



Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia

O citocromo b_5 no complexo enzimático do citocromo P450

Daniela Figueiredo Simões Presa

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Michel Kranendonk

Presidente: Doutor José Paulo Sampaio - FCT/UNL
Arguente: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte - FCT/UNL
Vogais: Doutor Michel Kranendonk - FCM/UNL

Fevereiro de 2011

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Ciências da Vida

O citocromo b_5 no complexo enzimático do citocromo P450

Daniela Figueiredo Simões Presa

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutor Michel Kranendonk

Monte de Caparica

2011

“O citocromo b_5 no complexo enzimático do citocromo P450” © Daniela Presa, 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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aprendi que não posso exigir os conhecimentos de ninguém. Posso apenas, aprender, dedicar-me de alma e coração aos objectivos propostos, dar boas razões para que gostem do meu trabalho e ter a paciência e perseverança para que este seja reconhecido.

Agradecimentos

Não posso nem quero deixar de expressar o meu reconhecimento e agradecimento:

A todos quantos ao longo deste último ano lectivo me acompanharam no Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, e contribuíram de alguma forma a tornar possível este meu trabalho, que por sua vez me despertou o querer saber algo mais e querer continuar a percorrer novos horizontes nesta área.

AGRADEÇO em particular:

Ao Professor Doutor José Rueff, Director do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por me ter recebido e me ter possibilitado realizar nas melhores condições o trabalho experimental aqui apresentado, pelo seu rigor científico e profissional, pela sua disponibilidade e afecto que sempre me demonstrou;

Ao Doutor Michel Kranendonk, pela paciência e sabedoria que sempre demonstrou em gerir a “minha sede de saber”, pela orientação, crítica, pelos seus ensinamentos e lições;

Ao Dr. Bernardo Brito e Palma, pelo seu apoio e dedicação sempre que alguma dúvida surgia;

À Dr^a Daniela Moutinho, pela sua ajuda, dedicação e pelos bons momentos partilhados;

À Patrícia e D. Lucrécia, pela sua compreensão, paciência, simpatia e carinho transmitido.

De todos guardo de uma forma ou de outra, um carinho especial, neste meu virar de página da Minha História de Vida, fazendo votos que os nossos caminhos se voltem a cruzar.

Ao meu namorado João Oliveira por ter tido paciência e compreensão, e me ter dado todo o seu amor, ajudando-me a ultrapassar esta etapa da minha vida.

À minha Mãe, por me ter dado a sua força e o seu amor que me guiaram pela vida, dando-me as asas que precisava para voar.

A Todos
O meu obrigado

Resumo

Estudos anteriores indicaram que o b_5 tem diferentes efeitos no complexo enzimático do CYP, dependendo do tipo de substrato e da forma de CYP envolvida. Para uma melhor compreensão do b_5 no complexo enzimático do CYP, este trabalho pretendeu estudar o mecanismo de actuação e efeito do b_5 no referido complexo.

Para este fim, utilizamos um sistema bacteriano biplasmídico que permite a co-expressão de um CYP com a CYPOR na presença ou ausência de b_5 . Seleccionámos dois CYPs, o CYP1A2 e o CYP2A6, uma vez ter sido demonstrado que a presença de b_5 exerce um forte estímulo sobre a actividade catalítica do CYP2A6, e que o CYP1A2 aparenta uma relativa insensibilidade à presença desta proteína. Como se pensa que o b_5 actua sobre a eficiência da transferência de electrões da CYPOR para o CYP, escolheram-se duas variantes da CYPOR relacionadas com a Síndrome de Antley-Bixler, nomeadamente Y459H e Y181D, as quais contêm mutações que causam a debilitação da ligação dos grupos prostéticos FAD e FMN respectivamente, grupos directamente envolvidos na capacidade de fornecer electrões ao CYP. Após a validação dos diferentes sistemas bacterianos construídos, estes foram aplicados em duas abordagens ao estudo do b_5 no complexo enzimático do CYP, nomeadamente a influência do b_5 na capacidade do CYP1A2 e CYP2A6 para bioactivar mutagénios e, numa abordagem cinética, avaliando a actividade destes dois CYPs, utilizando substratos padrão.

Os resultados indicaram que há uma competição da CYPOR e do b_5 pelo sítio de ligação ao CYP, bem como da CYPOR e do sistema redox bacteriano Fld/FdR. Foi também demonstrado que o b_5 está envolvido no aumento da eficiência da transferência do segundo electrão para o CYP e consequente diminuição do desacoplamento, tornando a reacção mais eficiente. Verificou-se um maior efeito competitivo do b_5 quando na presença da variante Y181D da CYPOR, que nos permite sugerir que a CYPOR-Y181D tem menor afinidade para o CYP, relativamente à CYPOR-Y459H e CYPOR consensual, indicando a importância do resíduo Y181 na interacção proteína-proteína no complexo CYPOR-CYP. Estas deduções são mais fortemente apoiadas pelos resultados provenientes dos estudos da bioactivação do que pelos estudos de cinética enzimática.

Palavras-chave: NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 humano (CYPOR); citocromo b_5 ; CYP1A2; CYP2A6; variantes Y459H e Y181D da CYPOR.

Abstract

Previous studies showed the different effects of b_5 on the CYP enzymatic complex, which depends on the type of substrate and CYP form involved. For an improvement in understanding of its mode of action, this work intends to study the effect and functional mechanism of b_5 in the CYP enzyme complex.

For this purpose, we used a biplasmid bacterial system that allows the co-expression of one CYP with CYPOR, in the presence or absence of b_5 . We selected two CYPs, CYP1A2 and CYP2A6, once it was demonstrated that the presence of b_5 exerted a strong stimulus over the CYP2A6 catalytic activity, contrary to CYP1A2 which showed a relative insensitivity to the presence of this heme protein. A previous postulated hypothesis assumes that b_5 acts on the electron transfer efficiency from CYPOR to CYP. Therefore we choose two CYPOR variants related with the Antley-Bixler Syndrome, namely Y459H and Y181D, which contains mutations causing a diminished binding of the FAD and FMN prosthetic groups, respectively. These groups are directly involved on the ability to deliver electrons to the CYP. After validation of the different engineered bacterial systems, these were applied in two different approaches to study b_5 in the CYP enzyme complex, namely the influence of b_5 on CYP1A2 and CYP2A6 ability to bioactive mutagens and in a kinetic approach in the determination of activity of these two CYPs, using standard probe-substrates.

The results indicate that CYP's binding site is competed for, by CYPOR and b_5 , as well as by CYPOR and the bacterial redox Fld/FdR system. Results also indicated that b_5 apparently increases the efficiency of the second electron transfer to CYP, causing a decrease in uncoupling, by which the reaction becomes more efficient. There was a stronger competitive effect of b_5 when in the presence of the Y181D variant, relatively to Y459H and wild-type CYPOR. These results suggest a smaller affinity of the CYPOR-Y181D for CYP, indicating a prominent role of the Y181 residue in the protein-protein interaction on the CYPOR-CYP complex. These deductions are more strongly supported by the results from the bioactivation studies, than the kinetic enzymes studies.

Keywords: Human NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase (CYPOR); cytochrome b_5 ; CYP1A2; CYP2A6; variants Y459H and Y181D of CYPOR.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Sistema enzimático - Citocromo P450.....	2
1.1.1.	Reacções catalisadas pelo citocromo P450	2
1.1.2.	Diferentes formas do citocromo P450	4
1.2.	A NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 humano	9
1.3.	Expressão heteróloga de enzimas de biotransformação humanas em diversos sistemas celulares para estudos <i>in vitro</i>	12
1.3.1.	Sistema bacteriano com expressão heteróloga do complexo citocromo P450 humano	13
1.4.	Síndrome de Antley-Bixler	15
1.4.1.	A variante Y459H da CYPOR	17
1.4.2.	A variante Y181D da CYPOR	18
1.5.	Citocromo b_5	19
1.6.	Objectivo.....	22
2.	Materiais e métodos.....	25
2.1.	Materiais	25
2.2.	Condições de cultura das estirpes bacterianas	28
2.2.1.	Crescimento de culturas sem expressão de proteínas heterólogas	28
2.2.2.	Crescimento de culturas com indução da expressão das proteínas heterólogas	28
2.3.	Construção do plasmídeo pLCM_hb5_POR ^{Y459H}	28
2.3.1.	Digestão enzimática de pLCM_POR ^{Y459H} e pLCM_hb5_POR ^{wt} e desfosforilação do DNA plasmídico	29
2.3.2.	Isolamento dos fragmentos de DNA plasmídico	29
2.3.3.	Ligação do vector recipiente e fragmento POR ^{Y459H} e subsequente transformação para <i>E.coli</i> XL10-Gold	29
2.3.4.	Verificação da clonagem do fragmento POR ^{Y459H}	30
2.4.	Construção das estirpes.....	30
2.4.1.	Transformação por electroporação	30
2.4.2.	Verificação das características fenotípicas das estirpes	30
2.4.3.	Análise do conteúdo do DNA plasmídico	31
2.4.4.	Verificação da sensibilidade do alvo genético para detecção de mutagenicidade	32
2.4.5.	Avaliação da expressão de citocromo P450 e b_5 humano na estirpe bacteriana	32
2.5.	Isolamento de fracção membranar bacteriana.....	33
2.6.	Determinação do conteúdo proteico da fracção membranar.....	33
2.7.	Determinação do conteúdo dos citocromos P450 na fracção membranar	34
2.8.	Determinação do conteúdo do citocromo b_5 na fracção membranar	34
2.9.	Determinação da capacidade de redução do citocromo c pela NADPH-oxidoreductase do citocromo P450	34
2.10.	Imunodeteção da CYPOR expressa nas estirpes em estudo.....	35
2.11.	Ensaio de mutagenicidade com estirpes BTC	35

2.12.	Determinação da actividade catalítica do CYP1A2 e do CYP2A6.....	36
2.12.1.	O-Desmetilação da metoxioresorufina	36
2.12.2.	7-Hidroxilação da cumarina.....	37
3.	Resultados.....	39
3.1.	Montagem e validação dos sistemas celulares.....	39
3.1.1.	Clonagem do plasmídeo pLCM_hb5_POR ^{Y459H}	39
3.1.2.	Construção das diferentes estirpes BTC.....	40
3.1.2.1.	Verificação das características fenotípicas das estirpes.....	40
3.1.2.2.	Análise do conteúdo em DNA plasmídico	40
3.1.2.3.	Verificação da sensibilidade do alvo genético para detectar mutagenicidade	41
3.1.2.4.	Pré-avaliação da expressão dos citocromos P450 e citocromo <i>b</i> ₅	42
3.1.3.	Verificação dos factores do complexo enzimático do citocromo P450	44
3.1.4.	Caracterização da capacidade de redução do citocromo <i>c</i> pelas variantes de CYPOR em estudo.....	46
3.2.	Efeito do citocromo <i>b</i> ₅ sobre a actividade catalítica do CYP1A2 e CYP2A6: Estudos de bioactivação.....	46
3.3.	Efeito do citocromo <i>b</i> ₅ sobre a actividade catalítica do CYP1A2 e CYP2A6: Estudos de cinética.....	49
4.	Discussão	55
5.	Conclusão	63
6.	Bibliografia.....	67
7.	Anexos.....	75

Índice de Figuras

Figura 1.1: Esquema geral do ciclo catalítico do CYP. O substrato está representado como “RH”, o código das cores indica os estados de oxidação do ferro do grupo heme.	3
Figura 1.2: Comparação do volume da cavidade do sítio activo do CYP1A2 (A) (PDB: 2HI4) e do CYP2A6 (B) (PDB: 1Z10 (6))..	4
Figura 1.3: Distribuição dos diversos CYPs em percentagem de fármacos metabolizados.....	6
Figura 1.4: Distribuição dos diferentes CYPs nos microsomas do fígado humano.....	6
Figura 1.5: Figura representativa da CYPOR N-66 humana baseada na estrutura cristalina da CYPOR de rato..	10
Figura 1.6: Etapas da transferência de electrões por parte da CYPOR.	10
Figura 1.7: Ilustração representativa do modelo da CYPOR em conformação compacta e aberta na bicamada lipídica.	11
Figura 1.8: Radiografia demonstrativa de sinestesia rádio-humeral em ambos os braços.	15
Figura 1.9: Fotografia de paciente com hipoplasia facial.....	15
Figura 1.10: Modelo da CYPOR humana ilustrativo da localização das alterações causadas pelas mutações.....	16
Figura 1.11: Disposição do b_5 na membrana do retículo endoplasmático.....	19
Figura 1.12: Modelo do complexo CYP- b_5	20
Figura 1.13: Representação esquemática das vias das transferências electrónicas entre o CYP, b_5 e respectivas reductases.	21
Figura 3.1: Representação gráfica do fragmento do plasmídeo pLCM_hb5_POR.....	40
Figura 3.2: Fotografia do gel de electroforese do DNA plasmídico dos transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	41
Figura 3.3: Histograma da detecção de mutagenicidade de 4NQO com candidatos da estirpe BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	42
Figura 3.4: Representação gráfica do espectro diferencial do CYP1A2 (CYP complexado com CO versus CYP reduzido) na estirpe BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	43
Figura 3.5: Representação gráfica do espectro diferencial do b_5 (b_5 reduzido versus b_5 oxidado) na estirpe BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	43
Figura 3.6: Histograma da velocidade de redução do citocromo c nas estirpes BTC1A2_POR e BTC2A6_POR.	46
Figura 3.7: Gráfico representativo da curva dose-resposta em mutagenicidade do NNdEA com a estirpe BTC2A6_POR ^{wt}	47
Figura 3.8: Histograma das actividades mutagénicas relativas dos pró-carcinogénios NNK e IQ nas estirpes com CYP1A2, b_5 e com as variantes da CYPOR, em relação à BTC1A2_POR ^{wt}	48
Figura 3.9: Histograma representativo das actividades mutagénicas relativas dos pró-carcinogénios NNK e NNdEA nas estirpes com CYP2A6, b_5 e com as variantes da CYPOR, em relação à BTC2A6_POR ^{wt}	49
Figura 3.10: Gráfico da velocidade de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) em função da concentração de metoxiresorufina.....	50
Figura 3.11: Histograma dos parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m para a reacção de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD), consoante as diferentes membranas com CYP1A2.	51
Figura 3.12: Histograma da eficácia da reacção ($V_{\text{máx}}/K_m$) de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD), consoante as diferentes membranas com CYP1A2.	52
Figura 3.13: Gráfico da velocidade de 7-hidroxilação da cumarina em função da concentração de cumarina.....	52

