:HO-1 – 2 µg de PD301_hHO-1_POR; M – Marcador; CPR purificada: 4, 5 e 10 ng; HO-1 purificada: 60, 80 e 120 ng)

III.3 Desenvolvimento de um ensaio de medição da atividade de heme oxigenase I com membranas bacterianas

Com o objetivo de medir a atividade de HO-1 nas amostras membranares obtidas neste estudo, foi desenvolvido um ensaio de cinética de HO-1. Foi reportado no laboratório de Wayne Backes, utilizando várias abordagens com enzimas purificadas (Reed et al., 2010), o desenvolvimento de ensaios que permitem estudar a atividade de HO-1 através da formação dos produtos resultantes da ação catabólica de HO-1 sobre heme (Fig. III.8). Nesse estudo foram investigados diversos parâmetros que pudessem otimizar a medição da formação dos produtos resultantes, nomeadamente, foram testados os efeitos do pH da mistura reacional, o uso de diferentes tampões, e os efeitos da enzima catalase que degrada o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), cuja presença inibe a atividade de HO-1. Embora a medição da formação de bilirrubina seja o ensaio mais frequentemente utilizado para o estudo de cinética de HO-1, verificou-se que a formação do complexo cromofórico entre o ferro libertado e ferrozina fornece uma alternativa eficaz e mais simples na medição da atividade de HO-1, principalmente por ser uma medição

direta, ao contrário do que ocorre no ensaio da bilirrubina cuja adição de biliverdina redutase (BVR) é necessária (Reed et al., 2010). No presente estudo, adaptou-se a abordagem da formação do complexo entre o ferro e ferrozina e foi feita uma verificação inicial de alguns parâmetros.

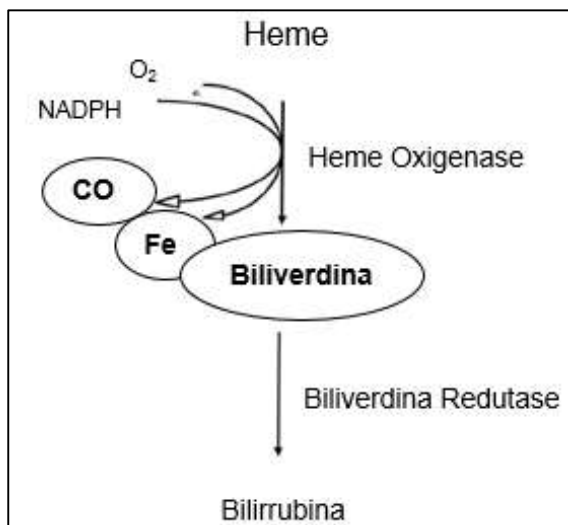


Figura III.8 – Via Catabólica de Heme. A heme oxigenase catalisa a degradação de heme em quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), ferro (Fe) e biliverdina, sendo esta última subsequentemente reduzida em bilirrubina pela biliverdina redutase.

III.3.1 Complexo Fe²⁺ -ferrozina

Sabendo que o complexo formado pelo Fe²⁺ e ferrozina possui um pico máximo de absorvância entre os 562 nm e os 564 nm e o seu coeficiente de extinção (ϵ) é de 27,9 mM⁻¹ cm⁻¹ (Berlett et al., 2001), começou por confirmar-se a formação do complexo em três tampões diferentes, MOPS, fosfato de potássio (K/P), e Tris, todos com uma concentração de 0,1 M e pH 7,2 (Reed et al., 2010). Foi preparada uma solução de Fe²⁺ (seção II.2.9.1) adicionando-se numa concentração final de 50 μ M a cada tampão. Posteriormente foi adicionada 250 μ M de ferrozina (Reed et al., 2010) (seção II.2.9.1) e realizou-se um varrimento de comprimento de onda dos 400 aos 700 nm. Verificou-se que os valores do pico máximo de absorvância e do ϵ do complexo Fe²⁺ - ferrozina formado (Tabela III.4) é similar entre todos os tampões e com os valores descritos na literatura (Berlett et al., 2001).

Tabela III.4 – Detecção dos picos máximos de absorvância do complexo Fe²⁺ - ferrozina, e respetivo coeficiente de extinção (ϵ) em três tampões diferentes, MOPS, fosfato de potássio (K/P) e Tris-Base (Tris) (0,1 M e pH 7,2).

Pico máximo	ϵ mM ⁻¹ cm ⁻¹	Tampão
563 nm	26,8 ± 0,3	MOPS
562 nm	24,6 ± 0,6	K/P
562 nm	26,7 ± 0,7	Tris

Realizou-se uma curva de calibração com várias concentrações de Fe^{2+} de forma a verificar o aumento de absorvância a que corresponde a libertação de ferro e verificar também a sensibilidade do ensaio e do equipamento utilizando concentrações de Fe^{2+} baixas. Prepararam-se várias concentrações de Fe^{2+} (obtido como descrito na seção II.2.9.1) em tampão K/P, e adicionando-se ferrozina com concentração final de $250\mu\text{M}$, e mediu-se a absorvância a 562 nm (seção II.2.9.2). Obteve-se assim a curva de calibração (Fig. III.9)., correspondendo a cada $1\mu\text{M}$ de ferro libertado, um aumento de $0,0238$ na absorvância, correspondendo a um ϵ de $23,8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, indicativo de elevada sensibilidade uma vez que está em concordância com a literatura e com os valores obtidos nos ensaios anteriores (Tabela III.4)

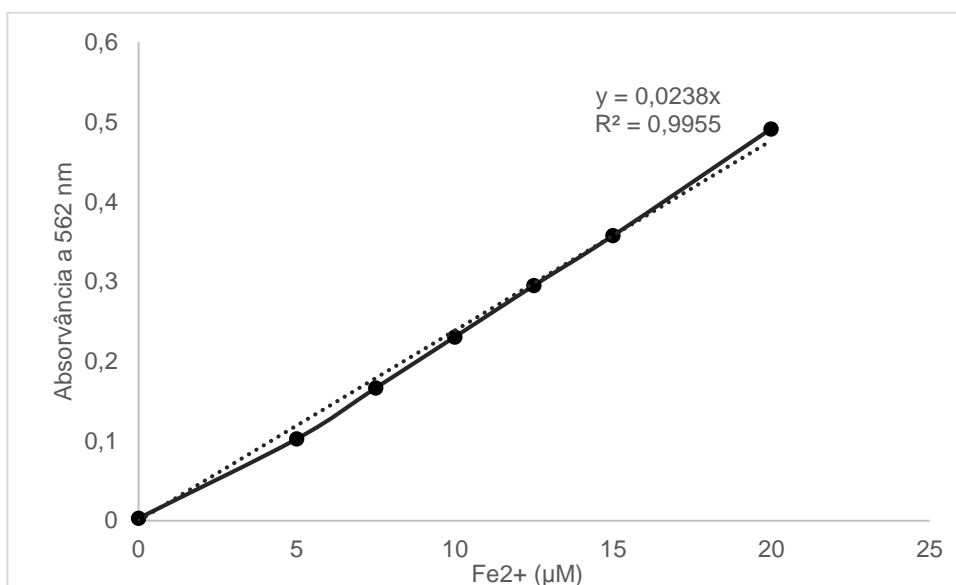


Figura III.9 – Curva de calibração com várias concentrações de Fe^{2+} em contacto com ferrozina.

III.3.2 Atividade de heme oxigenase I em amostras membranares bacterianas

Nesta fase do trabalho, foram aplicadas as amostras membranares bacterianas para otimização do ensaio de cinética, sendo um dos objetivos determinar o efeito da enzima catalase no ensaio. Foi documentado em estudos recorrendo a enzimas purificadas e também em sistemas de lipossomas artificiais, que a catalase estabiliza a atividade catalítica de HO-1, permitindo seguir a atividade linearmente durante mais tempo (Huber et al., 2009; Reed et al., 2010).

Inicialmente, seguindo as condições descritas por Reed et al. (2010) (II.2.9.3), não foi possível detetar qualquer atividade de HO-1. Isto podia dever-se à fraca penetração da ferrozina nos microssomas das preparações membranares. Nos ensaios de redução do cit. c por CPR é incluído um detergente (Triton X-100) para otimizar o ensaio, de forma aos reagentes terem acesso aos microssomas. Numa nova abordagem ao ensaio foi incluído Triton X-100 (nas mesmas condições quando utilizado no ensaio de redução do cit. c, numa concentração final de $0,04\%$) para garantir que os reagentes alcancem os microssomas. Nos ensaios de cinética com

estas condições, detetou-se um aumento em tempo, da absorvância a 562 nm. No entanto, isto verificou-se em todos os controlos, por isso não podia ser resultante de atividade de HO-1 pela deteção do complexo ferro-ferrozina. (Fig. III.10).

