

MEMÓRIAS
DA
ACADEMIA DAS CIÊNCIAS
DE
LISBOA

CLASSE DE CIÊNCIAS

TOMO XLVII
Volume 2

**Bactérias ‘humanizadas’:
expressão de genes humanos em
procariotas na detecção de agentes
cancerígenos**

JOSÉ RUEFF



ACADEMIA DAS CIÊNCIAS
DE LISBOA

LISBOA • 2020

Bactérias ‘humanizadas’: expressão de genes humanos em procariotas na detecção de agentes cancerígenos

JOSÉ RUEFF

‘Seul le cancer a gardé, dans toutes les langues son nom astrologique. La frayeur est intacte.’

Amin Mallouf, in «Samarkan»

CONTEXTO DESTA COMUNICAÇÃO FACE A ANTERIORES SOBRE O TEMA DO CANCRO

O texto da presente comunicação decorre de comunicações que já anteriormente apresentámos, assentes em trabalhos que temos desenvolvido com os nossos colegas, tendo como eixo condutor alguns aspectos da susceptibilidade genética a cancro, dos mecanismos envolvidos na terapêutica anti-neoplásica com citostáticos e o surgir da resistência e ainda sobre um tipo particularmente importante de cancerígeno representado pelas radiações ionizantes e seus efeitos genéticos.

Assim, esta comunicação surge no contexto das seguintes anteriormente apresentadas à Academia, designadamente:

a) Sobre a susceptibilidade a cancro:

O Estatuto da Doença Singular – os Mecanismos Moleculares da Genética- apresentada em Sessão em 2010;

b) Sobre as lesões genéticas por radiações e cancro:

Efeitos genéticos de radiação ionizante – apresentada em Sessão em 2016

c) Sobre a expressão genética na resistência à terapêutica no cancro:

Transportadores de membrana na resistência a fármacos em Oncologia – apresentada em Sessão em 2015.

CANCRO E LESÃO GENÉTICA

É comumente aceite que o cancro surge; ou melhor, é iniciado, pelo acumular de mutações no DNA de células sãs e que o cancro é desencadeado quando as células atingem um acervo mínimo de mutações que transformam a célula iniciadora, conferindo-lhe potencial proliferativo e, posteriormente, potencial invasivo.

Como referiu Raymond W. Ruddon: *“Cancer is essentially a genetic disease”* (1), uma vez que as lesões iniciadoras respeitam a alterações no DNA, i.e., a mutações. Estima-se que a iniciação tumoral possa depender de 4-7 (ou até 11) mutações, ou seja, o processo é multigénico e é também multifásico. Se quisermos usar linguagem formal, podemos dizer que a taxa de cancerigénese, i.e., de “êxito” de lesões génicas conducentes a tumor que podemos designar por λ^* , é o resultado da taxa basal, ou seja, aquela

atribuível a mutações espontâneas (infidelidade de replicação de DNA, reparação de DNA menos eficaz), a que se soma a taxa devida ao produto da taxa basal pelo tempo de actuação de um agente cancerígeno λ_i em que t é o tempo de actuação do cancerígeno. Assim, temos:

$$\lambda^* = \lambda_i + \lambda_i c_i \text{ para } i = 1 \dots k$$

em que k são as múltiplas fases do processo neoplásico, nomeadamente as diversas mutações.

Por detrás do fenótipo morfológico e da biologia de um tumor estão, porém, múltiplas mutações génicas que se vão acumulando na evolução clonal do tumor. De facto, os tumores são na sua evolução formados por oligoclones exibindo uma micro-heterogeneidade génica: não há, assim, dois tumores iguais, nem dois oligoclones de um mesmo tumor iguais, pois não há em todas as células um mesmo onco-genótipo (2).

Qualquer que seja o agente ou mecanismo que desencadeiem mutações potencialmente cancerígenas, estas distinguem-se, porém, em duas classes funcionais, as “*driver mutations*” e as “*passenger mutations*”. As primeiras constituem fenomenicamente as mutações indispensáveis ou cruciais para o desencadear do tumor, as “*passenger*” serão primariamente mutações neutras que se vão acumulando na evolução tumoral mas das quais o tumor não necessariamente carece para o seu fenótipo de multiplicação celular e invasividade.