Figura 3.14: Histograma dos parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m para a reacção de 7-hidroxilação da cumarina, consoante as diferentes membranas com CYP2A6.....	53
Figura 3.15: Histograma da eficácia da reacção ($V_{\text{máx}}/K_m$) de 7-hidroxilação da cumarina, consoante as diferentes membranas com CYP2A6.....	54
Figura 4.1: Possíveis vias de transferência electrónica na BTC_CYP_POR e BTC_CYP_hb5_POR.....	57
Figura 7.1: Representação esquemática do plasmídeo pCWhCYP.....	75
Figura 7.2: Representação esquemática do plasmídeo pLCM_POR.....	75
Figura 7.3: Representação esquemática do plasmídeo pLCM_hb5_POR.....	76
Figura 7.4: Fotografia da membrana de imunodeteção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC1A2_POR ^{wt} , 5) BTC1A2_POR ^{null} , 6) BTC1A2_POR ^{Y459H} e 7) BTC1A2_POR ^{Y181D}	77
Figura 7.5: Fotografia da membrana de imunodeteção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC1A2_hb5_POR ^{wt} , 5) BTC1A2_hb5_POR ^{null} , 6) BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H} e 7) BTC1A2_hb5_POR ^{Y181D}	77
Figura 7.6: Fotografia da membrana de imunodeteção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC2A6_POR ^{wt} , 5) BTC2A6_POR ^{null} , 6) BTC2A6_POR ^{Y459H} e 7) BTC2A6_POR ^{Y181D}	78
Figura 7.7: Fotografia da membrana de imunodeteção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC2A6_hb5_POR ^{wt} , 5) BTC2A6_hb5_POR ^{null} , 6) BTC2A6_hb5_POR ^{Y459H} e 7) BTC2A6_hb5_POR ^{Y181D}	78
Figura 7.8: Estruturas moleculares dos substratos utilizados no decorrer do estudo.	79
Figura 7.9: Gráfico da velocidade de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) em função da concentração de metoxiresorufina, em presença de FAD (10 μ M).....	79
Figura 7.10: Gráfico da velocidade de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) em função da concentração de metoxiresorufina, em presença de FMN (10 μ M).	80
Figura 7.11: Gráfico de velocidade de 7-hidroxilação da cumarina em função da concentração de cumarina, em presença de FAD (10 μ M).....	81
Figura 7.12: Gráfico de velocidade de 7-hidroxilação da cumarina em função da concentração de cumarina, em presença de FMN (10 μ M).	81

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Outras reacções que ocorrem no ciclo catalítico do CYP.	3
Tabela 1.2: Classificação de CYPs humanos consoante as classes de substratos que metabolizam maioritariamente.	5
Tabela 2.1: Reagentes e respectivos fabricantes.	25
Tabela 2.2: Meios nutritivos e soluções, composição por 500 ml.....	26
Tabela 2.3: Plasmídeos e sua caracterização ao nível de marcadores genéticos.....	26
Tabela 2.4: Estirpes de <i>E.coli</i> e correspondente genótipo.....	27
Tabela 2.5: Sequências dos primers.	27
Tabela 3.1: Quantificação de CYP e b_5 , e rácio b_5 /CYP em bactérias inteiras.	44
Tabela 3.2: Conteúdo de CYP, b_5 , CYPOR e respectivos rácios presentes nas fracções membranares.	45
Tabela 7.1: Actividades mutagénicas dos compostos NNK (revertentes/ μ mol), IQ (revertentes/nmol) e NNDEA (revertentes/ μ mol) para as estirpes em estudo.	76
Tabela 7.2: Parâmetros cinéticos e eficiência da reacção de <i>O</i> -desmetilase da metoxiresorufina (MROD) do CYP1A2 das estirpes BTC1A2_hb5_POR e BTC1A2_hb5_POR.....	80
Tabela 7.3: Parâmetros cinéticos e eficiência da reacção de 7-hidroxilação da cumarina (7-HC) do CYP2A6 das estirpes BTC2A6_hb5_POR e BTC2A6_hb5_POR.	82

Simbologia e abreviaturas

ABS – Síndrome de Antley Bixler
 Δ Abs – variação de absorvência
ACN- acetonitrilo
Amp – ampicilina
 b_5 – citocromo b_5 humano
bp – pares de bases
cdNA – ácido desoxiribonucleico complementar
Cm – cloranfenicol
CYP – citocromo P450 humano
CYPOR – NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 humano
 δ -Ala – ácido δ -aminolevulínico
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA - ácido desoxiribonucleico
DO – densidade óptica
 ϵ – coeficiente de absortividade molar
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
Escherichia coli – *E.coli*
FAD – dinucleotídeo de flavina e adenina
FdR – flavodoxina reductase
Fld – flavodoxina
Fld/FdR – sistema flavodoxina/ flavodoxina reductase
FMN – mononucleotídeo de flavina
g – força gravítica
IPTG – isopropil β -D-tiogalactósido
IQ – 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina
Kan – canamicina
Kb - quilobases
 K_m – constante de Michaelis Menten
 λ – comprimento de onda
L-Arg – L-arginina
LB – “Luria – Bertani”
LPS – parede lipopolissacárida
LPS^d – parede lipopolissacárida incompleta
M9 – meio mínimo
MROD – O-desmetilase da metoxiresorufina

ms - milisegundos

Mthr - metoxioresorufina

NADH – dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NADP⁺ – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma oxidada

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

nm – nanómetros

NNdEA – N-Nitrosodietilamina

NNK – 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona

PMSF – Fluoreto de metilmetanosulfonil

POR – gene codificante de NADPH- oxidoreductase do citocromo P450

4NQO – 4-nitroquinolina-1-óxido

Rev – número de revertentes

RNA - ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

TB – “Terrific-Broth”

Tris – tris(hidroximetil)aminometano

UV – radiações ultravioleta

VB – “Vogel-Bonner”

V_{máx} – Velocidade máxima da reacção

wild type – variante consensual da CYPOR

1. Introdução

O Homem é um ser em constante exposição a compostos químicos, de origem natural ou antropogénica, presentes em todos os compartimentos do ambiente (ar, água e solo). Estes compostos são designados genericamente por xenobióticos podendo ser fármacos, pesticidas, poluentes ambientais, químicos industriais e aditivos alimentares, que entram em contacto com o Homem por via respiratória, cutânea ou digestiva.

A esmagadora maioria dos xenobióticos são de natureza lipofílica facilitando a sua absorção através das membranas biológicas e dificultando a eliminação devido ao facto de serem facilmente reabsorvidos. Por conseguinte, para que não se verifique uma acumulação de compostos tóxicos no organismo é imperativo a sua eliminação por metabolização ou biotransformação (Parkinson, 2008).

Na inexistência da biotransformação, os xenobióticos poderiam acumular-se no organismo com potencial de se tornarem nocivos. O objectivo principal da biotransformação é a alteração das características dos xenobióticos, alterando os seus efeitos biológicos ao serem quimicamente modificados, convertendo-os em compostos mais hidrossolúveis, de modo a que a sua excreção seja facilitada e a sua reabsorção dificultada (Parkinson, 2008).

As reacções de biotransformação ocorrem principalmente no fígado, mas também nos rins, pulmões, tracto gastrointestinal e tecido nervoso, compreendendo duas fases distintas, fase I e fase II. As reacções de fase I incluem reacções de oxidação, redução e hidrólise de forma a introduzir ou expor grupos funcionais nas moléculas dos xenobióticos, transformando os químicos hidrofóbicos em intermediários que são mais hidrofílicos e mais adaptados para sofrerem modificações na fase II. Na fase subsequente (fase II) são catalisadas reacções de conjugação de xenobióticos ou de metabolitos provenientes da fase I. As reacções de conjugação, como por exemplo com o glutatião, ácido glucorónico ou o ião sulfato, resultam em metabolitos mais hidrofílicos, facilitando o transporte e eliminação por via renal ou biliar dos compostos potencialmente tóxicos (Vermeulen, 1996).

No entanto, o processo de biotransformação tornando os xenobióticos mais hidrofílicos e facilitando a excreção de compostos possivelmente nocivos, pode conduzir ao risco de os transformar em compostos mais reactivos, capazes de se ligarem de forma covalente a proteínas, RNA (ácido ribonucleico) e DNA (ácido desoxiribonucleico), bem como gerar espécies radiculares podendo interferir no normal funcionamento de processos celulares (Guengerich, 2008). Assim, as reacções de biotransformação, que constituem uma importante via de destoxificação de compostos estranhos ao organismo, podem ainda constituir uma via de bioactivação, susceptível de transformar compostos químicos, inertes ou pouco tóxicos, em produtos de elevada toxicidade. No entanto, o efeito tóxico de um xenobiótico não é apenas dependente da sua reactividade química

intrínseca, mas também da sua toxicocinética, ou seja, da forma como é efectuada a absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) em determinados tecidos no organismo humano (Kranendonk *et al.*, 1999a; Guengerich, 2006; Parkinson, 2008).

1.1. Sistema enzimático - Citocromo P450

De todas as enzimas da biotransformação o sistema enzimático citocromo P450 (CYP) ocupa o primeiro lugar em termos de versatilidade catalítica, pelo grande número de xenobióticos que biotransforma.

Este sistema enzimático é constituído por uma superfamília de hemoproteínas, os citocromos P450, por uma flavoproteína dependente de NADPH denominada NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 (CYPOR) e ainda pelo citocromo b_5 (b_5) e sua respectiva reductase dependente de NADH, denominada NADH-reductase do citocromo b_5 (Porter, 2002; Parkinson, 2008).

Os níveis mais altos de CYP são encontrados no fígado mas estas proteínas estão presentes praticamente em todos os tecidos. As enzimas CYP desempenham um papel preponderante na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos) e substâncias endógenas (esteróides, ácidos gordos, vitaminas lipossolúveis, eicosanóides), ressaltando a versatilidade catalítica do CYP (ver secção 1.1.2) (Guengerich, 2004; Parkinson, 2008).

O CYP é uma hemoproteína com o seu grupo heme geralmente no estado férrico (Fe^{3+}), podendo ser reduzido ao estado ferroso (Fe^{2+}) possibilitando a sua ligação a ligandos como o oxigénio molecular (O_2) ou monóxido de carbono (CO). O complexo CYP-CO tem um máximo de absorção no comprimento de onda (λ) de 450 nm, derivando deste facto o seu nome. O máximo de absorção do complexo CYP-CO difere ligeiramente entre as diferentes formas de CYP, variando a sua absorvência entre os 447 nm e os 452 nm, enquanto os restantes complexos CO-enzimas hémicas absorvem a 420 nm (Parkinson, 2008). É com base nesta característica que é possível a execução de um método que visa quantificar adequadamente o CYP, quer em células quer em extractos membranares (Guengerich *et al.*, 2009).

1.1.1. Reacções catalisadas pelo citocromo P450

A actividade básica do CYP é a de monooxigenase (Equação 1), mas estas enzimas catalisam uma grande variedade de reacções químicas entre as quais, a hidroxilação de átomos de carbono alifáticos ou aromáticos, a epoxidação, a desalquilação de heteroátomos (N-, O- ou S-), a clivagem de ésteres, a desidrogenação, a transferência do grupos oxidativos, a desalogenação oxidativa e oxigenação de heteroátomos (N-, I- ou S-) (Parkinson, 2008).



Relativamente ao ciclo catalítico do CYP (Figura 1.1), está patente no estado A do CYP o seu estado inicial férrico (Fe^{3+}). Na passagem do estado A para B ocorre a ligação do substrato (RH), que por adição de um electrão proveniente da CYPOR (utilizando o NADPH) reduz o heme do CYP à sua forma ferrosa (Fe^{2+}) (estado C). O oxigénio molecular (O_2) liga-se ao CYP na sua forma ferrosa, formando o complexo Fe^{2+}O_2 (estado D) que é convertido para o complexo Fe^{2+}OO (estado E) após a adição de um segundo electrão, derivado da CYPOR ou do b_5 , e para o complexo Fe^{2+}OOH (estado F) após adição de um protão (H^+). A introdução de um segundo protão cliva o complexo F produzindo água e o complexo $(\text{FeO})^{3+}$ (estado G), que transfere o seu átomo de oxigénio activado para o substrato (estado H). A libertação do substrato oxidado (ROH) leva o CYP ao seu estado inicial (estado A) (Parkinson, 2008).