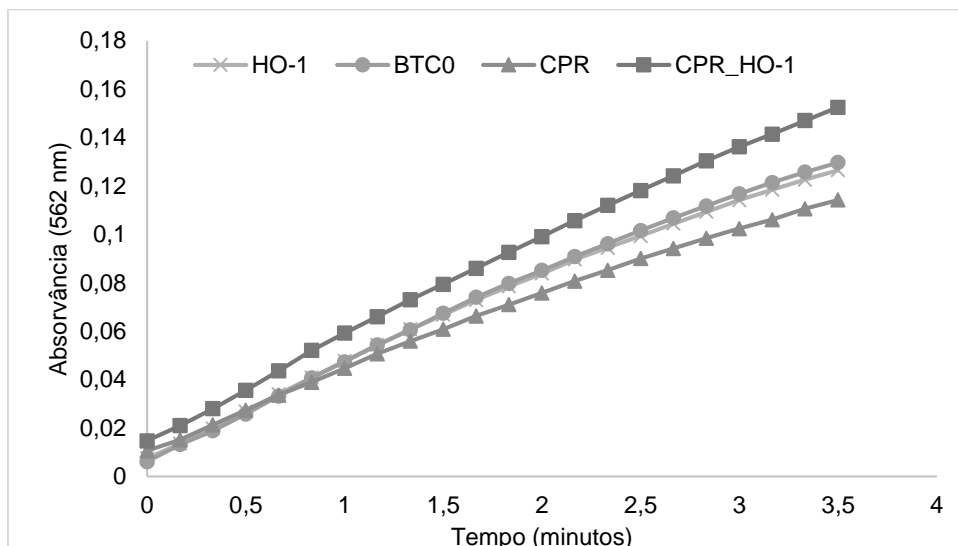


Figura III.10 – Aumento em tempo (minutos) da absorvância a 562 nm em todas as amostras membranares através da formação do complexo fe^{2+} -ferrozina. Os testes foram realizados em triplicado, incluindo todos os controlos.

Procedeu-se então a diversos ensaios para avaliar o efeito de vários fatores no estudo reacional que pudessem ser responsáveis pelo resultado obtido. Realizou-se um ensaio com todos os componentes sem amostra membranares para verificar se o heme era degradado espontaneamente, o que podia explicar a formação do complexo fe^{2+} -ferrozina mesmo nas membranas controlo sem expressão de HO-1. Contudo, não se detetou a formação do complexo neste ensaio (dados não apresentados). Para verificar se a amostra membranares interferia com a formação do complexo fe^{2+} -ferrozina, decidiu-se realizar um novo varrimento de comprimento de onda dos 400 nm aos 700 nm, utilizando diferentes abordagens (Tabela III.5).

Tabela III.5 – Descrição dos componentes utilizados em cada abordagem teste de varrimento do espectro a 400-700 nm.

Abordagens		Componentes
A		Ferrozina + ferro reduzido, sem NADPH
B		Ferrozina + ferro reduzido + membrana BTC ⁰ , sem NADPH
C	C ₁	Ferrozina + 30 µM heme + membrana BTC ⁰ , com NADPH
	C ₂	Ferrozina + 30 µM heme + membrana PD301_hHO-1_POR, com NADPH

Nas abordagens A e B detetou-se o pico máximo nos 562 nm, característico da formação do complexo ferro-ferrozina (Fig. III.11). Na última abordagem, (C), não se detetou pico a 562 nm em ambos (Fig. III.12). Isto pode indicar que ocorre uma reação desconhecida que eventualmente resulta na formação de um produto fruto da presença de algum substrato presente por exemplo na amostra membranar, que interfere com a medição da formação do complexo de Fe²⁺ e ferrozina.

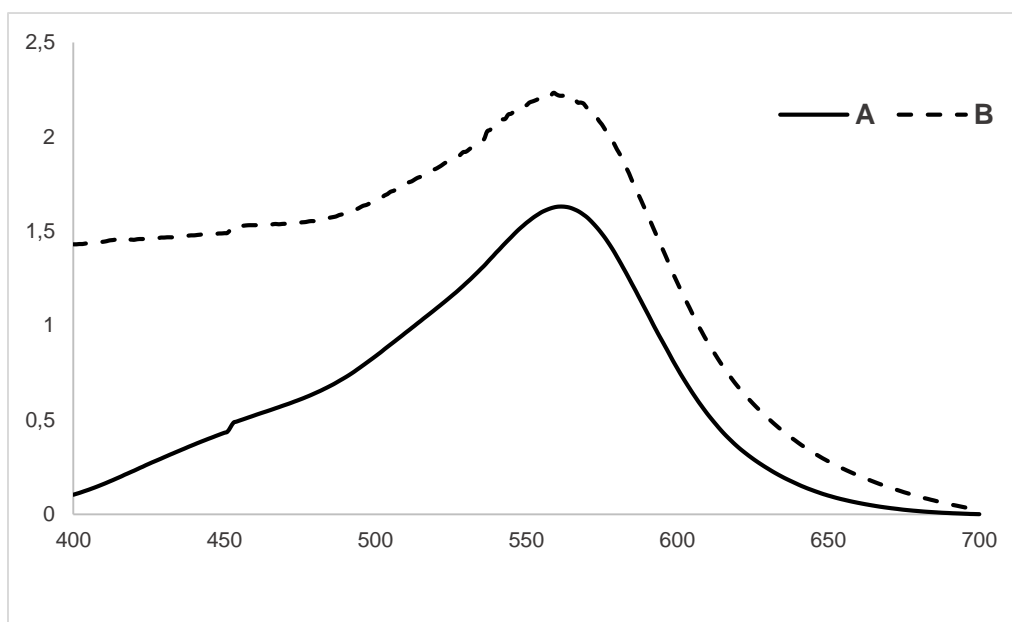


Figura III.11 – Varrimento do comprimento de onda entre 400-700 nm das reações A) com ferrozina e Fe²⁺, sem NADPH; e B) ferrozina, Fe²⁺ e com membrana BTC⁰, sem NADPH.

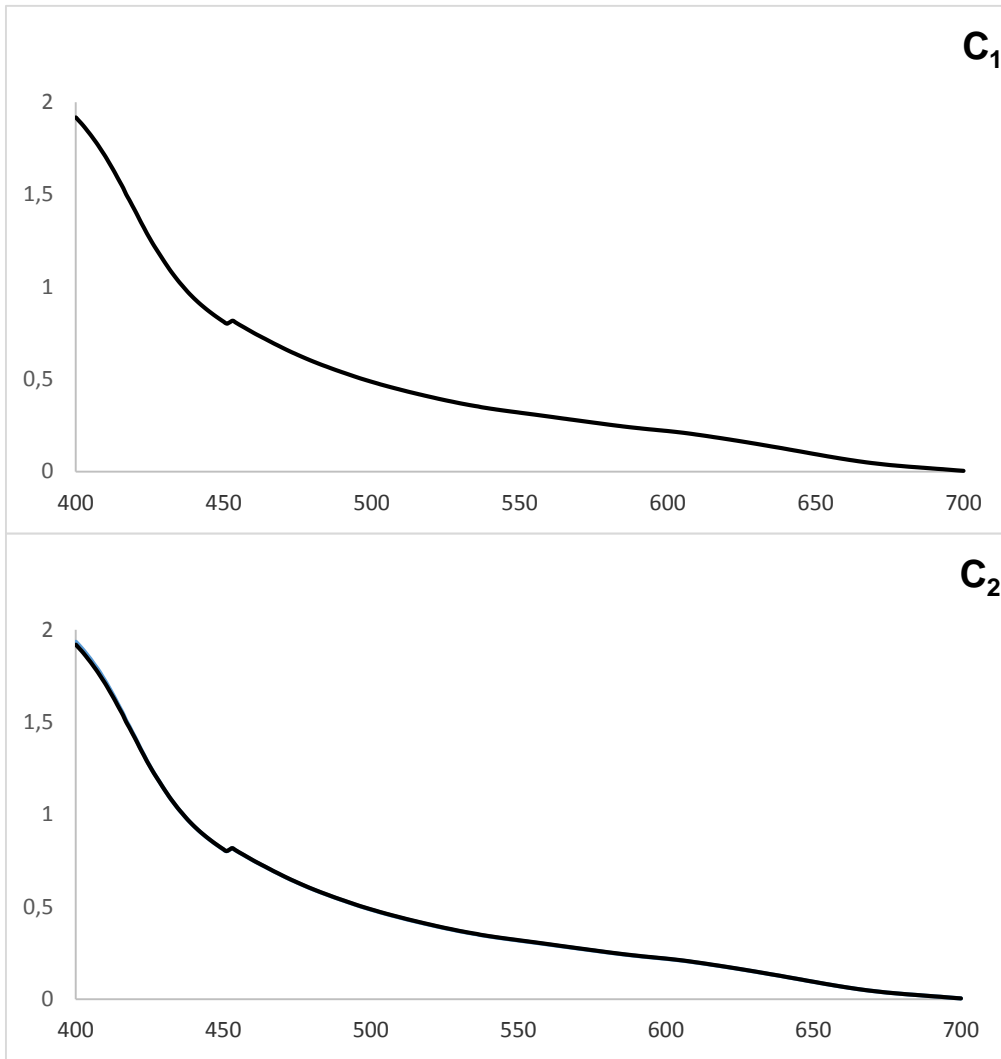


Figura III.12 – Varrimento do comprimento de onda entre 400-700 nm das reações C₁) com ferrozina e 30 μ M heme com membrana BTC⁰ e NADPH; C₂) com ferrozina e 30 μ M heme com membrana PD301_hHO-1_POR e NADPH

IV - Discussão

O ser humano está diariamente exposto a múltiplos xenobióticos como por exemplo, fármacos, que são absorvidos pelo organismo. A sua eliminação depende muitas vezes da biotransformação. A biotransformação, catalisada por enzimas específicas da biotransformação, como por exemplo, CYP e SULT, é o processo metabólico responsável pela modificação das propriedades físico-químicas e bioquímicas dos xenobióticos, resultando em produtos facilmente excretáveis favorecendo a destoxificação (Parkinson, 2001). No entanto, por vezes, compostos inicialmente com menor grau de toxicidade, podem ser bioativados a intermediários reativos. Esta bioativação a metabolitos reativos resulta frequentemente em toxicidade (ADR em caso de fármacos) que colocam muitas vezes em risco a saúde do ser humano. Além disso grande parte das enzimas de biotransformação apresenta polimorfismos genéticos, por isso é de todo o interesse adquirir maior conhecimento acerca das vias metabólicas que desencadeiam a formação destes metabolitos e os seus efeitos tóxicos. (Palma et al., 2010). A aplicação de sistemas *in vitro* competentes em enzimas de biotransformação é uma importante ferramenta para este tipo de estudos, permitindo ainda o estudo dos mecanismos moleculares nas interações entre estas enzimas.