Este conceito de mutações indispensáveis – as “*driver mutations*” – levou ao conceito de “*oncogene addiction*”, termo feliz proposto por Bernard Weinstein (3, 4) para designar as mutações sem quais o tumor não prolifera e que, se inibido o seu produto génico alterado por um fármaco dirigido-a-alvo (“*target therapies*”) resulta num cessar da proliferação e/ou morte celular (por exemplo por inibição de proteína mutada que bloqueie a apoptose: (3, 4).

Todavia, a instabilidade genética tumoral leva com inusitada frequência à aquisição de resistência aos fármacos dirigidos-a-alvo, pelo acumular de mutações na proteína-alvo e/ou pela sobre-expressão de proteínas transportadoras de membrana de efluxo, em particular as ABC (“*ATP-binding cassette*”). Qualquer dos possíveis mecanismos traduzir-se-á em resistência farmacológica que é a causa de morte em cerca de 90% dos doentes com cancro já metastisado (2).

Tal instabilidade genética pode mesmo traduzir-se numa alternância de funções entre “*driver*” e “*passenger mutations*” com as últimas a passarem a contribuir para a manutenção do fenótipo do tumor.

AGENTES QUÍMICOS CANCERÍGENOS

A taxa de aparição de novos cancros a nível mundial (incidência) estimada para o cômputo do ano de 2018 é de 18,1 milhões de novos casos e a mortalidade global representará 9,6 milhões de casos, projectando-se para 2030 um aumento de incidência de 61,7%. Para Portugal o número de novos casos terá sido em 2018 de 58.199 e o número de mortes de 28.960 (5, 6).

Globalmente, pode sugerir-se que a mortalidade para vários tipos de cancro terá uma tendência de diminuição mas a incidência continuará a aumentar e é sobre esta que a prevenção pela detecção de agentes cancerígenos se debruça, podendo estimar-se que cerca de 30-70% dos cancros resultam de exposições exógenas devidas a factores do meio veiculados pela inalação, a alimentação e/ou os estilos de vida, em geral.

Na formalização que acima apresentámos: $\lambda^* = \lambda_i + \lambda_i c_i$ para $i = 1 \dots k$, o que a detecção de agentes cancerígenos procura contribuir para diminuir é a parcela $\lambda_i c_i$ ou seja, o excesso de contributo para a taxa global de incidência.

Desde 1971, mais de 1000 agentes químicos foram avaliados pelo IARC (International Agency for Research on Cancer) da OMS (7), tendo mais de 500 sido identificados como:

- 1) cancerígenos para o homem (classe 1): 120
- 2) como prováveis cancerígenos (classe 2A): 82
- 3) como possíveis cancerígenos (classe 2B): 299

A distinção entre as classes 2A e 2B baseia-se no peso de evidência quando não há suficiente evidência do agente ser cancerígeno para o homem em estudos epidemiológicos, mas há evidência mais sólida (2A) ou menos consolidada de efeito cancerígeno em animais de experiência. Neste segundo caso, da classe 2B, estão muitas vezes misturas complexas a que o homem está exposto mas em que os efeitos sinérgicos não permitem isolar na análise de evidência um determinado agente.

Destes cerca de 500 agentes já classificados pelo IARC, cerca 88% são agentes lesivos do DNA, isto é comportam uma inequívoca actividade mutagénica ou clastogénica. Daqui a importância de utilizar na avaliação os dados que permitam concluir de genotoxicidade do agente pois tal facto, não somente é utilizado na análise de peso-da-evidência, como também permite consubstanciar o *primum movens* da actividade cancerígenica de que o cancro é iniciado pelo acumular de mutações no DNA, como acima referido.

DETECÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS COMO EVENTUALMENTE CANCERÍGENOS

O mais versátil sistema de teste de mutagenicidade foi o desenvolvido por Bruce Ames (8, 9), baseado em uma colecção de estirpes de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para histidina e que expostas a um potencial xenobiótico mutagénico revertem para autotrofia, detectando assim mutações no gene histidina-deficiente. O teste foi melhorado na sua sensibilidade pelo desenvolvimento de estirpes com níveis de lipopolissacáridos de membrana reduzidos (*rfa*) aumentando a permeabilidade membranária aos xenobióticos a testar.