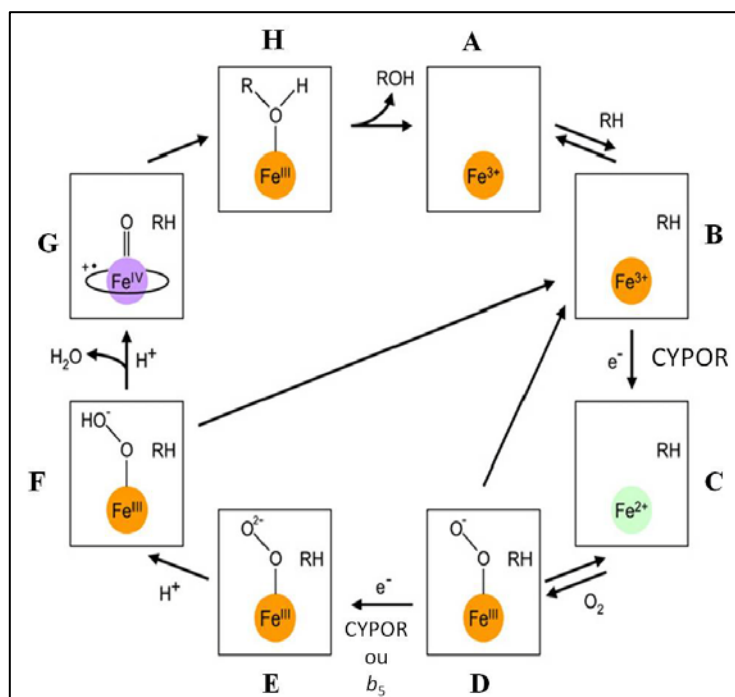


Figura 1.1: Esquema geral do ciclo catalítico do CYP. O substrato está representado como “RH”, o código das cores indica os estados de oxidação do ferro do grupo heme (Durr *et al.*, 2007).

Tabela 1.1: Outras reacções que ocorrem no ciclo catalítico do CYP.

Outras reacções		
Redução de um electrão	$\text{C (Fe}^{2+} \text{ RH)}$	$\rightarrow \text{A (Fe}^{3+}) + \text{RH}^{\cdot}$
Produção do anião superóxido	$\text{D (Fe}^{2+}\text{O}_2 \text{ RH)}$	$\rightarrow \text{B (Fe}^{3+} \text{ RH)} + \text{O}_2^{\cdot -}$
Produção do peróxido de hidrogénio	$\text{F (Fe}^{2+}\text{OOH RH)} + \text{H}^+$	$\rightarrow \text{B (Fe}^{3+} \text{ RH)} + \text{H}_2\text{O}_2$
Peroxide shunt	$\text{B (Fe}^{3+} \text{ RH)} + \text{XOOH}$	$\rightarrow \text{G (FeO)}^{3+} \text{ RH} + \text{XOH}$

Existem duas possibilidades para as reacções se poderem desviar do seguimento normal do ciclo, tomando caminhos alternativos, que levam à formação do radical anião superóxido ou do peróxido de hidrogénio. Se o ciclo catalítico for interrompido (desacoplamento) após a introdução do primeiro electrão, o oxigénio é libertado na forma de anião superóxido, se o ciclo for interrompido após a introdução do segundo electrão, o oxigénio é libertado como peróxido de

hidrogénio (H_2O_2). Em condições anaeróbias ou em baixo teor de oxigénio, o CYP pode transferir os electrões directamente para o substrato, apresentando assim uma actividade de reductase. Os CYPs podem ainda funcionar como peroxidases sendo as suas reacções suportadas por hidroperóxidos, isto na ausência da CYPOR e do NADPH. Nestes casos, o átomo de oxigénio incorporado no substrato é proveniente do peróxido de hidrogénio ou de outros hidroperóxidos (*peroxide shunt*) (Figura 1.1, Tabela 1.1) (Parkinson, 2008).

Supõe-se que nos CYPs humanos os substratos se liguem na cavidade localizada acima da superfície distal do grupo prostético heme (Figura 1.2) e os parceiros redox (Sansen *et al.*, 2007), CYPOR ou b_5 se liguem no local formado pelo sítio de ligação ao grupo heme e pela superfície proximal (Guengerich, 2005).

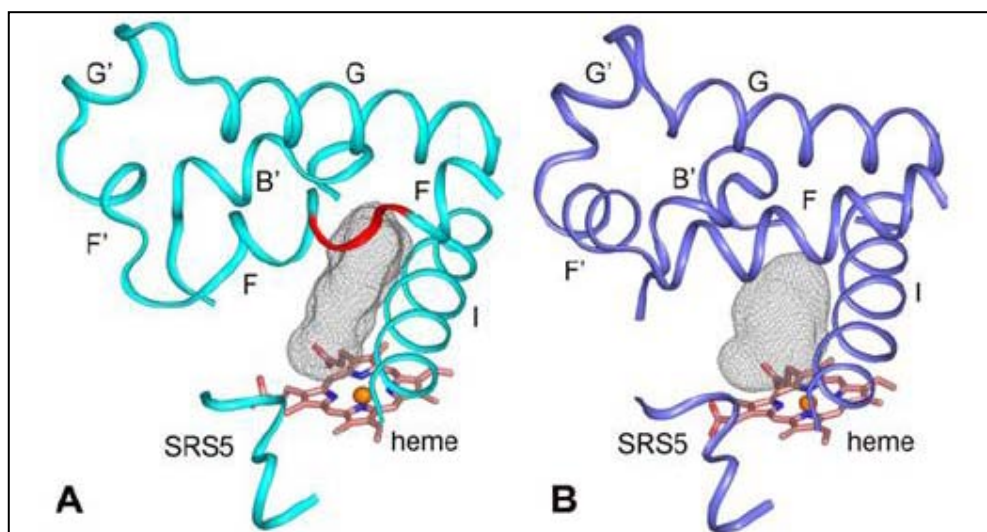


Figura 1.2: Comparação do volume da cavidade do sítio activo do CYP1A2 (A) (PDB: 2HI4) e do CYP2A6 (B) (PDB: 1Z10 (6)). [O grupo prostético heme está representado em configuração com estilo *sticks* rosa. A cavidade de ligação do substrato está representada como uma superfície de malha cinzenta] (Sansen *et al.*, 2007).

Mediante a forma do CYP e substrato em causa, poderá haver intervenientes que actuem no ciclo catalítico do CYP. O b_5 é um dos possíveis intervenientes neste ciclo, podendo estimular, inibir ou não exercer qualquer tipo de efeito sobre a actividade catalítica dos CYPs (ver secção 1.5) (Mokashi *et al.*, 2003; Yamaori *et al.*, 2003).

A hemoproteína denominada Hpr6 (*heme-1 domain protein*) ou PGRMC1 (*progesterone receptor component 1*) (Crudden *et al.*, 2006), foi identificada como podendo interagir e afectar a actividade dos CYPs. Através de ensaios *in vitro* com a referida hemoproteína, mostrou-se que esta se liga de forma estável aos CYP51A1, CYP7A1, CYP21A2 ou CYP3A4 humanos, demonstrando ainda conseguir regular positivamente o funcionamento do CYP51A2 (Hughes *et al.*, 2007).

1.1.2. Diferentes formas do citocromo P450

Após a sequenciação completa do genoma humano foi possível identificar 57 genes de CYP e 58 pseudogenes (Guengerich, 2008). Este número é bastante inferior ao encontrado noutras

espécies animais, como por exemplo, o ratinho (102 genes), em plantas como o arroz (*Oryza sativa* L. 323 genes) ou a *Arabidopsis thaliana* (249 genes), embora seja bastante similar ao número de genes do CYP do cão (54 genes) (Ingelman-Sundberg, 2004). Os 57 diferentes genes do CYP, divididos por 18 famílias e 43 subfamílias (<http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>), têm uma expressão heterogenia nos tecidos apresentando diferentes mecanismos de regulação de expressão e relativamente baixa especificidade para os substratos. Deste modo, uma forma de CYP pode metabolizar diferentes substratos e um substrato pode ser metabolizado por diferentes CYPs, o que pode resultar na obtenção de diferentes produtos. Contudo, normalmente os CYPs são agrupados de acordo com a/as classe(s) de substratos que metabolizam maioritariamente (Guengerich, 2006; Parkinson, 2008) como demonstrado na Tabela 1.2.

Tabela 1.2: Classificação de CYPs humanos consoante as classes de substratos que metabolizam maioritariamente (Guengerich, 2006; Parkinson, 2008).

Xenobióticos	Esteróides	Ácidos gordos	Eicosanóides	Ácido biliar	Vitaminas	Ácido retinóico	Desconhecido
1A1	1B1	2J2	4F2	7A1	2R1	26A1	2A7
1A2	7A1	4A11	4F3	7B1	24A1	26B1	2S1
1B1	7B1	4B1	4F8	8B1	26A1		2U1
2A6	8B1	4F12	5A1 ^a	27A1 ^e	26B1		2W1
2A13	11A1		8A1	39A1	26C1 ^d		3A43
2B6	11B1		8A1 ^c	46A1	27B1		4A22
2C8 ^b	11B2			51A1 ^g			4F11
2C9 ^b	17A1						4F22
2C18	19A1						4V2
2C19	21A2						4X1
2D6	27A1						4Z1
2E1	39A1						20A1
2F1	46A1						27C1
2J2 ^b	51A1						
3A4 ^f							
3A5							
3A7							
4F3 ^b							

^aSintetase da tromboxina A (TBXAS1); ^bTambém envolvido no metabolismo dos ácidos gordos e eicosanóides; ^cSintetase da prostaglandina I₂(prostaciclina) (PTGIS); ^dTambém envolvido no metabolismo do ácido retinóico; ^eTambém envolvido no metabolismo da vitamina D; ^fTambém envolvido na síntese do ácido biliar; ^gTambém envolvido na biossíntese do colesterol.

As enzimas da família CYP1, CYP2 e CYP3 estão envolvidas principalmente na biotransformação de xenobióticos, sendo responsáveis por 70 a 80% do metabolismo na fase I da biotransformação de fármacos clinicamente usados actualmente (Ingelman-Sundberg, 2005), enquanto outras famílias (CYP4, 11, 17, 19 e 21) estão dirigidas, principalmente, para o metabolismo de endobióticos (Purnapatre *et al.*, 2008).

Com uma maior relevância para o metabolismo dos fármacos parecem estar os CYPs 2D6, 2C19, 2C9 e 3A4 (Figura 1.3), enquanto que os CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 e CYP3A4 são os principais responsáveis pela bioactivação de pré-genotóxicos, bioactivando cerca de 90% dos carcinógenos conhecidos (Guengerich, 2001; Ingelman-Sundberg, 2005). É de realçar que

apesar do CYP2A6 apenas metabolizar 2% dos fármacos (Figura 1.3), tem um papel muito importante na oxidação da nicotina, bem como na metabolização da grande classe de genotóxicos, nomeadamente de agentes alquilantes, sendo a sua expressão e função influenciadas por vários polimorfismos genéticos (Zanger *et al.*, 2008). O CYP com mais elevada expressão hepática é o CYP3A4 (Figura 1.4) que parece ter um papel de elevada importância na metabolização de fármacos, estimando-se que cerca de 43% (Figura 1.3) dos fármacos metabolizados estejam a seu encargo (Ingelman-Sundberg, 2004).

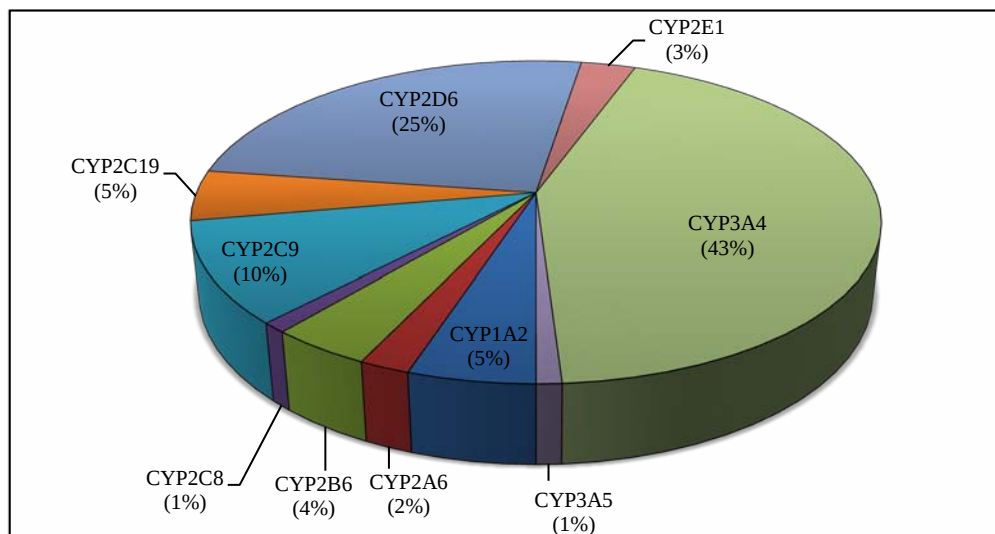


Figura 1.3: Distribuição dos diversos CYPs em percentagem de fármacos metabolizados (adaptado de Ingelman-Sundberg, 2004).

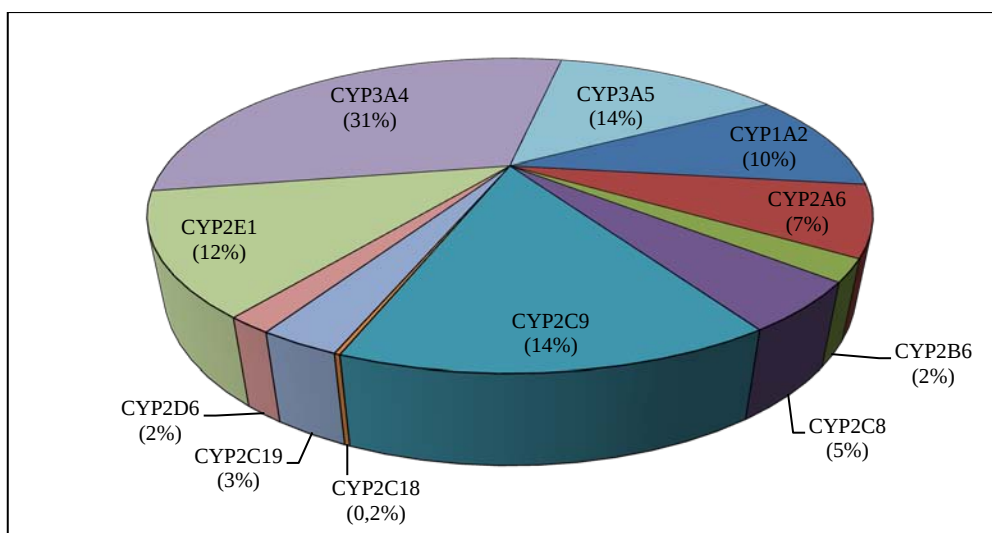


Figura 1.4: Distribuição dos diferentes CYPs nos microsomas do fígado humano (adaptado de Parkinson, 2008).