IV.1 Estudo da bioativação de 12-OH-NVP

NVP é um fármaco antirretroviral utilizado no tratamento do vírus HIV-1. Devido à sua elevada eficácia, principalmente na prevenção da transmissão vertical do vírus, é um dos fármacos mais prescritos como monoterapia ou em terapia combinada. No entanto, apesar da sua eficácia, está atualmente associada a respostas tóxicas como erupções cutâneas severas ou hepatotoxicidade (Caixas et al., 2012)

Na metabolização de NVP, sugere-se a formação de um intermediário quinona-metídeo a partir de 12-OH-NVP. Este intermediário reativo tem sido associado à causa dos efeitos adversos causados por NVP (Chen et al., 2008; Wen et al., 2009). No fígado sugerem que o quinona-metídeo formado pela oxidação de 12-OH-NVP origine lesões hepáticas por ligação com proteínas do fígado (Sharma et al., 2012). Já na pele postula-se que o quinona-metídeo, formado por sulfonação de 12-sulfoxi-NVP (formado por ação de SULT sobre 12-OH-NVP) ao perder o grupo sulfato pode fazer com que o quinona-metídeo se ligue a proteínas da pele, resultando nas erupções cutâneas (Sharma et al., 2013) (Fig. I.5). Além destas ADR descritas, foi também indicada hépato-carcinogenicidade de NVP em roedores (Anonymous, 2009). Contudo em testes convencionais *in vitro*, ainda não foram encontradas indicações de que NVP seja mutagénica ou clastogénica (Antunes et al., 2008). Uma das razões por isso não ter sido ainda demonstrado pode dever-se aos intermediários reativos serem gerados externamente, limitando a entrada destes nas células alvo. O desenvolvimento de novos sistemas celulares *in vitro*, metabolicamente competentes, expressando enzimas de biotransformação humanas permite ultrapassar essa dificuldade (Kranendonk et al., 2000).

Estirpes de *S. typhimurium* de Ames foram desenvolvidas para expressão heteróloga de SULTs (Glatt e Meini, 2004b) o que permite elevada sensibilidade na deteção de compostos bioativados por estas enzimas. Num estudo anterior deste laboratório, a Dr^a Mónica Alves, desenvolveu estirpes de *S. typhimurium* de Ames competentes em SULT1A1 humanas, a MA98_SULT1A1 e MA100_SULT1A1 (Tabela II.4), otimizando as condições de cultura para uma atividade máxima destas enzimas na bioativação de pro-mutagénios (Alves, 2013). Realizou o estudo de bioativação do composto 12-OH-NVP (metabolito de NVP) por SULT1A1, através de ensaios de mutagenicidade com estas estirpes. Inicialmente foi detetada mutagenicidade de 12-OH-NVP na estirpe MA98_SULT1A1. Contudo, ao complementar esse estudo para verificar o papel de SULT1A1 na bioativação de 12-OH-NVP, não se obtiveram resultados reprodutíveis, tendo sido otimizados diversos parâmetros que resultaram na alteração das condições de cultura dessa estirpe. Como assinalado nos resultados (seção III.1), por indicação de problemas com o nível de impureza de 12-OH-NVP usada anteriormente, adquiriu-se 12-OH-NVP com pureza $\geq 98\%$.

No presente estudo, utilizando 12-OH-NVP com maior grau de pureza, utilizando as estirpes MA98_SULT1A1, e a estirpe de Ames TA98 (sem expressão de SULT1A1), aplicou-se um gradiente linear de doses (Fig. III.2). Obteve-se atividade mutagénica na estirpe MA98_SULT1A1, de 34 ± 1 colónias revertentes por μmol de 12-OH-NVP, enquanto na estirpe comparável sem expressão de SULT1A1, não se verificou atividade mutagénica. Isto indica que SULT1A1 desempenha um papel na mutagenicidade de 12-OH-NVP. Para confirmar o papel de SULT1A1 na bioativação de 12-OH-NVP, utilizou-se o PCP, um inibidor específico de SULT1A1. Aplicado numa concentração final de $1,8 \mu\text{M}$, verificou-se uma supressão completa da atividade mutagénica de 12-OH-NVP ($p < 0,001$) (Fig. III.3A). De forma a provar que este efeito não se devia a citotoxicidade de PCP em *S. typhimurium* LT2, testou-se a estirpe TA98 com o mutagénico direto 2NF em combinação com a mesma dose de PCP utilizada no teste anterior, não se tendo verificado diminuição da atividade mutagénica de 2NF (Fig. III.3B). Estes dados relativos ao inibidor de SULT1A1 confirmam que SULT1A1 é responsável para a bioativação de 12-OH-NVP.

Recentemente, num estudo de farmacocinética com um grupo de pacientes infetados por HIV-1, recebendo doses diárias recomendadas de NVP, verificou-se uma concentração de NVP no plasma que variava entre 1 a 26 mg/L (Dickinson et al., 2014). Estudos *in vivo* em humanos indicam que aproximadamente um terço da dose diária de NVP é hidroxilada pelo CYP3A4 em 12-OH-NVP, que é normalmente glucoronado (Riska et al., 1999). No presente estudo, utilizando doses com uma magnitude superior de 12-OH-NVP relativamente à concentração de NVP encontrada no grupo de pacientes, verificou-se atividade mutagénica na estirpe MA98_SULT1A1. Embora no presente estudo tenha sido utilizada uma dose superior, a concentração de 12-OH-NVP que chega a SULT1A1 no interior das células na estirpe MA98_SULT1A1 é muito menor que a concentração extracelular. Além disso, a concentração hepática de NVP será muito superior que a concentração encontrada nas amostras de sangue

sistémico recolhidas dos pacientes, pois um fármaco ao ser ingerido, é primeiro absorvido pelo sistema digestivo entrando depois no sistema portal hepático (Parkinson, 2001). Assim, com os dados obtidos no presente estudo, é possível assumir que, em pacientes recebendo a dose diária recomendada de NVP, pode ocorrer mutagenicidade de NVP dependente de SULT, no fígado. Esta ideia é ainda reforçada pelo facto da via de destoxificação de glucoronidação de 12-OH-NVP ser afetada por polimorfismos genéticos na UGT (Stingl et al., 2014) e pela atividade de CYP3A4 em formar 12-OH-NVP ser favorecida em função de atividades reduzidas noutras formas de CYP (como por exemplo CYP2B6) metabolizadoras de NVP para os metabolitos 2-,3- e 8-hidroxi, devido a frequentes polimorfismos encontrados nessas enzimas (Michaud et al., 2012).

Os dados obtidos neste estudo são ainda mais críticos no que diz respeito à administração de NVP em quadros perinatais e pediátricos, como uma escolha de primeira linha entre todas as terapias iniciais. De acordo com um recém-publicado proteoma humano, em que CYP3A4 é indicado como o principal citocromo P450 existente no fígado fetal humano (<http://www.humanproteomemap.org>), favorecendo a formação de 12-OH-NVP sobre as outras vias de NVP. Além disso, o fígado fetal possui baixos níveis de UGTs (Stingl et al., 2014), o que reduzirá a destoxificação de 12-OH-NVP através de glucoronidação, conduzindo possivelmente a níveis elevados de 12-OH-NVP. Outro facto crítico a respeito do tratamento de crianças com NVP é que as sulfotransferases da sub-família de SULT1A, como por exemplo a SULT1A1 são expressas em níveis elevados no tecido hepático fetal (Kim et al., 2014). E além disso, a sulfotransferase SULT1C4, capaz de bioativar um vasto espectro de procarcinogéneos está presente em elevadas concentrações no fígado fetal (Kim et al., 2014). Apesar das dosagens de NVP administradas nesta faixa etária serem adaptadas à menor capacidade de biotransformação, os dados do presente estudo indica que existem elevadas possibilidades de ocorrer mutagenicidade hepática por NVP em quadros perinatais e pediátricos.

IV.2 Desenvolvimento de uma estirpe de *E. coli* competente em NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I humanos

A segunda fase do trabalho consistiu no desenvolvimento de um sistema bacteriano de *E. coli* competente na expressão das proteínas humanas CPR e HO-1, de forma a ser aplicado no estudo de cinética de HO-1. Foram realizados diversos estudos neste laboratório, recorrendo a modelos celulares bacterianos competentes em enzimas de biotransformação humanas, nomeadamente para estudos acerca do mecanismo molecular do complexo enzimático de CYP, e o seu parceiro redox, CPR (Duarte et al., 2005; Palma et al., 2013). A atividade de CYP é dependente de eletrões doados pela enzima CPR, num processo específico de transferência de eletrões de um modo faseado (*gated*) em que ocorrem grandes alterações conformacionais em CPR, funcionando entre uma conformação aberta e fechada (Hamdane et al., 2009; Sugishima et al., 2014). Apesar de diversos estudos já realizados, permanecem questões por responder, como por exemplo, os fatores que estão envolvidos na transferência faseada de eletrões tal como

os fenómenos que conduzem à alteração conformacional de CPR durante o processo de transferência de eletrões. Existem polimorfismos no gene codificante de CPR (POR), estando alguns destes ligados à Síndrome de ABS. O estudo destes variantes polimórficos podem auxiliar na compreensão do mecanismo molecular do funcionamento de CPR. Neste laboratório, foram já realizados estudos sobre a caracterização e efeito de alguns desses mutantes na transferência de eletrões, recorrendo a sistemas bacterianos competentes em CYP e formas mutantes de CPR associados à Síndrome ABS (Kranendonk et al., 2008; Marohnic et al., 2010; Moutinho et al., 2012). Estes estudos visam auxiliar na resposta das questões acima descritas.