Mas talvez o grande desenvolvimento foi o associar às placas de teste extractos de microsomas de fígado de rato, permitindo a metabolização de xenobióticos não directamente reactivos face a DNA. Os microsomas formam-se a partir de retículo endoplasmático pela homogeneização do tecido hepático e separação/purificação por centrifugação a 9000 g, de onde também a designação de fração S9. O retículo é rico em citocromos P450 ou CYP, que constituem o principal sistema de metabolização de xenobióticos potencialmente cancerígenos, constituindo a denominada Fase I de metabolismo de pré-cancerígenos que origina formas electrofílicas; a que se seguem reacções de conjugação (catalizadas, nomeadamente, por enzimas com actividade glutatião-transferase, ou acetil-transferase) que formam compostos susceptíveis de eliminação (ver Figura 1).

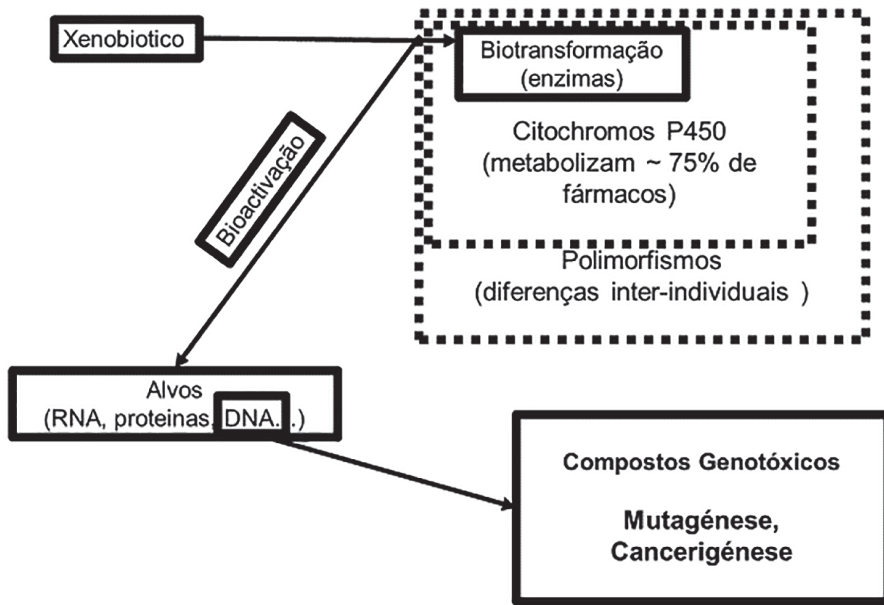


Figura 1. Esquema das vias de metabolização e ação sobre o genoma de agentes potencialmente cancerígenos.

O ciclo de catálise pelos CYP exige uma importante enzima que é a dadora de electrões, a citocromoP450-oxirreductase (ver também Figura 2):

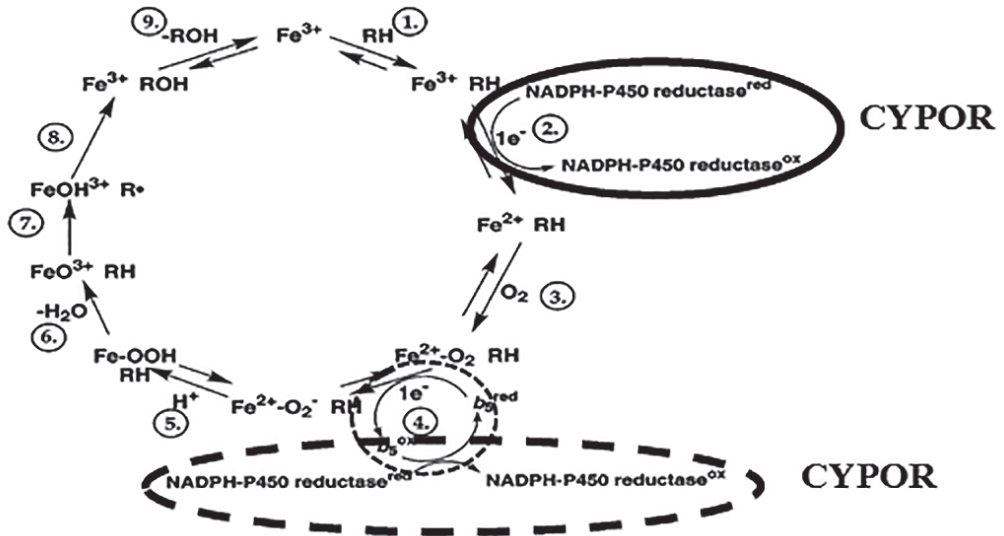


Figura 2. Ciclo catalítico do citocromo P450 (com base em B.Brito Palma, "Development of human Cytochrome P450 competent genotoxicity test bacterial systems for high throughput screening – Functional characterization of human Cytochrome P450 1A2 polymorphic variants". Tese, 2017).