A grande maioria dos CYPs envolvidos na biotransformação de xenobióticos apresenta polimorfismos genéticos, que podem consistir em deleções, amplificações ou mutações pontuais, quer nas sequências codificantes quer nas sequências regulatórias de expressão dos seus genes (Thier *et al.*, 2003). Deste modo, os polimorfismos podem alterar os níveis de expressão e/ou a especificidade dessas enzimas, causando alterações na sua actividade catalítica, bem como reacções inesperadas a fármacos (Ingelman-Sundberg, 2004; Ingelman-Sundberg, 2005; Zanger *et al.*, 2008).

1.1.2.1. O CYP1A2

O CYP1A2 é a principal enzima da família 1 do CYP expressa no fígado humano, correspondendo a 10% do seu conteúdo em CYPs (Parkinson, 2008).

Esta enzima catalisa a bioactivação de pré-carcinogénios como aminas aromáticas (ex: 2-aminoantraceno (2AA)), heterocíclicas (ex: 2-amino-3-metilmidazo[4,5-f]quinolina (IQ)) e nitrosaminas (ex: 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK)) (Duarte *et al.*, 2005a; Duarte *et al.*, 2005b; Guengerich, 2008), desempenhando um papel preponderante na metabolização da cafeína e da melatonina, bem como em fármacos comercializados, tais como flutamida, varfarina, trianterene, naproxen e lidocaína (Sansen *et al.*, 2007; Zanger *et al.*, 2008).

A grande importância do CYP1A2 na biotransformação de xenobióticos pode ser explicada pelo facto da estrutura cristalina da proteína revelar uma elevada adaptação a moléculas planares relativamente grandes (Figura 1.2) como as arilaminas (Sansen *et al.*, 2007).

O gene do CYP1A2 está localizado no cromossoma 15 (15q24.1) (Jiang *et al.*, 2005) e tem aproximadamente 7,8 Kb, sendo composto por sete exões e seis intrões (Ikeya *et al.*, 1989). Até à data foram publicados na página da internet do *Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm>) 36 haplótipos de CYP1A2, sendo que 15 dos haplótipos estão na região codificante e 21 na região não codificante, com efeitos mais ou menos severos sobre a sua actividade (Palma *et al.*, 2010).

A presença de diferenças inter-individuais nos níveis de expressão e actividade de CYP1A2 contribuem para que haja diferenças significativas entre os indivíduos na eliminação dos fármacos, podendo deste modo existir relevância clínica (Sansen *et al.*, 2007). Até à data apenas se sabe que estas variações na actividade catalítica do CYP1A2 são regidas principalmente por factores genéticos, embora os factores ambientais também tenham alguma influência (Ghotbi *et al.*, 2007), como por exemplo o caso do tabaco e da dieta que actuam como indutores da actividade do CYP1A2, como também os contraceptivos orais e as quinolonas que são inibidores do CYP1A2 (Kalow e Tang, 1991).

Diversos estudos apontam para uma relação entre a actividade de CYP1A2 com o aumento do risco de desenvolvimento de cancros da bexiga e cólon (Guengerich, 2005). Esta relação pode ser explicada pela possível formação de metabolitos reactivos, que podem causar mutações

originando o desenvolvimento de tumores, formados devido à bioativação de pré-carcinogénios efectuada pelo CYP1A2 (Sansen *et al.*, 2007; Purnapatre *et al.*, 2008).

1.1.2.2. O CYP 2A6

O CYP2A6 pertencente à subfamília CYP2A e é expresso no fígado, correspondendo a 7% do seu conteúdo em CYPs (Parkinson, 2008), sendo também expresso na mucosa nasal, traqueia e pulmões (Ding e Kaminsky, 2003).

Este CYP polimórfico hepático é a principal enzima responsável pela destoxificação da nicotina, pela hidroxilação da cumarina e ainda está presente no metabolismo de fármacos como tegafur, fradazole, metoxiflurano e ácido valpróico (Sansen *et al.*, 2007; Parkinson, 2008). O CYP2A6 activa também carcinogénios, incluindo as nitrosaminas (ex: 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK)) presentes no fumo do tabaco e a aflatoxina B₁ (Nakajima *et al.*, 2006; Rossini *et al.*, 2008).

A arquitectura da cavidade do sítio activo do CYP2A6 demonstrou que este estava bem adaptado para a oxidação de substratos pequenos e planares (Figura 1.2) como é o caso da cumarina (Sansen *et al.*, 2007).

O gene do CYP2A6 encontra-se no cromossoma 19 (19q13.2) (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995) e foram publicados na página da internet do *Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2a6.htm>) 81 haplótipos do CYP2A6. A variação nos níveis de expressão e actividade de CYP2A6 podem dever-se a polimorfismos genéticos, bem como a diferenças de regulação, como foi demonstrado pelo composto 8-metoxipsoraleno (estrutura análoga à cumarina) e outros compostos da dieta ou fármacos (Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Parkinson, 2008).

Estudos realizados permitiram inferir que em tumores do fígado, a sobre-expressão do CYP2A6 estava associada à inflamação crónica e à cirrose. Contudo, indivíduos com uma deficiência genética ao nível do CYP2A6 apresentavam um risco menor do fumo do tabaco induzir cancro do pulmão, presumivelmente porque estes indivíduos têm uma capacidade reduzida de bioactivar as nitrosaminas do tabaco para metabolitos cancerígenos (Kamataki *et al.*, 2005). A existência de alelos nulos no gene do CYP2A6 causa a ausência de metabolização da nicotina, tendo os portadores destes alelos tendência a fumar menos, presumivelmente porque as concentrações de nicotina no sangue e no cérebro permanecem elevadas durante mais tempo do que nos indivíduos portadores dos alelos *wild type*. Assim sendo, já se especulou sobre uma nova possibilidade de prevenir e tratar o tabagismo por inibição do CYP2A6 (Zanger *et al.*, 2008).

1.2. A NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 humano

A NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 humano (CYPOR) é uma flavoproteína microsomal com aproximadamente 78 KDa, que transfere electrões do NADPH para todos os CYPs microsomais, bem como para a reductase do 7-dehidrocolesterol, monooxigenase do escaleno e para as oxigenases hémicas (Guengerich, 2005). Contrariamente, os CYPs mitocondriais, são sustentados por um sistema que é composto pela adrenodoxina em conjunto com a reductase da adrenodoxina (Paine *et al.*, 2005). A transferência de electrões por parte da CYPOR é requerida para catalisar etapas no metabolismo de xenobióticos e vias bioquímicas de desenvolvimento, incluindo o metabolismo de esteróis, homeostasia do ácido retinóico e síntese de andrógenos / glicocorticóides (Marohnic *et al.*, 2009).

A CYPOR faz parte da família de proteínas FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina) - FMN (mononucleotídeo de flavina), que inclui também a sintetase do óxido nítrico, a sintetase e reductase da metionina e uma nova reductase expressa no citoplasma de algumas células cancerígenas, sendo estas as enzimas humanas conhecidas que possuem, simultaneamente, como grupos prostéticos o FAD e o FMN (Schacter *et al.*, 1972; Nishino e Ishibashi, 2000; Hamdane *et al.*, 2009).

Em termos funcionais é possível, em primeiro lugar, distinguir dois diferentes domínios nesta enzima: um domínio N-terminal hidrofóbico, através do qual se processa a ancoragem da proteína à membrana e um domínio C-terminal, hidrofílico e catalítico (Marohnic *et al.*, 2006). Para além de assegurar a integração da proteína na membrana, é sugerido que o domínio N-terminal também tem um papel importante nas interações proteína-proteína que ocorrem entre a CYPOR e os diversos CYPs, uma vez que não se verifica a transferência de electrões entre estas proteínas quando o referido domínio está alterado (Paine *et al.*, 2005). Estas evidências indicam a existência de processos específicos por parte da interacção entre CYP e CYPOR na eficiência da transferência de electrões. A determinação da estrutura cristalina da CYPOR de rato (Figura 1.5) (Wang *et al.*, 1997), homóloga à proteína humana em cerca de 95% (Fluck *et al.*, 2007), revelou a subdivisão do domínio C-terminal, desta enzima, em quatro domínios funcionais distintos. Um domínio corresponde à zona da proteína que interage com o NADPH, sendo que um outro corresponde à zona de ligação ao FAD. Para além destes, um terceiro faz a união entre a zona de ligação ao FAD e a zona de ligação ao FMN, com uma elevada flexibilidade estrutural, e ainda um quarto domínio que corresponde à zona de ligação do FMN, bem como à área de interacção da CYPOR com o CYP (Wang *et al.*, 1997).

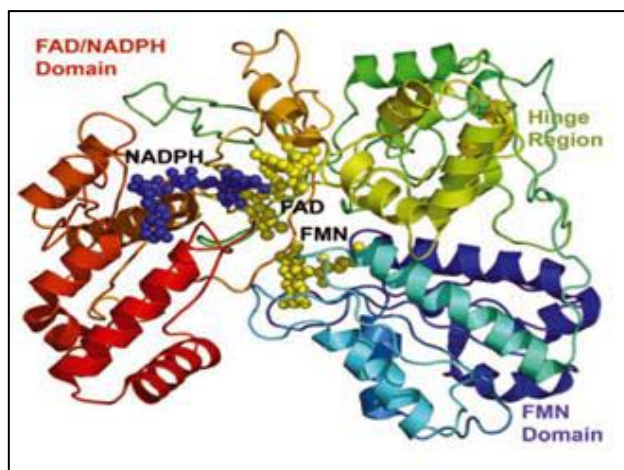


Figura 1.5: Figura representativa da CYPOR N-66 humana baseada na estrutura cristalina da CYPOR de rato. [No modelo o N-terminal está representado a fitas azuis e o C-terminal a vermelho] (Fluck *et al.*, 2007).

A CYPOR catalisa a transferência de electrões entre o NADPH e o CYP sendo este processo (Figura 1.6), supostamente, concomitante de mudanças conformacionais (Miller, 2004). A CYPOR actua primeiramente ligando-se ao NADPH no domínio do C-terminal que contém o FAD, aceitando um par de electrões em forma de hidreto (H^-) originando uma alteração conformacional (Figura 1.6 (a)). Esta alteração provoca a flexão da CYPOR e o alinhamento dos anéis isoaloxadina do FAD e do FMN, presente no domínio mais N-terminal, permitindo a redução do FMN por FAD-reduzido (Figura 1.6 (b)). A molécula CYPOR flexa novamente na sua dobra, expondo o domínio FMN, facilitando a ligação do parceiro redox, o CYP. Os electrões provenientes do FMN transitam para o átomo de ferro do grupo heme da enzima, permitindo que a catálise ocorra com a ligação do substrato ao sitio activo do CYP (Figura 1.6 (c)) (Miller, 2004; Paine *et al.*, 2005).

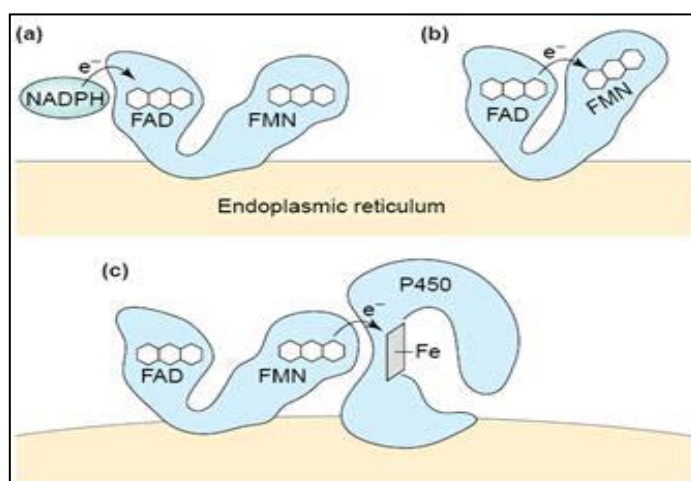


Figura 1.6: Etapas da transferência de electrões por parte da CYPOR (Miller, 2004).

Recentes estudos sobre a mudança conformacional da CYPOR, durante o percurso de transferência electrónica do NADPH para o grupo heme do CYP, apontavam para um modelo em

que a CYPOR adoptava uma conformação compacta em equilíbrio com uma conformação aberta (Ellis *et al.*, 2009). Relativamente a este modelo sugerido para a CYPOR (Figura 1.7), na conformação aberta o grupo prostético FMN exposto ao solvente favorece uma transferência eficiente de electrões do FMN para o átomo de ferro do grupo heme da molécula CYP, enquanto a conformação compacta parece facilitar a transferência de electrões do grupo prostético FAD para o FMN. O equilíbrio entre a forma aberta e a compacta da CYPOR é considerado dependente do estado redox, da ligação do NADP^+ e da ligação do substrato, fornecendo assim evidências de que estas duas conformações são fisiologicamente relevantes (Ellis *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2010).

Um outro modelo, relativo à mudança conformacional da CYPOR, baseia-se na desordem do domínio FMN encontrado na estrutura cristalina do CYPOR do rato (Hubbard *et al.*, 2001). Neste modelo a desordem no domínio FMN é sugerida como sendo uma consequência do movimento rotacional horizontal do domínio FMN da CYPOR. O movimento rotacional horizontal do domínio do FMN ocorre aquando da transferência do electrão do FAD para o FMN, passando este do estado oxidado ao estado reduzido (Hamdane *et al.*, 2009). Neste modelo existem duas áreas de ligação para o FMN, sendo elas para o FMN-oxidado e FMN-reduzido (Ivanov *et al.*, 2010).