Para ser aplicado em estudos de cinética, é importante que o sistema de *E. coli* competente em CPR e HO-1 reflita as quantidades relativas destas proteínas que se verificam *in vivo*. O sistema CPR:CYP, anteriormente desenvolvido neste laboratório, permitiu realizar alguns estudos importantes, mas foi dada relevância a HO-1 uma vez que é um parceiro redox de CPR que se destaca relativamente a CYP pois utiliza sete eletrões para cada ciclo enzimático, em vez dos dois eletrões que sustentam a atividade de CYP. Isto permitirá complementar o conhecimento adquirido com o uso do sistema competente em CPR e CYP.

No presente estudo, foi construída a estirpe PD301_hHO-1_POR, através da transformação da estirpe de *E. coli* K12 PD301, desenvolvida por Kranendonk e colaboradores, com um sistema bi-plasmídico (pCW_hHO-1 e pLCM_POR), contendo expressão de HO-1 e CPR humanas. Em estudos anteriores, em células bacterianas competentes em CYP e CPR humanos, utilizando esta estratégia de co-expressão bi-plasmídica permitiu obter uma estequiometria destas proteínas semelhante à verificada em microsomas de fígado humano (Kranendonk et al., 1999), pelo que no presente estudo se recorreu à mesma estratégia para tentar mimetizar um rácio de HO-1 e CPR semelhante ao que se verifica em humanos.

IV.2.1 Determinação das quantidades relativas de NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I em células humanas

Existe pouca informação relativamente à estequiometria de CPR:HO-1, tendo sido determinada um rácio de aproximadamente 1:3 em microsomas de roedores expostos a cádmio (Reed et al., 2011). No presente estudo utilizaram-se células humanas de hepatócitos para determinar as quantidades relativas das duas proteínas. Primeiro a estratégia passou pela utilização de linhas celulares HepG2, com os resultados a revelarem-se inconclusivos devido à indiferenciação destas células (Timbrell, 2009). Subsequentemente recorreu-se a células de PHH, detetando-se uma estequiometria de aproximadamente 1:16 nas células induzidas com heme e de aproximadamente 1:12 nas células controlo. Verifica-se que o conteúdo de CPR é semelhante entre as células expostas a heme e o controlo (Tabela III.1). No que diz respeito ao conteúdo de HO-1, nas células induzidas observa-se um valor cerca de 1,5 vezes superior ao conteúdo nas células controlo (Tabela III.1).

Nas imunodeteções dos lisados de HepG2 e PHH (Fig III.4 e III.5) são visíveis bandas para além das correspondentes ao sinal das proteínas purificadas, o que não se verifica por exemplo na imunodeteção dos preparados membranares bacterianos (Fig. III.7). Ao analisarem-se essas bandas, verificou-se que o tamanho corresponde possivelmente a hétero-dímeros de CPR:HO-1 e oligómeros de HO-1. As amostras foram utilizadas em condições desnaturantes (SDS-PAGE), no entanto as proteínas permanecem ligadas, indicando forte ligação entre elas. Anteriormente pensava-se que HO-1 funcionava como um monómero, no entanto um estudo anterior indicou que HO-1 se encontra em oligómeros no retículo endoplasmático, e que esses aglomerados são estruturalmente modificados na presença de CPR (Marohnic et al., 2011). Esta oligomerização poderá ser essencial ao funcionamento de HO-1 e nas interações com outras proteínas como é o caso de CPR e BVR (Hwang et al., 2009). Estas duas proteínas podem ligar-se em locais de HO-1 parcialmente sobrepostos (Higashimoto e Sugishima, 2008), e assim é possível ligarem-se simultaneamente a múltiplas moléculas de HO-1, facilitando a reação cooperativa de degradação de heme e subsequente formação de bilirrubina (Hwang et al., 2009).

IV.2.2 Otimização das condições de cultura da estirpe de *E. coli* competente em NADPH citocromo P450 oxido-redutase e heme oxigenase I humanos

A fase seguinte do estudo focou-se na otimização das condições de cultura da estirpe de *E. coli* competente em CPR e HO-1 humanos de forma a tentar aproximar o mais possível a expressão destas proteínas à estequiometria verificada nos PHH. Com o conhecimento prévio de estudos neste laboratório em que se otimizaram culturas de *E. coli*, co-expressando CPR e CYP com as estequiometrias pretendidas, no presente estudo foram alterados vários parâmetros como o arejamento (rpm), o tempo de crescimento e o nível de indução (IPTG) (Tabela III.2). A temperatura de crescimento não foi um dos parâmetros estudados uma vez que afeta o modo como as proteínas são inseridas na membrana, e que pelo conhecimento prévio na expressão heteróloga de CYP e CPR, foi sempre realizado crescimento a 28°C (Kranendonk et al., 1999). No entanto, o crescimento abaixo dos 28°C poderia ser mais um parâmetro a estudar.

Recorreu-se a um método de deteção semi-quantitativa da expressão das proteínas, utilizando amostras de células inteiras de cada cultura realizada para o processo ser mais célere, permitindo cobrir uma maior variação nos parâmetros. As amostras foram normalizadas por número de células (DO fixa) para permitir uma comparação direta entre as diferentes amostras de crescimentos. A semi-quantificação por imunodeteção é um método que permite uma aproximação ao valor real, contudo pode existir alguma variação, ainda mais tendo em conta que são usadas amostras de células inteiras. No entanto, como descrito nos resultados, efetuar o isolamento da fração membrana em cada fase de otimização era inexecutável tendo em conta o tempo disponível.

A abordagem que mais se aproximou dos rácios pretendidos (abordagem 3, Tabela III.2) foi aplicada para isolar as membranas, determinando-se uma estequiometria de aproximadamente 1:57 (Tabela III.2). Era esperado um valor mais próximo de 1:40, obtido na abordagem 3, contudo o processo de isolamento membranar pode afetar a estabilidade proteica, por exemplo devido à presena de prot ases e pela presena de apenas PMSF e EDTA como inibidores de prot ases.   provável por isso que tenha ocorrido maior desnaturao CPR, relativamente ao HO-1 pelas características delicadas da sua estrutura (Aigrain et al., 2009), levando a um rácio mais em favor de HO-1 do que o verificado utilizando as amostras de células inteiras. No entanto, devido à limitao de tempo não foi possível verificar mais parâmetros (como por exemplo temperatura de cultura abaixo de 28 ) e utilizaram-se estas condioes para isolar as membranas a serem utilizadas no desenvolvimento do teste de cinética de HO-1.

Existem outras abordagens que poderiam ser estudadas no futuro, de forma obter-se uma estequiometria de CPR:HO-1 mais próxima da que se determinou nos PHH. Uma das possíveis abordagens, seria adicionar posteriormente quantidades de proteína CPR purificada às preparaoes membranares para incorporao na membrana, existindo um procedimento experimental de separao de proteínas incorporadas e não incorporadas na membrana (Huber et al., 2009).

Existem ainda outras alternativas que passam pela adaptao dos vetores de expresso de CPR e HO-1, quer utilizando outros promotores, ou alterar o indutor e o nível de induo. No desenvolvimento da estirpe PD301_hHO-1_POR recorreu-se ao sistema bi-plasmídico com plasmídeos compatíveis (Tabela II.5). Este sistema provou ser eficaz em estudos anteriores deste laboratório no desenvolvimento de estirpes de *E. coli*, co-expressando CPR e CYP e assegurando o transporte de eletrões de CPR para CYP (Kranendonk et al., 1999). O plasmídeo pLCM (Kranendonk et al., 1999)   um vetor de expresso de cópias baixas, e o pCW de expresso de cópias médio-altas, o que neste caso, favorece uma maior expresso de HO-1 em relao a CPR. O controlo da expresso de CPR e de HO-1 é obtido pelo repressor Lacl, codificado pelo gene *lacI^q*, que está presente no vetor pCW (Kranendonk et al., 1999). Uma das alternativas na reconstruo da estirpe seria então recorrer a outros plasmídeos, sendo que pLCM pelas características especiais que apresenta, nomeadamente o opero *mucAB* (Duarte et al., 2005), deveria ser preferivelmente mantido. O cDNA de HO-1 humana clonar-se-ia num outro plasmídeo compatível com pLCM e possuindo o gene *lacI^q* de forma a controlar a expresso de CPR como ocorre no atual sistema. Para isso, este novo plasmídeo teria que possuir local de origem de replicao compatível com o de pLCM e ser independente de pLCM relativamente à seleo de antibiótico para manuteno do plasmídeo. Outra hipótese passa por alterar os promotores de modo a modificar a regulao da expresso dos genes. No sistema desenvolvido neste estudo, ambos os plasmídeos estão sob o controlo do promotor *tac*, um promotor forte que é reprimido pela expresso *Lacl* e induzido por IPTG. Este promotor é um híbrido construído a partir do promotor do triptofano (*tpr*) e do promotor *lac*, sendo mais forte que cada um destes individualmente (Rosano e Ceccarelli, 2014). O vetor pCW possui dois promotores *tac* (Tabela

II.5). Já que utilizando diferentes concentrações finais de IPTG nas culturas não se verificou grandes desigualdades nas estequiometrias obtidas, pode eventualmente deletar-se um dos promotores tac de pCW, podendo resultar assim numa expressão inferior da enzima HO-1, cuja elevada expressão face a CPR no atual sistema constitui a razão das estequiometrias tão elevadas.