- Quatro importantes limitações da adição de microsomas de fígado de rato são, porém, as seguintes:
- (1) não é linear que a formação de metabolitos eletrofilicos extra-celularmente nos microsomas adicionados atinja de forma sempre eficaz o DNA da bactéria;
 - (2) os CYP do fígado de rato podem ter capacidade metabolizadora diversa dos CYP humanos o que pode constituir uma dificuldade de extrapolação;

- (3) os CYP de rato não mimetizam a enorme diversidade de polimorfismos efectivamente existentes nos CYP humanos, os quais podem constituir substrato de explicação para as diferentes susceptibilidades humanas;
- (4) o uso de animais em medicina experimental está hoje sujeito ao triplo princípio RRR (*Reduce, Refine, Replace*).

ENSAIOS COM BACTÉRIAS ‘HUMANIZADAS’

Pelo termo bactérias “humanizadas”, referimos aqui estirpes bacterianas para as quais transferimos, por clonagem, plasmídeos gerados por engenharia genética, contendo genes humanos de CYPs e da reductase do citocromo P450 (CYPOR) e cuja expressão confirmámos e ainda mantendo a estequiometria fisiológica de 1 CYPOR para 5 CYPs, deste modo mimetizando fielmente o metabolismo na célula humana, acrescentando que não se põe o problema potencial de transferência dos metabolitos electrofílicos através da membrana e ainda contribui para o princípio RRR.

Genericamente, o sistema é bi-plasmídico, contendo num dos plasmídeos o gene CYPOR humano e uma fusão entre o gene *sulA* do sistema de reparação errónea SOS (que permite aumentar a sensibilidade de resposta) e o gene *gfp* (*sulA::gfp*) que permite a detecção de resposta por fluorescência da GFP (*green fluorescent protein*); sendo o segundo plasmídeo aquele em que são clonadas e expressas as isoformas de CYPs humanos. Cada estirpe foi transfectada com o plasmídeo indutível de resposta SOS contendo o gene GFP (estirpe I), ou o plasmídeo constitutivo de GFP (estirpe C), ou ainda o plasmídeo-controlo sem o gene *gfp* (estirpe B).

O sistema, permite testar com diferentes isoformas de cada CYP, consentindo, assim, analisar o papel de polimorfismos génicos de diferentes CYPs e possível explicação da questão da susceptibilidade a cancro, uma vez que só cerca 30% embora tendencialmente 50% dos seres humanos têm cancro durante o seu tempo de vida e em condições genericamente idênticas de exposição ambiental. Ou seja, pode admitir-se que haja isoformas das enzimas de biotransformação de agentes químicos potencialmente cancerígenos que ditam diferentes níveis de formação de produtos reactivos electrofílicos e susceptíveis de reagirem com nucleófilos no DNA gerando potenciais mutações iniciadoras do processo de cancerigénese. Nestes mecanismos de susceptibilidade, há evidentemente que juntar os devidos a enzimas de reparação de DNA e enzimas de conjugação (Fase II). Este aspecto já o analisámos antes de forma mais detalhada (10). Certo é, porém, que o problema da cancerigénese e o ‘êxito tumoral’ não podem reduzir-se a estas fases iniciais da cancerigénese: importantes são por exemplo a EMT (*epithelial mesenchymal transition*) que permite às células epiteliais iniciais do tumor (e cerca de 90% dos cancros humanos são carcinomas!) adquirir características mesenquimatosas e facilitadoras da mobilidade e metastização. À EMT há que juntar o papel do micro-ambiente tumoral ou a formação do nicho de metastização. Ora, nenhum destes aspectos é coberto pela detecção e diagnóstico de agentes cancerígenos que constituem apenas a(s) fase(s) inicial(ais) do processo.