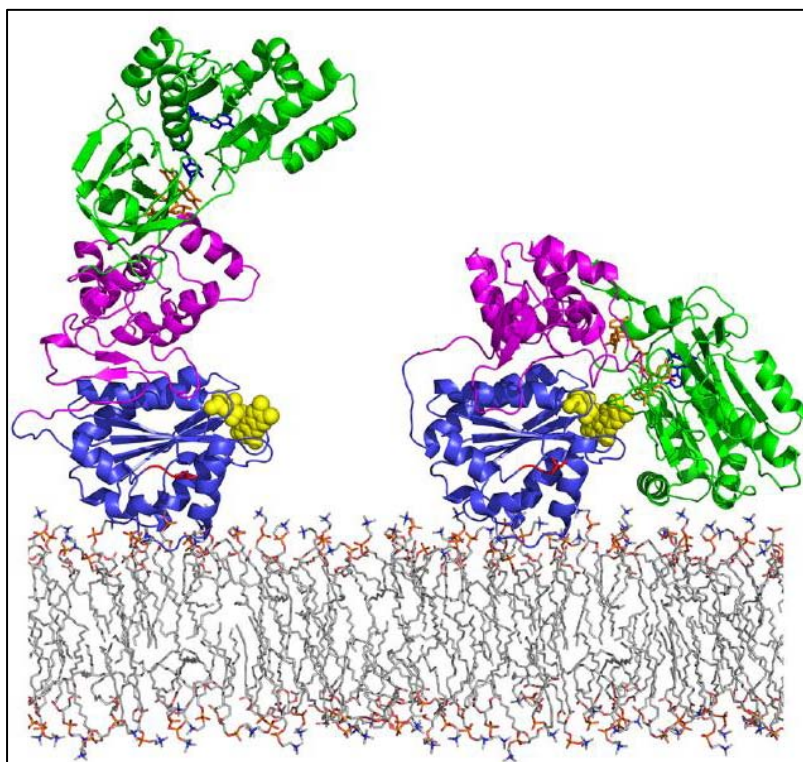


Figura 1.7: Ilustração representativa do modelo da CYPOR em conformação compacta e aberta na bicamada lipídica. [Neste modelo o domínio de ligação FMN está posicionado na superfície da membrana, e a conformação aberta e compacta estão ilustradas com a sua orientação *in vivo* prevista. O domínio FMN está ilustrado a azul, o domínio de ligação a púrpura, o domínio de ligação FAD e NADPH representado a verde, o FMN está em esferas amarelas e o FAD *sticks* laranja e o NADPH a *sticks* azuis.]

1.3. Expressão heteróloga de enzimas de biotransformação humanas em diversos sistemas celulares para estudos *in vitro*

Com o avanço da engenharia genética foi possível um maior conhecimento de genes de muitas das enzimas de biotransformação humanas, o desenvolvimento de um elevado número de vectores de expressão para cDNAs, bem como o aperfeiçoamento das técnicas de transferência desses vectores para os sistemas celulares hospedeiros. Por conseguinte, houve o desenvolvimento de vários sistemas celulares tais como, bactérias, leveduras, células de insecto e de mamífero com expressão heteróloga de uma ou de várias enzimas de biotransformação humanas (Wiebel *et al.*, 1997). Estes sistemas celulares têm sido uma ferramenta de grande utilidade na realização de estudos *in vitro* toxicológicos e farmacológicos. A utilização de um sistema celular específico depende da existência, nesse sistema, de um alvo disponível para revelar o tipo de toxicidade que se pretende detectar, bem como do mesmo reflectir adequadamente a biotransformação. Assim sendo, a capacidade de um xenobiótico, ou dos seus metabolitos, para interagir com diversos alvos celulares pode ser detectada em todos os sistemas celulares. No entanto, a detecção de mutações em determinados genes ou a observação de determinadas alterações morfológicas só é possível em alguns dos referidos sistemas (Wiebel *et al.*, 1997).

A utilização dos sistemas celulares com expressão heteróloga de enzimas de biotransformação para o estudo do metabolismo e da toxicidade de xenobióticos requer que estes sejam estáveis e bem caracterizados quanto à capacidade de biotransformação quer intrínseca quer adquirida, e ainda de possibilitarem a detecção de situações quer de citotoxicidade, quer de genotoxicidade (Wiebel *et al.*, 1997). Uma das vantagens da expressão heteróloga das enzimas de biotransformação assenta na possibilidade de estudar facilmente a actividade de enzimas extra-hepáticas, como o CYP1B1 (Shimada *et al.*, 2001) ou CYP2A13 (Su *et al.*, 2000), cujo estudo, recorrendo a extractos enzimáticos ou a células de outros tecidos, se torna limitante devido à escassez nestes tecidos humanos e à baixa concentração em que estas enzimas aí se encontram (Jalas *et al.*, 2005).

Quando os sistemas de expressão heteróloga apenas se centram na actividade de uma dada enzima têm a limitação de não permitirem obter uma visão global da biotransformação de um xenobiótico, permitindo porém determinar a contribuição individual dessa enzima para a metabolização desse xenobiótico e, desta forma, caracterizar etapas específicas do seu metabolismo (Friedberg *et al.*, 1999).

A expressão heteróloga de enzimas de biotransformação em sistemas celulares tem igualmente permitido estudar as características e especificidades das enzimas da biotransformação (Nakamura *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004), avaliar as diferenças de funcionamento das suas variantes alélicas (Shimada *et al.*, 2001; Palma *et al.*, 2010), prever as perturbações que podem ocorrer na metabolização de um composto, devido à presença de um outro que com ele

tenha sido co-administrado (*Drug-Drug interaction* (DDI)) (Friedberg *et al.*, 1999) e ainda avaliar o funcionamento de enzimas que são combinadas por co-expressão (Duarte *et al.*, 2007).

1.3.1. Sistema bacteriano com expressão heteróloga do complexo citocromo P450 humano

A expressão das enzimas de biotransformação humanas em bactérias constitui uma forma rápida e pouco dispendiosa para a obtenção de elevadas quantidades de proteínas recombinantes (Wiebel *et al.*, 1997).

Apesar das várias vantagens da expressão heteróloga em bactérias, esta encontra-se limitada às enzimas cujas actividades catalíticas não sejam dependentes de modificação pós-traducionais tais como, glicosilações ou fosforilações, que não se processam em procariotas (Gonzalez e Korzekwa, 1995).

Em relação à expressão de proteínas membranares como é o caso dos CYPs (Barnes *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1992b; Kamataki *et al.*, 2002) ou das glucoroniltransferases (Ouzzine *et al.*, 1994), é imperativo que se efectuem modificações na extremidade 5' do cDNA humano, correspondente à zona da proteína responsável pela ligação à membrana.

A *Escherichia coli* (*E.coli*) tem sido de entre várias bactérias existentes, o hospedeiro mais utilizado para efectuar a expressão heteróloga de enzimas de biotransformação humanas. As razões que levam a *E.coli* a ser a principal escolha são os elevados níveis de expressão que permite alcançar, as elevadas densidades celulares que se conseguem obter, a facilidade de manipulação genética destes organismos e ainda a existência de uma grande multiplicidade de estirpes e de vectores com fortes promotores (Friedberg *et al.*, 1999). A *E.coli* possui um sistema reductase bacteriano capaz de suportar, ainda que ineficazmente, determinadas actividades catalíticas de alguns CYPs de mamíferos (Barnes *et al.*, 1991; Kranendonk *et al.*, 1998), sendo necessário para uma actividade catalítica franca a co-expressão da CYPOR (Kranendonk *et al.*, 1998) e, em alguns casos, também do b_5 (Cooper e Porter, 2000; Duarte *et al.*, 2007). Com a finalidade de co-expressar os CYPs com a sua respectiva reductase são seguidas várias estratégias. Essas estratégias passam pela expressão das duas proteínas sob o controlo de um único promotor (expressão bicistrónica) (Kranendonk *et al.*, 1999b; Zhou *et al.*, 2004), pela expressão das duas proteínas sob o controlo de dois promotores num mesmo plasmídeo (Kamataki *et al.*, 2002) ou em plasmídeos diferentes (Kranendonk *et al.*, 1999a; Kranendonk *et al.*, 1999b), ou ainda pela expressão de uma proteína de fusão contendo as competências funcionais do CYP e da CYPOR (Kranendonk *et al.*, 1999a). Existem implicações ao nível das razões molares CYPOR/CYP nas diferentes estratégias. Deste modo, enquanto a utilização de proteínas de fusão só permite, em princípio, obter razões 1:1, a utilização da expressão bi-plasmídica, recorrendo a plasmídeos com diferentes números de cópias por célula (Kranendonk *et al.*, 1999a; Kranendonk *et al.*, 1999b), ou a expressão no mesmo

plasmídeo mas recorrendo à utilização de dois diferentes promotores (Li *et al.*, 1999), permite obter razões molares CYPOR/CYP mais baixas e mais próximas das razões molares encontradas em microssomas de fígado humano (entre 0,08-0,5) (Paine *et al.*, 1997; Venkatakrishnan *et al.*, 2000).

A estirpe de *E.coli* utilizada actualmente pelo grupo de Kranendonk e colaboradores, BTC, foi desenhada e construída para a co-expressão das enzimas humanas CYP e CYPOR (Duarte *et al.*, 2005a). Esta co-expressão é baseada num sistema biplasmídico que permite obter uma estequiometria CYPOR/CYP semelhante à encontrada em microssomas de fígado humano (Kranendonk *et al.*, 1999a; Kranendonk *et al.*, 1999b). Este tipo de estequiometria é conseguido devido ao facto dos plasmídeos serem de classes diferentes, não criando incompatibilidade plasmídica, de o número de cópias dos plasmídeos serem diferentes e ainda devido à diferença de promotores aplicados. O pCWh_CYP (Anexos: Figura 7.1) é um vector de expressão em *E.coli* que contém o cDNA de um CYP humano, confere resistência à ampicilina, no qual a expressão do CYP é controlada por dois promotor *tac* seguidos, sob controlo do repressor LacI^q, e é induzido pelo isopropil β-D-tiogalctósido (IPTG). O pLCM_POR (Anexos: Figura 7.2) contém o cDNA da CYPOR humana sob acção do promotor *ptac*, contém o operão *mucAB* e é um plasmídeo que confere resistência à canamicina. Relativamente ao plasmídeo pLCM_hb5_POR (Anexos: Figura 7.3), desenvolvido por Kranendonk, contém cDNA da CYPOR e *b₅* humano clonado independentemente, cada um sob regulação de um promotor *tac*.

A estirpe BTC também apresenta uma série de características que lhe conferem as propriedades para a sua utilização num teste de mutagenicidade. Características essas que são: a auxotrofia para a L-arginina (*argE3*), que lhe permite por reversão desta mutação verificar a detecção de mutagenicidade; a presença de parede lipopolissacárida incompleta (LPS^d), que lhe confere maior permeabilidade aos agentes em estudo; a deleção parcial de *uvrA*, o que incapacita a bactéria de efectuar a reparação do DNA por excisão; as variações dos genes *ada* e *ogt*, incapacitando a bactéria de efectuar a reparação do DNA face à exposição a agentes alquilantes, aumentando a capacidade de detecção dos mesmos; a presença do operão *mucAB*, que codifica para um sistema não fidedigno de reparação do DNA que leva a um aumento da sensibilidade destas bactérias para a detecção de mutagénios químicos, ao aumentar a taxa de fixação de mutações (Preston e Hoffman, 2008).

Devido às suas características acima referidas, em particular a estequiometria correcta de CYPOR/CYP ou *b₅*/CYP, bem como a não existência de CYPs endógenos, um factor de interferências, a estirpe BTC foi durante os últimos anos aplicada em estudos fundamentais sobre o funcionamento do complexo enzimático do CYP humano (Duarte *et al.*, 2007; Marohnic *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2010), por exemplo no estudo da doença genética rara designada síndrome de Antley-Bixler (ABS).

1.4. Síndrome de Antley-Bixler

A síndrome de Antley-Bixler (ABS, OMIM #201750) é um distúrbio de malformações congénitas raro caracterizado por alterações crânio-faciais, musculo-esqueléticas e urogenitais, sendo o primeiro caso descrito no ano de 1975 (Antley e Bixler, 1975). A maioria dos casos descritos até à data apresentava malformações como braquicefalia, hipoplasia facial (Figura 1.9), craniosinestesia, sinestesia rádio-humeral (Figura 1.8), curvaturas femorais e fracturas espontâneas ósseas. São ainda descritas malformações cardíacas, perda de audição, aracnodactilia, e alguns pacientes apresentam disfunção na esteroidogénese e ambiguidade genital. A esperança média de vida é bastante curta, embora recentemente tenham sido reportados sobreviventes de longo prazo com uma esperança de vida normal (Adachi *et al.*, 2004; Fukami *et al.*, 2005).



Figura 1.9: Fotografia de paciente com hipoplasia facial (Ko *et al.*, 2009).



Figura 1.8: Radiografia demonstrativa de sinestesia rádio-humeral em ambos os braços (Ko *et al.*, 2009).

A ABS é uma síndrome geneticamente heterogénea, havendo sido indicado dois tipos de doentes, nomeadamente pacientes ABS tipo 1 e pacientes ABS tipo 2 (Huang *et al.*, 2005). A ABS tipo 1 é caracterizada por graves anormalidades esqueléticas e esteroidogénese normal. Neste tipo de doentes ABS foram encontradas mutações no gene *Fibroblast Growth Factor Receptor 2* (FGFR2), que se encontra no cromossoma 10 (10q26). Contudo, a ABS tipo 2 é uma doença autossómica recessiva ligada a mutações no gene *POR* (7q11.2), que codifica para a CYPOR, com a presença de esteroidogénese anormal, ambiguidade genital com anormalidades esqueléticas menos acentuadas (Huang *et al.*, 2005).