IV.2.3 Caracterização dos preparados membranares relativamente à expressão das proteínas heterólogas

As membranas das células derivadas de cultura das estirpes de *E. coli* competentes em CPR e HO-1 humanos foram analisadas relativamente ao conteúdo das duas proteínas heterólogas. No que diz respeito a CPR, através do ensaio de redução do cit. c obteve-se um valor de $27,3 \pm 0,7$ pmol/mg, concordante com os $24,6 \pm 3,1$ pmol/mg determinado por imunodeteção da mesma amostra membranar. Em estudos anteriores neste laboratório, usando estirpes derivadas de PD301, recorrendo ao mesmo tipo de expressão bi-plasmídica, com CPR e CYP humanos obtiveram-se concentrações inferiores de CPR. O valor normalmente obtido nesses sistemas foi cerca de 13 pmol/mg (Kranendonk et al., 1999; Duarte et al., 2005), ou seja, aproximadamente metade do valor determinado no presente estudo. Contudo, nesses estudos obtiveram-se rácios de CPR:CYP próximos do verificado *in vivo*, de cerca de 1:10, por isso apesar de no presente estudo existir uma maior expressão de CPR, o rácio de CPR:HO-1 é superior ao pretendido fruto de uma elevada expressão de HO-1. Este tipo de sistema é induzido com uma concentração relativamente baixa de IPTG de 0,2 mM, (tendo em conta que é normalmente utilizado 1-2 mM para este tipo de promotor) e possivelmente existe a oportunidade de ser encontrado o balanço fisiológico das proteínas durante o tempo de indução, o que pode indicar a mútua estabilização de CPR e HO-1.

IV.3 Desenvolvimento de um ensaio de medição da atividade de heme oxigenase I com membranas bacterianas

Devido ao facto de HO-1 degradar o heme em três produtos distintos, o monóxido de carbono, o ferro e a biliverdina, existem diversos ensaios que permitem estudar a atividade de HO-1 através da medição da formação desses produtos. Num estudo anterior utilizando enzimas purificadas (Reed et al., 2010), desenvolveram-se ensaios que permitem estudar cinética de HO-1 em tempo real precisamente seguindo a formação desses produtos. Do estudo de Reed *et al.* (2010) concluiu-se que a medição de formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina constitui uma alternativa de ensaio para medição da atividade de HO-1.

IV.3.1 Complexo Fe^{2+} - ferrozina

Neste estudo, parâmetros testados por Reed *et al.* (2010) foram verificados em relação à importância num teste de cinética utilizando preparações membranares bacterianas.

Inicialmente verificou-se a complexação de Fe^{2+} com ferrozina dependendo de diferentes tampões e mediu-se o comprimento de onda máximo de absorção (seção II.2.9.1 e II.2.9.2). Para isso testou-se a mistura reacional nos três tampões utilizados por Reed *et al.* (2010) (seção II.2.9.1). No que diz respeito ao pico máximo de absorvância, registaram-se picos a 562 nm no caso dos tampões K/P e Tris, e 563 nm no tampão MOPS (Tabela III.4), o que está de acordo com o descrito na literatura, em que o comprimento de onda máximo de absorvância do complexo ferro-ferrozina se situa entre os 562 nm e 564 nm (Berlett *et al.*, 2001). No que ao coeficiente de extinção do complexo (Tabela III.4) diz respeito, obtiveram-se também valores próximos do descrito na literatura ($27,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Berlett *et al.*, 2001). No ensaio com o tampão K/P o valor foi ligeiramente inferior, mas optou-se por utilizar este tampão nos ensaios a realizar posteriormente, pois neste laboratório tem sido o tampão mais frequentemente utilizado e mais adequado em estudos com membranas bacterianas.

Foi realizada uma curva de calibração com concentrações baixas de Fe^{2+} para verificar a sensibilidade do equipamento e linearidade na deteção de formação do complexo (seção II.2.9.2). Verificou-se que por cada $1 \mu\text{M}$ de Fe^{2+} , resulta num aumento de 0,0238 na absorvância (Fig. III.9), além disso o ϵ corresponde ao detetado no mesmo tampão com concentração de Fe^{2+} mais elevada. Isto é um bom indicador pois o conteúdo de CPR e HO-1 nas amostras membranas e a concentração de HO-1 utilizados no estudo de Reed *et al.* (2010) estão nessa ordem de grandeza de μM .

IV.3.2 Atividade de heme oxigenase I em amostras membranares bacterianas

Nos primeiros ensaios de cinética de HO-1 utilizaram-se as amostras membranares bacterianas com todos os componentes utilizados em Reed *et al.* (2010), incluindo catalase. Em estudos anteriores com enzimas humanas HO-1 e CPR purificadas e em lipossomas artificiais, verificou-se que a presença de catalase permitiu seguir a atividade de HO-1 durante mais tempo uma vez que esta previne a formação de H_2O_2 que inativa a HO-1 (Huber *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2010). Era por isso importante confirmar se esse efeito da catalase se verificava com as preparações membranares. Baseado no ensaio de redução do cit. c por CPR, adicionou-se ao ensaio uma concentração de detergente Triton X-100 de forma a garantir o acesso dos reagentes aos microssomas. Neste ensaio de cinética, verificou-se que a absorvância a 562 nm aumentou ao longo do tempo. Contudo, ao testar-se todas as amostras controlo, verificou-se também esse aumento na absorvância (Fig. III.10). Assim, realizaram-se vários ensaios para tentar verificar a fonte do problema. Uma das hipóteses poderia estar relacionada com as condições de heme. Este poderia estar a degradar-se espontaneamente, explicando o facto de nos controlos se ter detetado também aumento na absorvância. Contudo, num ensaio, excluindo a amostra membranares mas com todos os outros componentes como na reação anterior, não se verificou qualquer aumento de absorvância, por isso foram excluídos problemas com a estabilidade de heme.

Subsequentemente realizaram-se várias abordagens com diferentes componentes presentes na mistura reacional (Tabela III.5) executando-se varrimentos do comprimento de onda entre os 400-700 nm, para verificar se detetava o pico máximo de absorvância a 562 nm, característico da formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina. Concluiu-se que nas reações com Fe^{2+} e ferrozina (Tabela III.5 - A e B) se obteve sempre o pico de absorção máximo característico da formação do complexo (Fig. III.11). Enquanto nas reações em que se substituiu o Fe^{2+} por heme (Tabela III.5 - C), utilizando quer a amostra membranar com presença de HO-1 e CPR (PD301_hHO-1_POR) quer o controlo negativo, não se obteve esse máximo de absorvância a 562 nm (Fig. III.12). Isto poderá indicar que existe uma forte interferência na reação de degradação de heme pela HO-1 presente na membrana. Esta interferência pode dever-se a degradação de heme por outro mecanismo ou o NADPH pode estar a ser consumido por outra reação desconhecida. Esta interferência pode eventualmente criar um *background* muito elevado que ao estar na zona perto do comprimento de onda de 562 nm interfere com o sinal da formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina. Esta despistagem não aponta para nenhuma razão específica para a ocorrência do problema verificado nos ensaios de cinética, impossibilitando a medição da atividade de HO-1. No entanto, devido à limitação de tempo não foi possível verificar todas as possíveis causas da interferência observada. É de realçar que no estudo de Reed *et al.* (2010) são utilizadas enzimas purificadas, tratando-se de um sistema limpo, enquanto no presente estudo foram usadas preparações membranares bacterianas que têm enzimas bacterianas que eventualmente podem interferir no ensaio. Um dos problemas que pode ter ocorrido foi o Fe^{2+} libertado ter sido eventualmente oxidado por resíduos membranares e assim não ter conseguido formar o complexo com a ferrozina. Para clarificar isto, devia ter-se adicionado ácido ascórbico ao tampão utilizado na mistura reacional para garantir que o ferro libertado se mantinha na forma reduzida.

É ainda possível optar-se pela medição da formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina, mas através de um método de amostragem em tempo e paragem da reação que permite medir a libertação total de Fe^{2+} . Este método consiste em realizar uma mistura reacional com tampão, heme, a membrana em estudo, competente em CPR e HO-1, e NADPH, para que a degradação de heme ocorra normalmente. A reação deve seguir retirando-se amostragens ao longo do tempo, adicionando-se um eficaz agente desnaturante de proteínas, como o ácido tricloroacético (TCA) (Pourkhalili *et al.*, 2013). O TCA permitirá precipitar toda a proteína presente na reação e por intermédio de centrifugação será possível obter apenas o sobrenadante onde se encontram os componentes formados na reação, em que se inclui o ferro libertado. Subsequentemente o sobrenadante é neutralizado e adiciona-se ferrozina, permitindo realizar a dosagem do Fe^{2+} formado ao longo do tempo até a recolha da amostragem (Pourkhalili *et al.*, 2013).