No seu todo, desenvolvemos quatro estirpes-tipo: (a) duas de *Salmonella typhimurium* (TA 1535 e TA100 isogénicas para o DNA cromossómico, excepto que TA100 possui ainda um plasmídeo mutador, o pKM101) e (b) duas de *Escherichia coli* (FP401 e PD301, isogénicas excepto para o facto de PD301 possuir

também mutações nos genes *ada* e *ogt* que aumentam a sensibilidade a agentes alquilantes por défice de reparação da respectiva lesão no DNA).

A resposta é medida pela equação:

$$F_I = \frac{(f_I^x - f_B^x)/(f_I^0 - f_B^0)}{(f_C^x - f_B^x)/(f_C^0 - f_B^0)}$$

em que, representam as unidades de fluorescência medidas para as concentrações x e 0 de cada composto a testar para cada uma das estirpes de teste (I), de controlo (C) e de branco (B), como acima referido, e F_I o factor de indução.

As potências de lesão do DNA são avaliadas pelo SOSIP (*SOS induction potency*), calculado como o declive da parte linear da curva dose-resposta (ver Figura 3), representando a potência molar de cada composto na indução de GFP pelo gene *sulA*.

Para oito variantes génicas polimórficas não-sinónimas do CYP1A2 contruímos estirpes que permitem avaliar o papel dos respectivos polimorfismos na bioactivação de pró-cancerígenos.

A família CYP1A constitui uma das mais representativas na catálise de activação de pró-cancerígenos, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas e nitroso-aminas e representa cerca de 17% da bioactivação de todos os pró-cancerígenos.

O CYP1A2 é ainda responsável pela metabolização de cerca de 15% dos fármacos humanos, entre os quais a clozapina, a lidocaína, a fenacetina, ou o propranolol.

A Figura 3 apresenta um exemplo de resposta do 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) em estirpe PD301 de *E. coli* contendo o plasmídeo com CYP1A2. O IQ é um produto de pirólise abundante em alimentos sujeitos a temperaturas de preparação alimentar elevadas, como grelhados.

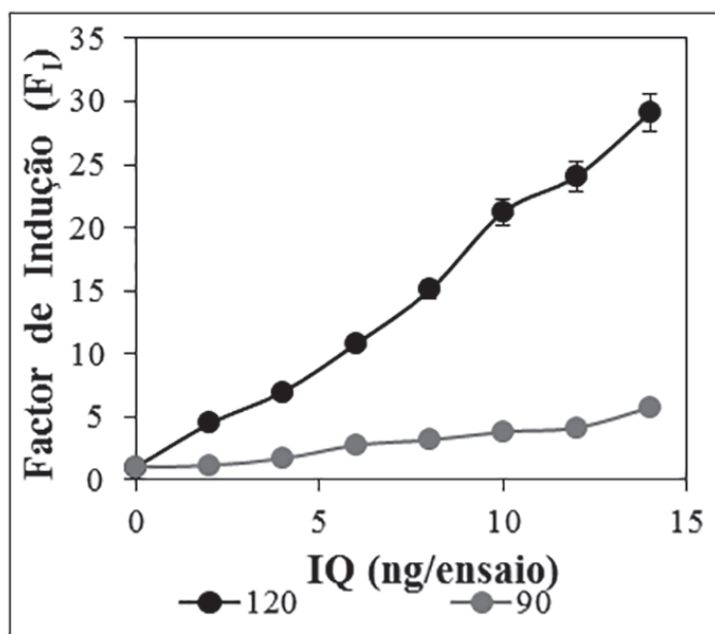


Figura 3. Exemplo de resposta do 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) em estirpe PD301 de *E. coli* contendo o plasmídeo com tempos de incubação de 120 min. e 90 min.

Para o tratamento dos dados e atento o grande volume destes (4 estirpes, 8 variantes polimórficas, 8 pró-cancerígenos), recorremos a análise multi-variada (11), que permitiu verificar que duas das variantes polimórficas testadas apresentam diferenças muito significativas de capacidade de catálise face ao tipo selvagem: a T83M (treonina para metionina na posição 83) e a G299S (glicina para serina na posição 299) (ver Figura 4).