Estudos com ratinhos, na presença da deleção total do gene *POR*, mostram que estas são embriónicamente letais (Shen *et al.*, 2002), no entanto ratinhos com a deleção do gene *POR* hepático têm um desenvolvimento e uma capacidade reprodutiva normais, apesar da capacidade de biotransformação alterada (Henderson *et al.*, 2003). Os pacientes ABS tipo 2 possuem variações na CYPOR menos graves do que a deleção total do gene *POR* havendo um grau residual da actividade da reductase (Miller, 2004).

A diminuição da actividade dos CYPs e de outras enzimas dependentes da CYPOR, que se encontram envolvidas no metabolismo do colesterol e do ácido retinóico, nomeadamente do

CYP51A1 e da família do CYP26, respectivamente, pensa-se estarem associadas ao mecanismo pelo qual mutações no gene da CYPOR podem levar ao aparecimento das malformações no esqueleto durante o desenvolvimento (Otto *et al.*, 2003; Fukami *et al.*, 2005). Também as perturbações no metabolismo de hormonas encontradas nos doentes com ABS tipo 2, ligadas à diminuição da actividade dos CYPs envolvidos na biossíntese destas hormonas, tal como dos seus precursores, em particular dos CYP17A1, CYP19A1, CYP21A2 e CYP51A1 estão a ser consideradas como causais desta doença (Fukami *et al.*, 2005).

Já foram identificadas diferentes mutações no gene *POR* em indivíduos com ABS, bem como em indivíduos com perturbações no metabolismo das hormonas esteróides (Figura 10). A variedade de mutações relatadas inclui, mutações *missense*, *frameshift*, *splice site* e mutações em vários locais do gene mas sem efeito aparente (Huang *et al.*, 2005).

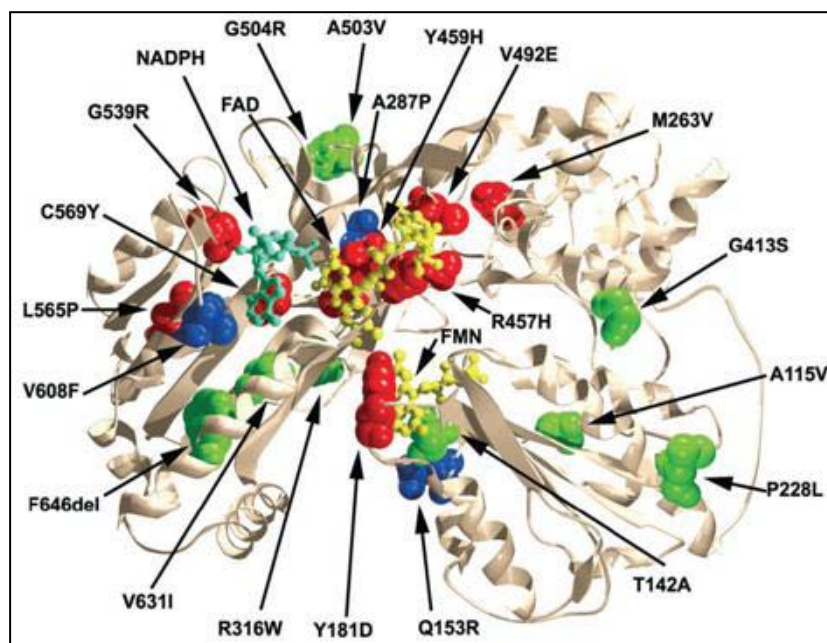


Figura 1.10: Modelo da CYPOR humana ilustrativo da localização das alterações causadas pelas mutações. [O modelo é baseado na estrutura cristalina da CYPOR do rato por raio-X. A cadeia principal do carbono-α é mostrada como uma fita estreita, permitindo a visualização dos resíduos enterrados. Os resíduos *missense* são representados pelas esferas vermelhas. O modelo na configuração de estilo *ball-and-stick* é usado para representar o FMN (amarelo), FAD (amarelo) e o NADPH (ciano)] (Huang *et al.*, 2005).

Certos tipos de ensaios *in vitro*, realizados com variantes alélicas do gene da CYPOR, têm permitido estudar o efeito de cada uma dessas variantes sobre a actividade de diversos CYPs envolvidos no metabolismo das hormonas esteróides, nomeadamente dos CYP17A1 (Pandey *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Dhir *et al.*, 2007), CYP19A1 (Pandey *et al.*, 2007) e CYP21A2 (Dhir *et al.*, 2007), aparentemente demonstrando a existência de uma correlação entre a severidade do quadro clínico e o grau de incapacidade das diferentes variantes alélicas em suportar a actividade catalítica dos CYPs (Pandey *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005). Alguns destes estudos demonstraram ainda que, aparentemente, algumas variantes da CYPOR afectam seriamente a actividade de

determinados CYPs, afectando de forma mais ligeira a actividade de outros (Dhir *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2007).

Num estudo realizado em 2008 por Kranendonk e seus colaboradores, foi indagado o efeito de duas mutações pontuais no gene *POR*, sobre a actividade catalítica do CYP1A2, mutações essas que levam a duas alterações na proteína da CYPOR, nomeadamente Y459H e V492E. Com este estudo foi demonstrado o efeito deletério que as alterações Y459H e V492E, comprometedoras da ligação do FAD à CYPOR, exercem sobre a capacidade da CYPOR para suportar a actividade catalítica de CYP1A2 (Kranendonk *et al.*, 2008). Um outro estudo, do mesmo grupo, mostrou que a substituição Y181D compromete severamente a ligação do FMN à CYPOR, incapacitando-a de suportar a actividade catalítica de CYP1A2 (Marohnic *et al.*, 2009). Nestes estudos da actividade catalítica dos CYPs com as variantes de CYPOR Y459H, Y492E e Y181D foi utilizado o sistema biplasmídico referido na secção 1.3.1. A aplicação deste sistema, que reflecte a estequiometria CYPOR/CYP *in vitro* (CYPOR << CYP), foi aplicada com o intuito de ser mais apropriado neste tipo de estudos, relativamente aos sistemas *in vitro* utilizados por outros grupos (Agrawal *et al.*, 2008; Fluck *et al.*, 2010), em que as variantes da CYPOR são estudadas em excesso molar de CYPOR (CYPOR ≥ CYP). Sistemas com este tipo de estequiometria são propícios de causar a subestimação de perturbações funcionais das variantes CYPOR, devido a uma compensação no funcionamento derivado a este excesso molar.

O estudo sobre o impacto das mutações no gene *POR* no metabolismo de xenobióticos mediado por CYPs é relevante, visto que, uma redução neste metabolismo, resultante de uma redução da actividade dos CYPs, pode traduzir-se numa maior sensibilidade a determinados contaminantes ambientais, de origem natural ou antropogénica. A redução mencionada pode também manifestar-se numa maior sensibilidade a determinados fármacos, podendo verificar-se a ocorrência de efeitos secundários severos quando os fármacos são administrados em dosagens normais, para doentes com ABS.

Os estudos moleculares das mutações dos genes que codificam para os factores do complexo enzimático CYP, não só permitem obter dados clinicamente relevantes, como também permitem adquirir um conhecimento aprofundado sobre o funcionamento molecular deste complexo enzimático.

1.4.1. A variante Y459H da CYPOR

A mutação no gene *POR*, que leva à variante Y459H da CYPOR descrita primeiramente pelo grupo de Huang e colaboradores, é uma mutação *missense* identificada em doentes com ABS (Huang *et al.*, 2005). Nesta mutação ocorre uma substituição (t > c) causando a codificação do aminoácido histidina em vez de uma tirosina, na posição 459 da proteína CYPOR humana.

Na estrutura cristalina do rato a tirosina na posição 456, correspondente à da CYPOR humana (Tir-459), contacta com o anel iso-aloxano do FAD e faz ligações de hidrogénio com o

grupo hidroxilo. Esta substituição pela histidina compromete a ligação do FAD à CYPOR, como foi demonstrado pelo grupo da Doutora Bettie Sue Masters (Marohnic *et al.*, 2006).

Este efeito aparentemente compromete as diversas actividades catalíticas dos CYPs envolvidos no metabolismo endógeno, nomeadamente a hidroxilação do carbono 17 da progesterona com a produção de 17 α -hidroxiprogesterona e a quebra de di-hidroepiandrosterona, catalisadas pelo CYP17A1 humano (Huang *et al.*, 2005). Também foi demonstrado o efeito deletério de Y459H sobre a funcionalidade da CYPOR para a actividade catalítica do CYP1A2, sendo este um dos principais CYPs envolvidos no metabolismo de xenobióticos (Kranendonk *et al.*, 2008). Este efeito constitui um possível indicador de que a actividade de outros CYPs, envolvidos no metabolismo de biotransformação de xenobióticos, possa estar igualmente comprometida, como foi recentemente indicado para o CYP3A4 por Fluck (Fluck *et al.*, 2010) e pelo grupo de Kranendonk e colaboradores (dados ainda não publicados).

1.4.2. A variante Y181D da CYPOR

Foi identificado pelo grupo de Arlt e seus colaboradores (2004) a mutação *missense* que leva à síntese da CYPOR-Y181D, também identificada em doentes com ABS (Arlt *et al.*, 2004). A mutação é caracterizada pela substituição de uma tirosina por um aspartato na posição 181 da proteína CYPOR, devido à substituição (t > g) de uma timina por uma guanina.

O resíduo Y181 parece participar na interacção com a flavina (FMN) na zona da bolsa de ligação do FMN (Marohnic *et al.*, 2009). A substituição da tirosina 181 pelo aspartato baixa a afinidade e altera o posicionamento do FMN levando à diminuição da capacidade na transferência de electrões da CYPOR para o CYP, sendo deste modo uma possível causa para o decréscimo na actividade destas enzimas (Fluck *et al.*, 2007; Marohnic *et al.*, 2009).

Esta variante da CYPOR, no metabolismo endógeno, resulta na diminuição acentuada de actividades do CYP17A1 e CYP21A2, havendo perda total da actividade deste último (Dhir *et al.*, 2007). Num estudo realizado por este grupo de trabalho, no qual foi utilizado o sistema celular biplasmídico (ver secção 1.3.1), verificou-se que no metabolismo de xenobióticos a variante Y181D da CYPOR compromete severamente a actividade catalítica do CYP1A2 na metabolização de carcinógenos, como NNK, IQ e 2AA (Marohnic *et al.*, 2009). Os dados referentes a esta variante indicam a possibilidade da actividade catalítica de outros CYPs poder estar comprometida, tal como foi referenciado nos estudos que demonstram o mesmo facto com a variante Y459H e com o CYP3A4.

1.5. Citocromo b_5

O citocromo b_5 é uma hemoproteína que se encontra presente numa grande diversidade de organismos, existindo uma elevada homologia na sequência de aminoácidos entre várias espécies animais e vegetais (Mulrooney e Waskell, 2000).

Nos mamíferos, esta hemoproteína apresenta duas formas, o b_5 microsomal que se encontra ligado à membrana do retículo endoplasmático e o b_5 mitocondrial que se encontra ligado à membrana externa das mitocondrias (Lederer *et al.*, 1983). O b_5 mitocondrial está envolvido na redução do semi-di-hidroascorbato e na estimulação da síntese de androgénios (Altuve *et al.*, 2004). Contudo, o b_5 microsomal tem uma elevada importância devido às diversas funções já conhecidas. Esta proteína aceita electrões quer do NADH quer do NADPH, que lhe são transmitidos, respectivamente, por intermédio das enzimas NADH-reductase do citocromo b_5 e CYPOR, transferindo-os posteriormente a outras enzimas participantes em reacções como a dessaturação de ácidos gordos, biossíntese de plasmogénios e reacções de metabolização de xenobióticos pelos CYPs (Holmans *et al.*, 1994; Schenkman e Jansson, 2003).

A proteína (Figura 1.11) tem 134 resíduos, um peso molecular de 17 kDa e nela podem distinguir-se dois domínios. Um dos domínios consiste num núcleo hidrofílico de 98 aminoácidos ligados ao grupo heme e o outro numa zona hidrofóbica C-terminal de 26 aminoácidos, que serve como âncora da proteína à membrana do retículo endoplasmático (Mulrooney e Waskell, 2000).

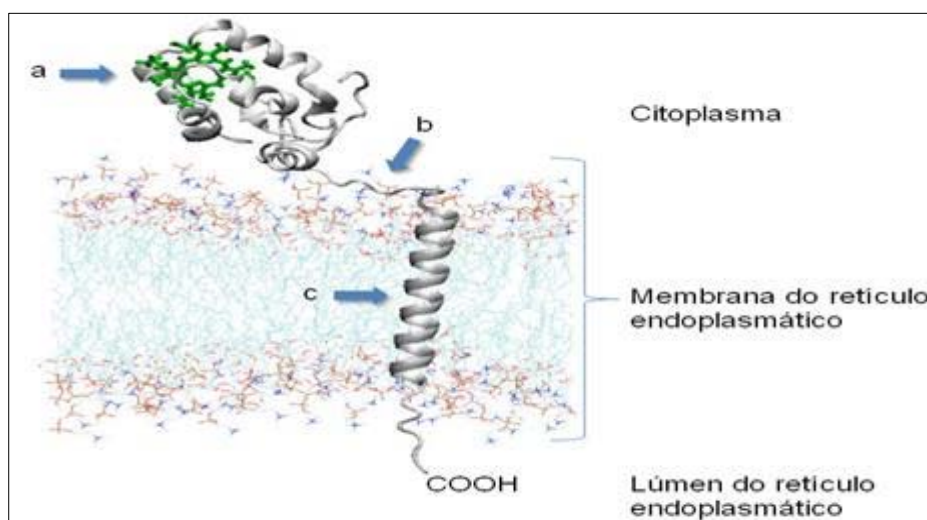


Figura 1.11: Disposição do b_5 na membrana do retículo endoplasmático. [(a) Porção N-terminal do b_5 contendo o grupo heme; (b) Segmento de união; (c) Segmento C-terminal da proteína contendo a sequência de aminoácidos, entre a Ser-107 e a Tir-127, que atravessa a bicamada lipídica e fixa a proteína à membrana do retículo endoplasmático, ficando a extremidade carboxilica localizada no lúmen] (Durr *et al.*, 2007).