Como referido atrás, o facto de a degradação de heme pela HO-1 originar três produtos, CO, ferro e biliverdina (produtos diretos) e ainda a bilirrubina (produto indireto, resultante da conversão de biliverdina por ação da BVR) oferece alternativas possíveis para medir a atividade de HO-1 em tempo real através da formação desses produtos. O método de deteção de formação

da bilirrubina é o método mais frequentemente utilizado em estudos de cinética de HO-1. Denomina-se um ensaio indireto, necessitando da presença da enzima BVR para a conversão da biliverdina em bilirrubina (Huber et al., 2009). Este método é bastante popular devido ao facto da bilirrubina ser um cromóforo forte ($\epsilon = 43,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) relativamente aos outros produtos originados durante a degradação de heme por HO-1 (Reed et al., 2010). Neste método, a formação de bilirrubina é monitorizada espectralmente pelo aumento da absorvância a 468 nm (Huber et al., 2009). Contudo, a presença obrigatória de BVR neste ensaio vem aumentar as interações proteína-proteína necessárias para um único ciclo enzimático de HO-1, o que torna os ensaios diretos mais desejáveis para uma interpretação mais simples da atividade de HO-1 (Reed et al., 2010).

Os métodos de detecção da atividade de HO-1 através da formação dos produtos diretos ferro e biliverdina não eram considerados até recentemente pois não havia linearidade durante a reação, detetando-se apenas uma atividade muito reduzida. Esta dificuldade foi ultrapassada com a adição de catalase aos ensaios, que previne a inativação de HO-1 causada pela formação de H_2O_2 (Reed et al., 2010). Esta influência do H_2O_2 sobre HO-1 não era tão visível no ensaio da bilirrubina pois acredita-se que BVR desempenhe uma função protetora em HO-1, diminuindo os efeitos inibitórios do H_2O_2 formado durante o catabolismo de heme (Reed et al., 2010). De entre os ensaios diretos para avaliação da atividade de HO-1, além da medição da formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina, existem também a medição de formação de biliverdina e de CO. Em relação à biliverdina, por ser um fraco cromóforo, com um ϵ de apenas $8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ é raramente usada como método de medição da atividade de HO-1 devido à falta de sensibilidade do mesmo (Huber et al., 2009). A medição da formação de CO também pode ser uma alternativa à detecção da atividade de HO-1, contudo, é um método pouco usado devido à sua complexidade e à necessidade de análise posterior do produto formado (Huber et al., 2009).

Neste laboratório, em estudos anteriores com sistemas bacterianos competentes em CYP e CPR, para determinar a expressão de CYP, e aproveitando o facto de CYP formar um complexo com CO, recorreu-se ao ensaio do espectro diferencial de CO. (Palma et al., 2013). O CO complexado com CYP possui um pico máximo de absorvância por volta dos 450 nm. Sabendo que o ϵ do complexo CYP-CO é de $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, é possível determinar a expressão de CYP. Aplicando o método às amostras membranares do presente estudo, para determinar a atividade de HO-1, teria que se adicionar CYP ao ensaio, para que depois do CO ser libertado pela degradação de heme pela HO-1 se conseguisse seguir a conjugação com o CYP. Contudo, ao adicionar-se CYP na forma solúvel (sem o domínio que lhe permite acoplar à membrana) poderia ter a atividade reduzida e por isso iria influenciar a complexação com CO (Cosme e Johnson, 2000).

Avaliadas todas as opções, o método que parece mais eficaz, quer em custo e sensibilidade parece ser a medição da formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina através de um método de amostragem em tempo e paragem da reação com TCA. Embora no atual estudo, não tenha sido possível utilizar o método de formação do complexo Fe^{2+} - ferrozina, em estudos

anteriores, a sua sensibilidade foi comprovada (Reed et al., 2010). Nesta abordagem de paragem da reação pela degradação da proteína utilizando TCA, o facto de apenas se analisar o sobrenadante resultante da reação pode resolver o problema da interferência registada no ensaio realizado no presente estudo.

V - Conclusão e perspectivas futuras

Na primeira fase deste estudo foi demonstrada a mutagenicidade dependente de SULT1A1, do metabolito de NVP, o 12-OH-NVP em doses fisiologicamente relevantes para regime terapêutico deste fármaco, particularmente no quadro pediátrico e perinatal. O conjunto de dados *in vitro* obtidos neste estudo demonstra uma possível ligação com observações de hepatocarcinogenicidade de NVP detetada em roedores (Anonymous 2009). Apesar de ainda não estar completamente esclarecido se NVP causa carcinogenicidade em humanos, existem indícios que o uso crónico de fármacos da classe a que NVP pertence (NNRTI) está relacionada com o aparecimento de cancros não relacionados com HIV-1 (Powles et al., 2009).

A segunda fase do estudo, focou-se no desenvolvimento de um sistema bacteriano competente na co-expressão de CPR e HO-1 humanas. Vários parâmetros da cultura foram otimizados no sentido de alcançar uma estequiometria destas proteínas representativas do que se verifica no fígado humano, existindo ainda parâmetros que podem ser otimizados para chegar ainda mais perto da estequiometria pretendida.

No desenvolvimento de um ensaio (complexação Fe^{2+} - ferrozina) que permitisse medir a atividade de HO-1 nas membranas bacterianas com expressão heteróloga de CPR e HO-1 humanas foram encontradas várias dificuldades. Foram alterados vários parâmetros mas devido à limitação de tempo não se verificaram vários outros, indicando no entanto que o uso do ensaio da complexação Fe^{2+} - ferrozina é possível ser facilmente aplicado para determinar a atividade de HO-1. Foi assim dado um importante contributo no sentido de desenvolver um ensaio de *cinética in vitro* com muita margem de progressão para aplicação de preparações membranares bacterianas.

A validação deste sistema bacteriano constitui uma importante ferramenta que poderá no futuro permitir que seja aplicada em estudos mecanísticos de CPR, contribuindo relevantemente para a compreensão do modo como CPR interage com os diversos parceiros redox e os efeitos dessas interações no processo de biotransformação, tal como especificamente continuar o estudo deste laboratório utilizando variantes polimórficos de CPR, em particular associados à Síndrome *Antley-Bixler*.

VI - Referências

- Aigrain, L., Pompon, D., Moréra, S., e Truan, G. 2009. Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *EMBO Reports* 10: 742-747.
- Alomar, M. J. 2014. Factors affecting the development of adverse drug reactions. *Saudi Pharmaceutical Journal* 22: 83–94.
- Alves, M. (2013). Sistemas Bacterianos no Estudo da Bioativação do Antiretroviral Nevirapina.
- Anonymous. 2009. Physician's desk Reference. Physician's Desk Reference, Montvale, NJ
- Antunes, A. M. M., Duarte, M. P., Santos, P. P., da Costa, G. G., Heinze, T. M., Beland, F. A., e Marques, M. M. 2008. Synthesis and characterization of DNA adducts from the HIV reverse transcriptase inhibitor nevirapine. *Chemical Research in Toxicology* 21: 1443–1456.
- Antunes, A. M. M., Wolf, B., Oliveira, M. C., Beland, F. A., e Marques, M. M. 2013. 2'-Deoxythymidine adducts from the anti-HIV drug nevirapine. *Molecules* 18: 4955–4971.
- Berlett, B. S., Levine, R. L., Chock, P. B., Chevion, M., e Stadtman, E. R. 2001. Antioxidant activity of Ferrozine-iron-amino acid complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 451–456.
- Cain, J. A., Solis, N., e Cordwell, S. J. 2014. Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *Journal of Proteomics* 97: 265–286.
- Caixas, U., Antunes, A. M. M., Marinho, A. T., Godinho, A. L. A., Grilo, N. M., Marques, M. M. Oliveira, M. C., Branco, T., Monteiro, E. C e Pereira, S. A. 2012. Evidence for nevirapine bioactivation in man: searching for the first step in the mechanism of nevirapine toxicity. *Toxicology* 301: 33–39.
- Chen, J., Mannargudi, B. M., Xu, L., e Uetrecht, J. 2008. Demonstration of the metabolic pathway responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chemical Research in Toxicology* 21: 1862–1370.
- Collins, F., Gray, G., e Bucher, J. 2008. Transforming environmental health protection. *Science* 319: 906–907
- Cosme, J., e Johnson, E. F. 2000. Engineering Microsomal Cytochrome P450 2C5 to be a Soluble Monomeric enzyme 275: 2545–2553.
- Davila, J. C., Rodriguez, R. J., Melchert, R. B., e Acosta, D. 1998. Predictive value of in vitro model systems in toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 38: 63–96.
- de Montellano, P. R. O. 2000. The mechanism of heme oxygenase. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 221–227.
- Dickinson, L., Chaponda, M., Carr, D. F., van Oosterhout, J. J., Kumwenda, J., Lalloo, D. G., Pirmohamed, M. Heyderman, R. S. e Khoo, S. H. 2014. Population pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis

- of nevirapine in hypersensitive and tolerant HIV-infected patients from Malawi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 706–712.
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Gilep, A. A., Laires, A., Oliveira, J. S., Usanov, S. A., Rueff, J. e Kranendonk, M. 2007. The stimulatory role of human cytochrome b5 in the bioactivation activities of human CYP1A2, 2A6 and 2E1: a new cell expression system to study cytochrome P450 mediated biotransformation (a corrigendum report on Duarte et al.) *Mutagenesis* 20:93-100). *Mutagenesis* 22: 75–81
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Laires, A., Oliveira, J. S., Rueff, J., e Kranendonk, M. 2005. 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* 20: 199–208.
- Edwards, I. R., e Aronson, J. K. (2000). Adverse drug reactions : definitions, diagnosis, and management. *Lancet* 356: 1255–1259.
- Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I. L., Huang, W., Grossmann, J. G., e Roberts, G. C. K. 2009. Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 36628–36637.
- Erickson, D., Mather, G., e Trager, W. 1999. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metabolism and Disposition* 27: 1488-1495.
- FDA, 2000. The FDA safety information and adverse event reporting program. Version November 2000. <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm173102.htm> in Safety information, <http://www.fda.gov/default.htm>.
- Fang, J., e Barcelona, M. J. 2003. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemosphere* 50: 105–109.
- Gamage, N., Barnett, A., Hempel, N., Duggleby, R. G., Windmill, K. F., Martin, J. L., e McManus, M. E. 2006. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological Sciences* 90: 5–22.
- Glatt, H. 1997. Bioactivation of mutagens via sulfation. *FASEB Journal* 11: 314–321.
- Glatt, H. 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 129: 141–170.
- Glatt, H., Bartsch, I., Czich, A., Seidel, A., e Falany, C. N. 1995. Salmonella strains and mammalian cells genetically engineered for expression of sulfotransferases. *Toxicology Letters* 82/83: 829–834.
- Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C. E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W. e Meinl, W. 2001. Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Research* 482: 27–40.