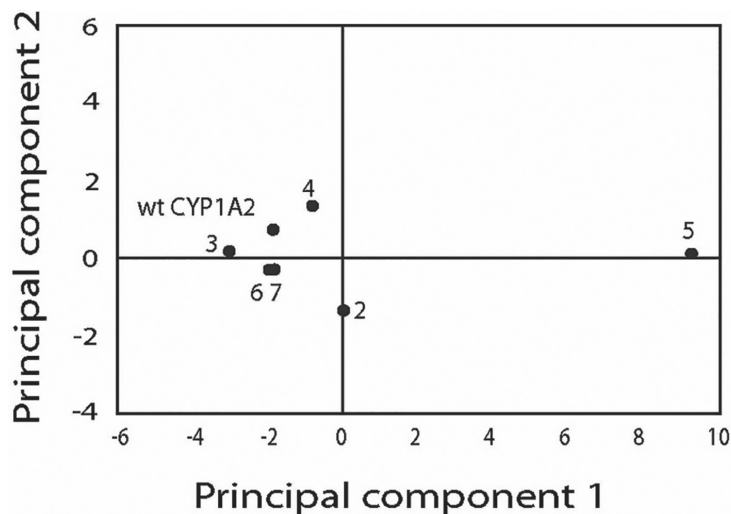


Figura 4. Análise multivariada para caracterização de polimorfismos de CYP1A2.

Este sistema permite a avaliação fidedigna de lesão de DNA por agentes do meio aos quais o homem possa estar exposto e que por essa genotoxicidade possam ser considerados potencialmente susceptíveis de actividade cancerígena.

A vantagem é, além da alta eficácia de resposta, a utilização de genes humanos de biotransformação, os CYPs e a CYPOR, assim mimetizando as reacções relevantes no homem, a que acresce o facto de ser um sistema bi-plasmídico em que podem ser clonadas variantes polimórficas humanas cuja frequência alélica seja significativa na espécie humana e, assim, consentir uma presunção de susceptibilidade (12, 13, 14).

(COMUNICAÇÃO APRESENTADA À CLASSE DE CIÊNCIAS
NA SESSÃO DE 19 DE JULHO DE 2018)

Agradecimentos: Cumpre-me agradecer aos meus colegas que contribuíram tanto com o seu saber e labor para este trabalho, designadamente: Bernardo Brito Palma e Michel Kranendonk, a que vários outros se juntaram e vêm identificados nas citações referidas. Um agradecimento especial é devido aos Doutores Gilles Truan e Philippe Urban (Universidade de Toulouse) pela inestimável colaboração na análise dos resultados.

REFERÊNCIAS:

1. Ruddon, R. W., *Cancer biology*, Oxford University Press, 2007.
2. Rueff, J. and Rodrigues, A.S. "Cancer Drug Resistance: A Brief Overview from a Genetic Viewpoint". *Methods Mol Biol.* 1395:1-18, 2016.
3. Weinstein I. B., Joe A. K. "Mechanisms of disease: Oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 448-457, 2006.
4. Weinstein I. B. "Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* 297, 63-64, 2002.
5. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A., Jemal. A. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA Cancer J Clin.*;68(6):394-424, 2018.
6. <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence>
7. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC. World Health Organization, 2018.
8. Ames, B.N., F.D. Lee and W.E. Durston "An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 70, 782-786, 1973.
9. Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki and F.D. Lee. "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 70, 2281-2285, 1973.
10. Rueff J, Gaspar J, Kranendonk M. "DNA polymorphisms as modulators of genotoxicity and cancer". *Biol Chem.* 383(6):923-932, 2002.
11. Urban P, Truan G, Pompon D. "High-throughput enzymology and combinatorial mutagenesis for mining cytochrome P450 functions". *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*;4(6):733-47. 2008.
12. Palma BB, Moutinho D, Urban P, Rueff J, Kranendonk M. "Cytochrome P450 expression system for high-throughput real-time detection of genotoxicity: Application to the study of human CYP1A2 variants". *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*; 806:24-33, 2016.
13. Palma BB, Silva E Sousa M, Urban P, Rueff J, Kranendonk M. "Functional characterization of eight human CYP1A2 variants: the role of cytochrome b5". *Pharmacogenet Genomics.*;23(2):41-52., 2013.
14. Palma BB, Silva E Sousa M, Vosmeer CR, Lastdrager J, Rueff J, Vermeulen NP, Kranendonk M. "Functional characterization of eight human cytochrome P450 1A2 gene variants by recombinant protein expression". *Pharmacogenomics J.* 10(6):478-88, 2010.