Aparentemente o b_5 tem capacidade de estimular, inibir ou de não exercer qualquer tipo de efeito sobre a actividade catalítica dos CYPs, estando esta capacidade dependente da forma do CYP, das condições experimentais utilizadas e do substrato (Mokashi *et al.*, 2003; Yamaori *et al.*, 2003). Deste modo, a presença do b_5 pode estimular a metabolização de um dado substrato, por um

determinado CYP, pode não exercer qualquer tipo de efeito, ou ainda inibir a metabolização de um outro substrato diferente, pelo mesmo CYP (Yamaori *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* mostraram que as actividades catalíticas do CYP3A4, CYP2C9, CYP2A6 e CYP2E1 podem ser estimuladas pela presença do b_5 , ou, com excepção do CYP2E1 pela presença apenas da sua apo-proteína apontando, neste último caso, para um efeito alostérico (Yamazaki *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2007). Por oposição a estes estudos, a presença do b_5 não demonstrou nenhum efeito sobre a actividade do CYP1A1, CYP2D6, CYP1B1 (Yamazaki *et al.*, 2002) e ainda do CYP1A2 (Duarte *et al.*, 2007). O b_5 tem mostrado exercer um papel importante nos CYPs envolvidos na metabolização endógena como é o caso do CYP17A1. O CYP em causa, envolvido na biossíntese de esteróides, possui duas actividades distintas, uma actividade de 17 α -hidroxilase e outra de 17,20-liase, em que apenas esta última é fortemente estimulada pela presença do b_5 (Akhtar *et al.*, 2005).

O segmento C-terminal do b_5 tem-se mostrado essencial para a interacção com os CYPs, uma vez que na sua ausência o b_5 não exerce qualquer efeito sobre as actividades catalíticas dos CYPs (LeeRobichaud *et al.*, 1997). É de igual modo importante, para a interacção do b_5 com os CYPs, que o b_5 mantenha uma distância de 15-20 Å da região de interface da membrana, pois se a mesma for muito pequena existe o impedimento da formação de complexos (Durr *et al.*, 2007) (Figura 1.12).

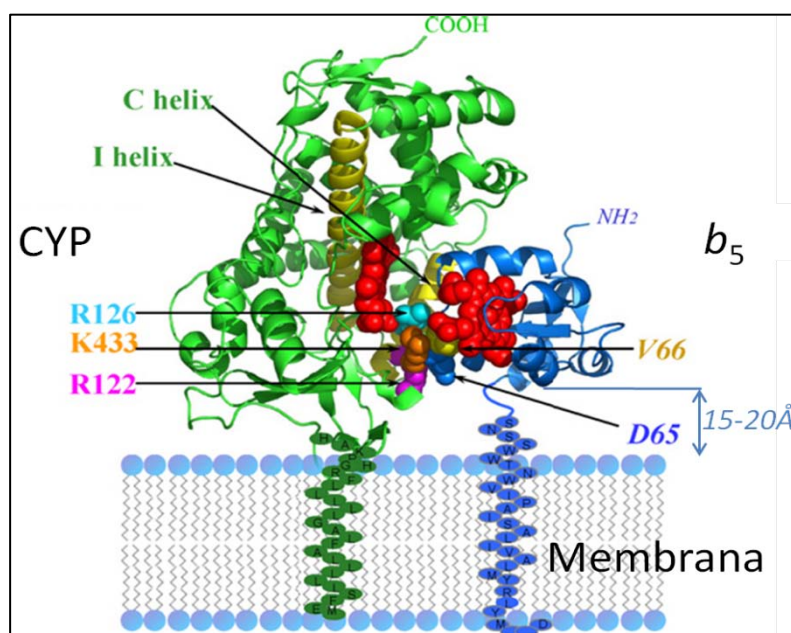


Figura 1.12: Modelo do complexo CYP- b_5 .

[Está representado o CYP2B4 (verde) e o b_5 (azul), na membrana; Grupos heme (vermelho), hélice C (amarelo) que contém resíduos V66 e D65 do b_5 que interagem com os resíduos R126, K433, R122 do CYP2B4 (código PDB - 1SUO)] (Im e Waskell, 2010).

Estes resultados sugerem a existência de interacções entre os segmentos membranares destas duas proteínas (CYP e b_5), pensando-se que possam contribuir para aumentar a afinidade e

facilitar a associação entre ambas, garantindo a correcta orientação espacial dos seus domínios catalíticos (LeeRobichaud *et al.*, 1997; Mulrooney *et al.*, 2004).

Devido aos potenciais redox do b_5 e da forma férrica do CYP serem aproximadamente +20 mV e -230 mV, respectivamente (Clarke *et al.*, 2004), é improvável que no primeiro passo de transferência de electrões no ciclo catalítico do CYP seja o b_5 o desse electrão, devendo portanto esta transferência, ocorrer via CYPOR (Paine *et al.*, 2005). Contudo, o potencial redox do CYP aumenta para aproximadamente +50 mV com a formação do complexo oxiferroso (Fe^{2+}O_2), tornando deste modo possível a transferência do segundo electrão, quer via b_5 quer via CYPOR (Figura 1.13) (Clarke *et al.*, 2004).

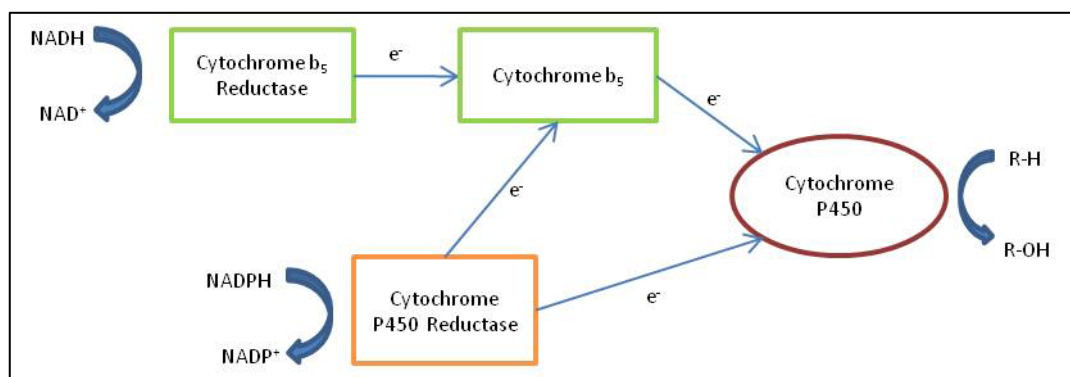


Figura 1.13: Representação esquemática das vias das transferências electrónicas entre o CYP, b_5 e respectivas reductases (Durr *et al.*, 2007).

A possível estimulação dos CYPs pelo b_5 tem sido atribuída a quatro diferentes mecanismos (Schenkman e Jansson, 2003):

1) O b_5 efectua uma rápida transferência do segundo electrão para o CYP.

Devido ao potencial redox do CYP aumentar de ≈ -230 mV para $\approx +50$ mV, na transição para o estado oxiferroso, torna-se mais favorável a transferência de um electrão por parte do b_5 no estado ferroso, que tem um potencial redox médio de $\approx +5$ mV;

2) Aumento da eficiência das reacções por diminuição do desacoplamento no ciclo do CYP.

A diminuição do desacoplamento é consequência da transferência do segundo electrão, por parte do b_5 , ser mais rápida do que a taxa de libertação do superóxido (desacoplamento), bem como a diminuição da formação de espécies reactivas de oxigénio, permitindo assim que mais produto se forme, tornando a reacção mais eficiente;

3) Transferência de dois electrões durante uma única interacção com a CYPOR.

A formação de um complexo do b_5 com o CYP permite-lhes aceitar dois electrões, necessários para completar o ciclo catalítico destes citocromos, durante uma única interacção com a CYPOR;

4) Efeito alostérico que facilita o funcionamento do ciclo.

A indução de um efeito alostérico por parte do b_5 no CYP, que facilita a biotransformação dos substratos, sem que ocorram transferências electrónicas entre as duas proteínas.

Independentemente do progresso obtido nos últimos anos ainda falta uma maior pormenorização sobre o efeito do b_5 no funcionamento do complexo enzimático do CYP. Uma melhor compreensão desta proteína permite desvendar o conhecimento sobre o funcionamento do complexo bem como as suas aplicações em alguns tipos de doenças, na indústria farmacêutica, na toxicologia e ainda como base para a prática clínica.

1.6. Objectivo

Com o presente estudo, enquadrado no trabalho desenvolvido neste laboratório, pretendeu-se obter uma melhor compreensão sobre o funcionamento do complexo enzimático do CYP, em particular sobre o mecanismo de actuação do b_5 .

Como foi anteriormente referido, o b_5 é indicado como interveniente na transferência de electrões, provenientes do NADPH, da CYPOR para o CYP. Na CYPOR a sequência de transferência de electrões processa-se do NADPH para o grupo FAD e deste para o FMN. Neste trabalho foi estudado o papel do b_5 no funcionamento do complexo enzimático do CYP, utilizando as variantes Y459H e Y181D da CYPOR, duas alterações que debilitam a ligação dos grupos prostéticos FAD e FMN, respectivamente.

Sabendo que o efeito do b_5 é dependente do tipo de CYP (como anteriormente referido) dois CYPs humanos foram seleccionados, nomeadamente CYP1A2 e CYP2A6, para que conjugados com as referidas variantes de CYPOR e com b_5 , pudessem ser construídas as estirpes alvo para o estudo. O CYP1A2 foi demonstrado ser relativamente insensível à presença de b_5 , contrariamente ao CYP2A6 que tem a sua função altamente estimulada por esta proteína.

A estratégia delineada visou o desvendar, mais pormenorizado, sobre o efeito do b_5 no complexo enzimático do CYP, bem como o estudo do papel do b_5 em presença das duas variantes da CYPOR que estão relacionadas com ABS, com possíveis implicações clínicas para doentes portadores destas duas mutações no gene *POR*.

O trabalho desenvolvido iniciou-se com a construção de estirpes que co-expressam as diferentes variantes CYPOR (Y459H e Y181D) em simultâneo com cada um dos CYPs (1A2 e

2A6) em conjunto com b_5 e sua caracterização no que toca às razões relativas de CYPOR, CYP e b_5 .

Para esta construção recorreu-se a um sistema bacteriano biplasmídico, que possibilita obter razões molares CYPOR/CYP e b_5 /CYP mais próximas das razões molares encontradas nos microsomas do fígado humano. Posteriormente procedeu-se à determinação e avaliação da actividade dos dois CYPs, utilizando dois tipos de abordagem, nomeadamente a determinação da capacidade dos CYPs de bioactivar mutagénios, bem como a determinação de dois parâmetros cinéticos utilizando substratos padrão.

O presente trabalho enquadra-se no âmbito do projecto PTDC/SAU-GMG/71911/2006 designado por “O estudo de mutações relacionadas com a síndrome de Antley-Bixler na oxidoreductase do citocromo P450: polimorfismos da CYPOR e o complexo enzimático do citocromo P450”.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Nas tabelas 2-1 a 2-5 são apresentados reagentes, meios nutritivos, soluções, marcadores genéticos de plasmídeos e estirpes de *E.coli*, bem como as sequências de primers usados no decurso de todo o trabalho experimental.

Tabela 2.1: Reagentes e respectivos fabricantes.

<i>Fabricantes</i>	<i>Reagentes</i>
Sigma Chemical Co	Ácido δ -aminolevulínico (δ -Ala), ampicilina (Amp), L-arginina, benzonase, brometo de etídeo, citocromo <i>c</i> de coração de cavalo, cloranfenicol (Cm), cumarina, fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma oxidada (NADP ⁺), fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADPH), glucose-6-fosfato, glucose-6-fosfato desidrogenase, 7-hidroxycumarina, isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG), metoxiresorufina, 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO), N-Nitrosodietilamina (NNdEA), peróxido de hidrogénio, resorufina, sulfato de canamicina (Kan), tiamina, 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), fluoreto de metilmetanosulfonil (PMSF).
Toronto Research Chemical Inc.	2-Amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]quinolina (IQ).
Bio Line	Marcador de pesos moleculares <i>HyperLadder I</i> .
Bio-Rad	Reagente Bio-Rad Protein Assay, Mini-PROTEAN [®] TGX [™] Precast Gels.
Becton Dickinson and Company	Agar, agar MacConkey, extracto de levedura, peptona, triptona.
QIAGEN	Kit Plasmid Midi.
Roche	Pastilhas “complete EDTA free protease inhibitor cocktail”.
Fermentas	Kit Plasmid Mini-prep, Marker Page Ruler, FastAP [™] Thermosensitive Alkaline Phosphatase, <i>Eco81I</i> , <i>Eco0109I</i> , <i>XbaI</i> .
Fluka	Lisozima.
Invitrogen	Kit Quick gel extraction, Kit Western Dot 625 Western blot.
Stratagene	Células competentes <i>E.coli</i> XL10-Gold.
Merck	Todo os restantes reagentes.

Tabela 2.2: Meios nutritivos e soluções, composição por 500 ml.