- Glatt, H., Engelke, C. E., Pabel, U., Teubner, W., Jones, A. L., Coughtrie, M. W. H., Andrae, U., Falany C. N. e Meinl, W. 2000. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters* 112/113: 341–348.
- Glatt, H., e Meinl, W. 2004a. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369: 55–68.
- Glatt, H., e Meinl, W. 2004b. Use of genetically manipulated Salmonella typhimurium strains to evaluate the role of sulfotransferases and acetyltransferases in nitrofen mutagenicity. *Carcinogenesis* 25: 779–786.
- Guengerich, F., e Isin, E. 2008. Mechanisms of cytochrome P450 reactions. *Acta Chimica Slovenica* 55: 7–19.
- Guengerich, F. P., e MacDonald, J. S. 2007. Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chemical Research in Toxicology* 20: 344–369.
- Hamdane, D., Xia, C., Im, S.-C., Zhang, H., Kim, J.-J. P., e Waskell, L. 2009. Structure and function of an NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in an open conformation capable of reducing cytochrome P450. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 11374–84.
- Hamdane, D., Zhang, H., e Hollenberg, P. 2008. Oxygen activation by cytochrome P450 monooxygenase. *Photosynthesis Research*, 98: 657–66.
- Hartman, T. L., e Buckheit, R. W. 2012. The Continuing Evolution of HIV-1 Therapy: Identification and Development of Novel Antiretroviral Agents Targeting Viral and Cellular Targets. *Molecular Biology International* 2012.
- Hashizume, T., Yoshitomi, S., Asahi, S., Matsumura, S., Chatani, F., e Oda, H. 2009. In vitro micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutation Research* 677: 1–7.
- Higashimoto, Y., e Sugishima, M. 2008. Mass spectrometric identification of lysine residues of heme oxygenase-1 that are involved in its interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemical and Biophysical Research Community* 367: 852–858.
- Hlavica, P., Schulze, J., e Lewis, D. F. V. 2003. Functional interaction of cytochrome P450 with its redox partners: a critical assessment and update of the topology of predicted contact regions. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 96: 279–97.
- Huber, W., e Backes, W. 2007. Expression and characterization of full-length human heme oxygenase-1: the presence of intact membrane-binding region leads to increased binding affinity for. *Biochemistry* 46: 12212-12219
- Huber, W., Marohnic, C., e Peters, M. 2009. Measurement of membrane-bound human heme oxygenase-1 activity using a chemically defined assay system. *Drug Metabolism and Disposition* 37: 857–864.

- Hwang, H.-W., Lee, J.-R., Chou, K.-Y., Suen, C.-S., Hwang, M.-J., Chen, C., Shleh, R.-C., e Chau, L.-Y. 2009. Oligomerization is crucial for the stability and function of heme oxygenase-1 in the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 22672–22679.
- III, Huber, W. J., Scruggs, B. A., e Backes, W. L. 2009. C-Terminal membrane spanning region of human heme oxygenase-1 mediates a time-dependent complex formation with cytochrome P450 reductase. *Biochemistry* 48: 190–197.
- Ingelman-Sundberg, M. 2004. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369: 89–104.
- Johansson, I., e Ingelman-Sundberg, M. 2011. Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. *Toxicological Sciences* 120: 1–13.
- Kim, M.-S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., ... e Pandey, A. 2014. A draft map of the human proteome. *Nature*, 509: 575–581.
- Klaassen, C., e Boles, J. 1997. The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB Journal* 11: 404–418.
- Ko, J. M., Cheon, C.-K., Kim, G.-H., e Yoo, H.-W. 2009. A case of Antley-Bixler syndrome caused by compound heterozygous mutations of the cytochrome P450 oxidoreductase gene. *European Journal of Pediatrics* 168: 877–80.
- Kranendonk, M., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Fisher, C. W., Estabrook, R. W., e Vermeulen, N. P. E. 1999b. Escherichia coli MTC , a human NADPH P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human catalytic activities and mutagenicity studies. *Mutation Research* 441: 73–83.
- Kranendonk, M., Fisher, C. W., Roda, R., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Rueff, J., Vermeulen, N. P. E., e Estabrook, R. W. 1999a. 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. *Mutation Research* 439: 287–300.
- Kranendonk, M., Laires, a, Rueff, J., Estabrook, W. R., e Vermeulen, N. P. 2000. Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations. *Critical Reviews in Toxicology* 30: 287–306.
- Kranendonk, M., Marohnic, C. C., Panda, S. P., Duarte, M. P., Oliveira, J. S., Masters, B. S. S., e Rueff, J. 2008. Impairment of human CYP1A2-mediated xenobiotic metabolism by Antley-Bixler syndrome variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 475: 93–99.
- Kranendonk, M., Mesquita, P., Laires, a, Vermeulen, N. P., e Rueff, J. 1998. Expression of human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli: a system for biotransformation and genotoxicity studies of chemical carcinogens. *Mutagenesis* 13: 263–269.

- Kranendonk, M., Pintado, F., Mesquita, P., Laires, a, Vermeulen, N. P., e Rueff, J. 1996. MX100, a new *Escherichia coli* tester strain for use in genotoxicity studies. *Mutagenesis* 11: 327–333.
- Lynch, T., e Price, A. 2007. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician* 76: 391–396.
- Marohnic, C. C., Huber III, W. J., Patrick Connick, J., Reed, J. R., McCammon, K., Panda, S. P., Martásek, P. Backes, W. L. e Masters, B. S. S. 2011. Mutations of human cytochrome P450 reductase differentially modulate heme oxygenase-1 activity and oligomerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 513: 42–50.
- Marohnic, C. C., Panda, S. P., McCammon, K., Rueff, J., Masters, B. S. S., e Kranendonk, M. 2010. Human cytochrome P450 oxidoreductase deficiency caused by the Y181D mutation: molecular consequences and rescue of defect. *Drug Metabolism and Disposition* 38: 332–340.
- Maron, D. M., e Ames, B. N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173-215
- Meinl, W., Pabel, U., Osterloh-Quiroz, M., Hengstler, J. G., e Glatt, H. 2006. Human sulphotransferases are involved in the activation of aristolochic acids and are expressed in renal target tissue. *International Journal of Cancer* 118: 1090–1097.
- Meng, X., Howarth, A., Earnshaw, C. J., Jenkins, R. E., French, N. S., Back, D. J., Naisbitt, D. K. e Park, B. K. 2013. Detection of drug bioactivation in vivo: mechanism of nevirapine-albumin conjugate formation in patients. *Chemical Research in Toxicology* 26: 575–583.
- Michaud, V., Bar-Magen, T., Turgeon, J., Flockhart, D., Desta, Z., e Wainberg, M. A. 2012. The dual role of pharmacogenetics in HIV treatment: mutations and polymorphisms regulating antiretroviral drug resistance and disposition. *Pharmacological Reviews* 64: 803–833.
- Miyamoto, Y., Ohshida, K., e Sasago, K. 2009. Protein assay for heme oxygenase-1 (HO-1) induced by chemicals in HepG2 cells. *The Journal of Toxicological Sciences* 34: 709–714.
- Mortelmans, K., e Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455: 29–60.
- Moutinho, D., Marohnic, C., e Panda, S. 2012. Altered human CYP3A4 activity caused by Antley-Bixler syndrome-related variants of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase measured in a robust in vitro system. *Drug Metabolism and Disposition* 40: 754–760.
- Nowell, S., e Falany, C. N. 2006. Pharmacogenetics of human cytosolic sulfotransferases. *Oncogene* 25: 1673–1678.
- Paine, M., Scrutton, N., e Munro, A. 2005. Electron transfer partners of cytochrome P450. In *Cytochrome P450* (de Montellano, P. R. O. eds) 3^a ed., pp 115-148, Springer

- Palma, B. B., Silva E Sousa, M., Urban, P., Rueff, J., e Kranendonk, M. 2013. Functional characterization of eight human CYP1A2 variants: the role of cytochrome b5. *Pharmacogenetics and Genomics* 23: 41–52.
- Palma, B. B., Silva E Sousa, M., Vosmeer, C. R., Lastdrager, J., Rueff, J., Vermeulen, N. P. E., e Kranendonk, M. 2010. Functional characterization of eight human cytochrome P450 1A2 gene variants by recombinant protein expression. *The Pharmacogenomics Journal* 10: 478–488.
- Pandey, A. V, e Sproll, P. 2014. Pharmacogenomics of human P450 oxidoreductase. *Frontiers in Pharmacology* 5: 103
- Parkinson, A. 2001. Biotransformation of Xenobiotics. In Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (C. D. Klaassen, eds), 5a ed., pp 133-124, McGraw-Hill, Inc., Kansas
- Porter, T. D. 2012. New insights into the role of cytochrome P450 reductase (POR) in microsomal redox biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2: 102–106.
- Pourkhalili, A., Mirlahi, M., e Rahimi, E. 2013. Heme iron content in lamb meat is differentially altered upon boiling, grilling, or frying as assessed by four distinct analytical methods. *The Scientific World Journal* 2013: Article ID 374030
- Powles, T., Robinson, D., Stebbing, J., Shamash, J., Nelson, M., Gazzard, B., Mandelia, S., Moller, H., e Bower, M. 2009. Highly active antiretroviral therapy and the incidence of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection. *Journal of Clinical Oncology* 27: 884–890.
- Reed, J., Huber, W., e Backes, W. 2010. Human heme oxygenase-1 efficiently catabolizes heme in the absence of biliverdin reductase. *Drug Metabolism and Disposition* 38: 2060–2066.
- Reed, J. R., Cawley, G. F., e Backes, W. L. 2011. Inhibition of cytochrome P450 1A2-mediated metabolism and production of reactive oxygen species by heme oxygenase-1 in rat liver microsomes. *Drug Metabolism Letters* 5: 6–16.
- Rendic, S., e Guengerich, F. P. 2015. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chemical Research in Toxicology* 28: 38–42.
- Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R., & Dringen, R. (2004). Colorimetric Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R., e Dringen, R. 2004. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Analytical Biochemistry* 331: 370–375.
- Riska, P., Lamson, M., e MacGregor, T. 1999. Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans. *Drug Metabolism and Disposition* 27: 895-901
- Rosano, G. L., e Ceccarelli, E. A. 2014. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5: 1–17.

- Rueff, J., Chiapella, C., Chipman, J. K., Darroudi, F., Silva, I. D., Bogaert, M. D., ... e Werle-schneider, G. 1996. Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays. *Mutation Research* 353: 151–176.
- Semple, J. L., Woolridge, N., e Lumsden, C. J. 2005. Computational Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Tissue Engineering* 11: 341–356.
- Sharma, A. M., Klarskov, K., e Uetrecht, J. 2013. Nevirapine bioactivation and covalent binding in the skin. *Chemical Research in Toxicology* 26: 410–421.
- Sharma, A. M., Li, Y., Novalen, M., Hayes, M. A., e Uetrecht, J. 2012. Bioactivation of nevirapine to a reactive quinone methide: implications for liver injury. *Chemical Research in Toxicology* 25: 1708–1719.
- Sharma, A. M., Novalen, M., Tanino, T., e Uetrecht, J. P. 2013. 12-OH-nevirapine sulfate, formed in the skin, is responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chemical Research in Toxicology* 26: 817–827.
- Stingl, J. C., Bartels, H., Viviani, R., Lehmann, M. L., e Brockmöller, J. 2014. Relevance of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms for drug dosing: A quantitative systematic review. *Pharmacology & Therapeutics* 141: 92–116.
- Sugishima, M., Sato, H., Higashimoto, Y., Harada, J., Wada, K., Fukuyama, K., e Noguchi, M. 2014. Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111: 2524–2529.
- Timbrell, J. A. 2009. Principles of *Biochemical Toxicology*. New York.
- Valentin-severin, I., Le, L., Lhuguenot, J., Bon, A. Le, e Chagnon, M. 2003. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening : comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research* 536: 79–90.
- Valerio, L. G. 2011. In silico toxicology models and databases as FDA Critical Path Initiative toolkits. *Human Genomics* 5: 200–207.
- Vincent, B., Morellet, N., Fatemi, F., Aigrain, L., Truan, G., Guittet, E., e Lescop, E. 2012. The closed and compact domain organization of the 70-kDa human cytochrome P450 reductase in its oxidized state as revealed by NMR. *Journal of Molecular Biology* 420: 296–309.
- Wang, J., e de Montellano, P. R. O. 2003. The binding sites on human heme oxygenase-1 for cytochrome p450 reductase and biliverdin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 20069–20076.
- Wen, B., Chen, Y., e Fitch, W. L. 2009. Metabolic activation of nevirapine in human liver microsomes: dehydrogenation and inactivation of cytochrome P450 3A4. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 37: 1557–1562.

World Health Organization 2010. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants: recommendations for a public health - 2010 version. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/75236> in World Health Organization <http://apps.who.int/iris/>

Yoshida, T., e Migita, C. T. 2000. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 82: 33–41.

Zanger, U. M., e Schwab, M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138: 103–41.

Zhang, H., Patana, A-S., Mackenzie, P. I., Ikushiro, S., Goldman, A., e Finel, M. 2012. Human UDP-Glucuronosyltransferase expression in insect cells: ratio of active to inactive recombinant proteins and the effects of a C-terminal his-tag on glucuronidation kinetics. *Drug Metabolism and Disposition* 40: 1935–1944.

VII - Anexos

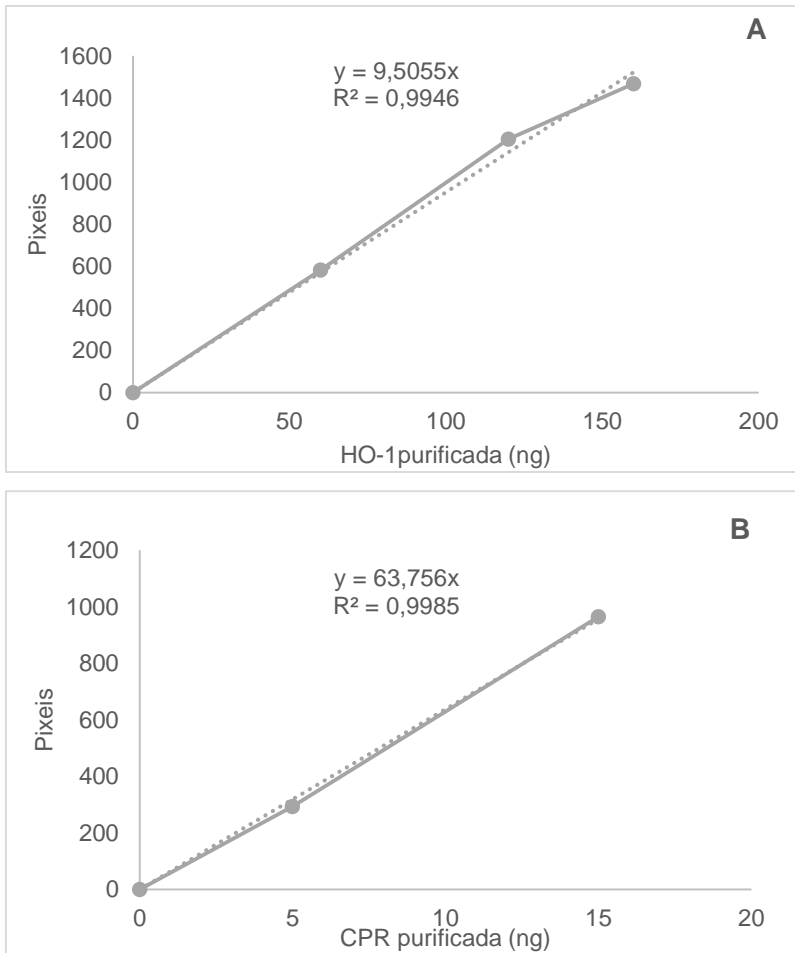


Figura VII.1 Curvas dose-resposta de sinal imunodetetado das proteínas purificadas A) HO-1; B) CPR. (Utilizadas na determinação através de semi-quantificação das quantidades relativas de HO-1 e CPR nas células HepG2)

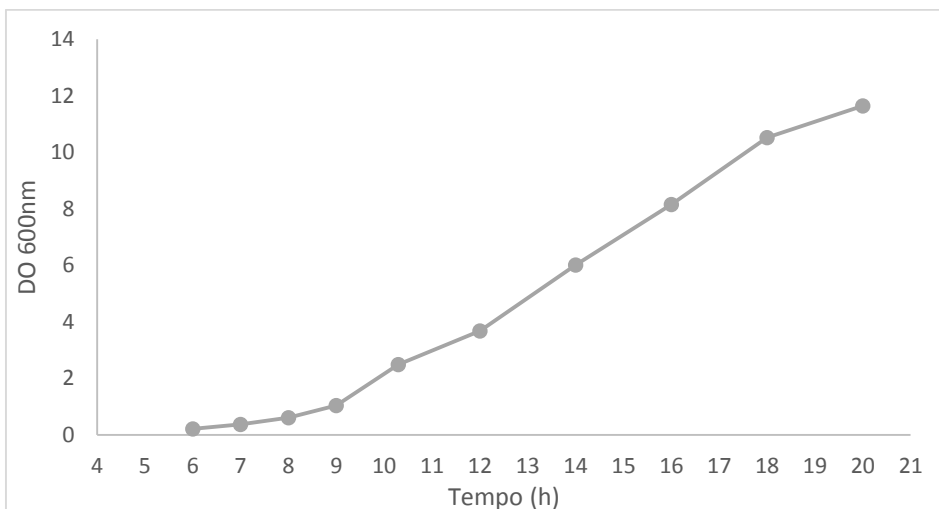


Figura VII.2 Curva de crescimento de PD301_hHO-1_POR sem indução.