Meio/Soluções	Composição (500 ml)
Luria – Bertani (LB)	5 g triptona; 2,5 g extracto de levedura; 5 g NaCl. ⁽¹⁾⁽²⁾
M9	395 ml H ₂ O nanopura ⁽²⁾ , 5 ml glucose 40%; 100 ml de sais M9 (5x concentrado) estéreis.
NZY	5 g bacto triptona; 2,5 g NaCl; 2,5 g bacto extracto de levedura; ajustar pH a 7,5 ⁽¹⁾ . Suplementou-se com 6,25 ml de cloreto de magnésio 1 M; 6,25ml de sulfato de magnésio 1 M; 10 ml de solução de Glucose a 20%.
Placas Vogel-Bonner (VB)	7,5 g agar; 465 ml H ₂ O nanopura. ⁽³⁾ Suplementar, após arrefecimento do meio, com 10 ml Sais VB (50x); 25 ml glucose 40%. Distribuir por placas de petri (±30 ml/placa).
Sais M9 (5X)	21,25 g Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O; 7,5 g KH ₂ PO ₄ ; 1,25 g NaCl; 2,25 g NH ₄ Cl
Sais VB (50X)	5 g MgSO ₄ .7H ₂ O; 50 g C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O; 250 g K ₂ HPO ₄ ; 87,5 g NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .H ₂ O) ⁽¹⁾ .
Solução de citocromo c 2 mM	24 mg de citocromo c preparada em 1 ml de tampão citocromo c reductase.
Tampão Ames 0,2 M	13,8 g NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O; 14,2 g Na ₂ HPO ₄ ; ajustar pH a 7,4.
Tampão citocromo c reductase	3,03 g de Tris-HCl; 5,59 g de KCl; 1,016 g de MgCl ₂ ; 65,01 mg de NaN ₃ ; 0,04% (v/v) Trypton X-100; ajustar pH a 7,5.
Tampão TB	11,55 g KH ₂ PO ₄ ; 62,70 g K ₂ HPO ₄ . ⁽¹⁾
Tampão TGE	4,54 g de Tris-HCl (75 mM Tris); 4,65 g de EDTA (25 mM); 57,5 ml de glicerol 87% (v/v); ajustar pH a 7,5.
Tampão TN	3,03 g de Tris-HCl; 4,25 g de NaCl; ajustar pH a 7,5.
Tampão PBS	4 g de NaCl; 0,1 g de KCl; 0,72 g de Na ₂ HPO ₄ ; 0,12 g de KH ₂ PO ₄ ; ajustar pH a 7,4 ⁽¹⁾ .
Terrific broth (TB)/peptona	6 g triptona; 12 g extracto de levedura; 1 g de peptona; 4 ml de glicerol 50%; 446 ml H ₂ O nanopura. ⁽¹⁾ Quando da primeira utilização do frasco adicionar 50 ml de tampão TB.
Top's tiamina/ L-arginina	2,5 g de NaCl; 3 g de Agar ⁽³⁾ . Suplementou-se com 500 µl de L-arginina (10 mg/ml); 500 µl de Tiamina (10 mg/ml).

(1) Autoclavar 20 minutos a 120°C e conservar à temperatura ambiente.

(2) No caso de placas adicionar, antes de autoclavar, 7,5 g de agar e depois de autoclavado, distribuir por placas de petri (±25 ml/cada).

(3) Autoclavar 20 minutos a 120°C e distribuir pelos respectivos recipientes.

Tabela 2.3: Plasmídeos e sua caracterização ao nível de marcadores genéticos.

Plasmídeos	Marcadores genéticos	Origem/Referência
pCW ⁰	pCWori ⁺ , vector de expressão em <i>E.coli</i> , Amp ^r , ptac.ptac/lacI ^q , sem cDNA.	Fisher <i>et al.</i> , 1992 ^a
pCW ^{h1A2}	pCWori ⁺ , contendo o cDNA modificado do CYP1A2 humano.	Fisher <i>et al.</i> , 1992 ^a
pCW ^{h2A6}	pCWori ⁺ , contendo o cDNA modificado do CYP2A6 humano.	C.W. Fisher
pLCM	<i>mucAB</i> ⁺ , Kan ^r , (derivado do pACYC177).	Kranendonk <i>et al.</i> , 1999 ^a
pLCM_POR ^{wt}	pLCM contendo cDNA de CYPOR humano, sob <i>ptac</i> .	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
pLCM_POR ^{Y459H}	pLCM contendo cDNA de CYPOR humano, com a mutação Y459H, sob <i>ptac</i> .	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
pLCM_POR ^{Y181D}	pLCM contendo cDNA de CYPOR humano, com a mutação Y181D, sob <i>ptac</i> .	Marohnic, C. <i>et al.</i> , 2009
pLCM_hb5	pLCM contendo cDNA de <i>b5</i> humano sob <i>ptac</i> .	Duarte <i>et al.</i> , 2007

Tabela 2.3: Plasmídeos e sua caracterização ao nível de marcadores genéticos (continuação).

Plasmídeos	Marcadores genéticos	Origem/Referência
pLCM_hb5_POR ^{wt}	pLCM contendo cDNA de b ₅ humano e CYPOR humano clonado independentemente sob <i>ptac</i> .	Deste laboratório
pLCM_hb5_POR ^{Y459H}	pLCM contendo cDNA de b ₅ humano e CYPOR humano, com a mutação Y459H, sob <i>ptac</i> .	Este estudo
pLCM_hb5_POR ^{Y181D}	pLCM contendo cDNA de b ₅ humano e CYPOR humano, com a mutação Y181D, sob <i>ptac</i> .	Deste laboratório

Tabela 2.4: Estirpes de *E.coli* e correspondente genótipo.

Estirpes	Genótipo	Origem/Referência
XL10-Gold	endA1, glnV44, recA1, thi-1, gyrA96, relA1, lac Hte, Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, tet ^R F'[proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10	Stratagene
PD301	<i>thr</i> -1, <i>ara</i> -14, <i>leu</i> B6, Δ(<i>gpt</i> -proA)62, <i>thi</i> -1, <i>lac</i> Y1, <i>gal</i> K2, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>sup</i> E44, <i>arg</i> E3, <i>his</i> G4, <i>rac</i> ⁻ , λ ⁻ , <i>tsx</i> -33, <i>rps</i> L31, <i>mgl</i> -51, <i>rfb</i> D1, <i>kdg</i> K51, <i>qsr</i> ⁻ , <i>uvr</i> A6, <i>gal</i> E, <i>ada</i> 10[tet ^s], Δ <i>ogt</i> ::cm ^r , LPS ^d	Duarte <i>et al.</i> , 2005
BTC ⁰ _hb5_POR ^{wt}	PD301/pLCM_hb5_POR ^{wt}	Deste laboratório
BTC1A2_POR ^{Null}	PD301/pCWh1A2/pLCM	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
BTC1A2_POR ^{wt}	PD301/pCWh1A2/pLCM_POR ^{wt}	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
BTC1A2_POR ^{Y459H}	PD301/pCWh1A2/pLCM_POR ^{Y459H}	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
BTC1A2_POR ^{Y181D}	PD301/pCWh1A2/pLCM_POR ^{Y181D}	Marohnic, C. <i>et al.</i> , 2009
BTC1A2_hb5_POR ^{Null}	PD301/pCWh1A2/pLCM_hb5	Este estudo
BTC1A2_hb5_POR ^{wt}	PD301/pCWh1A2/pLCM_hb5_POR ^{wt}	Deste laboratório
BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	PD301/pCWh1A2/pLCM_hb5_POR ^{Y459H}	Este estudo
BTC1A2_hb5_POR ^{Y181D}	PD301/pCWh1A2/pLCM_hb5_POR ^{Y181D}	Este estudo
BTC2A6_POR ^{Null}	PD301/pCWh2A6/pLCM	Este estudo
BTC2A6_POR ^{wt}	PD301/pCWh2A6/pLCM_POR ^{wt}	Kranendonk <i>et al.</i> , 2008
BTC2A6_POR ^{Y459H}	PD301/pCWh2A6/pLCM_POR ^{Y459H}	Deste laboratório
BTC2A6_POR ^{Y181D}	PD301/pCWh2A6/pLCM_POR ^{Y181D}	Deste laboratório
BTC2A6_hb5_POR ^{Null}	PD301/pCWh2A6/pLCM_hb5	Este estudo
BTC2A6_hb5_POR ^{wt}	PD301/pCWh2A6/pLCM_hb5_POR ^{wt}	Este estudo
Estirpes	Genótipo	Origem/Referência
BTC2A6_hb5_POR ^{Y459H}	PD301/pCWh2A6/pLCM_hb5_POR ^{Y459H}	Este estudo
BTC2A6_hb5_POR ^{Y181D}	PD301/pCWh2A6/pLCM_hb5_POR ^{Y181D}	Este estudo

Tabela 2.5: Sequências dos primers.

Nome do primer	Sequência do primer (5'-3')
F1	CTGCCGCCAGGCAAATTCTG
F2	CGGCGGGTTGGTGATGTCCA
F3	TGAAGAGGAACCAGTAGGTT
R1	AACCAGCTGGGCAAATCCT
R2	AATTCTAATGGGAGACTCCC
R4	ATGGCTATTGTTTCCTTTAAG

2.2. Condições de cultura das estirpes bacterianas

Para a cultura das estirpes bacterianas utilizaram-se diversos meios nutritivos cuja composição se encontra descrita na Tabela 2.2.

Após qualquer um dos tipos de crescimento de culturas bacterianas foi medido o crescimento celular, com a finalidade de confirmar se as células se encontravam em fase de crescimento estacionário inicial ($DO_{600} \approx [4 - 6]$). O crescimento foi determinado pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm num espectrofotómetro (HITACHI; U-2001). Para esta medição as amostras foram diluídas (1:30) na base do seu meio nutritivo, sendo esta base o branco das medições, em triplicado.

2.2.1. Crescimento de culturas sem expressão de proteínas heterólogas

O crescimento de culturas bacterianas sem expressão de proteínas heterólogas foi efectuado em tubos de vidro, 150x15 mm, com 5 ml de meio LB, suplementado com 15 µg/ml de canamicina (Kan), 10 µg/ml de cloranfenicol (Cm) e 50 µg/ml de ampicilina (Amp). As culturas foram iniciadas com 20 µl de bactérias provenientes de stocks bacterianos, armazenadas em glicerol (15% (v/v) a -80°C), e foram incubadas a 37°C, 16 horas a 210 rpm numa incubadora orbital (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO; G25). As culturas destinadas ao isolamento de DNA plasmídico em larga-escala apenas diferiram no volume do meio LB, 50 ml, e no volume de inóculo, 250 µl, incubadas num erlenmeyer (250 ml).

2.2.2. Crescimento de culturas com indução da expressão das proteínas heterólogas

Para as culturas com indução da expressão das proteínas heterólogas, o crescimento ocorreu em 25 ml de meio TB, suplementado com 15 µg/ml de Kan, 10 µg/ml de Cm, 50 µg/ml de Amp, 1 µg/ml tiamina, 4 µl/ml de *trace elements* (Bauer e Shiloach, 1974), 0,2 mM de IPTG e 0,1 mM de δ -Ala incubadas em erlenmeyers (250 ml) a 28°C, 15,5 horas a 175 rpm numa incubadora orbital (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO; G25). Estas condições foram optimizadas de forma a maximizar os níveis de expressão das proteínas nas estirpes BTC, mantendo a viabilidade celular para posterior aplicação nos ensaios de detecção de bioactivação de xenobióticos, assim sendo ao meio de cultura das estirpes com pCWh1A2 não foi adicionado o precursor δ -Ala.

2.3. Construção do plasmídeo pLCM_hb5_POR^{Y459H}

Para a co-expressão da variante Y459H da proteína CYPOR, combinada com a proteína *b₅*, foi construído um vector de co-expressão, clonado da seguinte maneira.

2.3.1. Digestão enzimática de pLCM_POR^{Y459H} e pLCM_hb5_POR^{wt} e desfosforilação do DNA plasmídico

Efectuou-se a digestão enzimática dos plasmídeos de modo a obter o fragmento do gene *POR* contendo a substituição Y459H, proveniente do plasmídeo pLCM_POR^{Y459H} (Anexos: Figura 7.2). O fragmento POR^{Y459H} do gene *POR* está compreendido entre os locais de restrição para as enzimas *Eco81I* e *EcoO109I*. O plasmídeo recombinante pLCM_hb5_POR^{wt} (Anexos: Figura 7.3), que contem os mesmos locais de restrição, também foi digerido obtendo-se o vector recipiente no qual foi inserido o fragmento com a variante Y459H por substituição do fragmento POR^{wt}. As duas digestões foram incubadas a 37°C durante 5 horas.

A desfosforilação do vector recipiente foi realizada com a utilização de uma fosfatase alcalina (FastAP) durando a incubação de 30 minutos à temperatura ambiente.

2.3.2. Isolamento dos fragmentos de DNA plasmídico

Após electroforese em gel de agarose e com recurso a um marcador de pesos moleculares (Marcador *HyperLadder I*) foram localizados os fragmentos de DNA de interesse, sendo extraídos e purificados usando o kit PureLink Quick™ Gel Extraction (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Precipitou-se o DNA purificado adicionando-lhe 0,1% (v/v) de acetato de sódio (3 M), 2 vezes o volume de etanol absoluto e 0,1 % (v/v) de *linear polyacrylamide* (LPA), decorrendo a precipitação a -20°C, durante aproximadamente 16 horas. De seguida, a amostra foi centrifugada a 21000 rpm, a 4°C, durante 30 minutos, o precipitado lavado com etanol 70%, e novamente centrifugada, a 21000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o DNA seco num banho a 42°C (aproximadamente 10 minutos).

2.3.3. Ligação do vector recipiente e fragmento POR^{Y459H} e subsequente transformação para *E.coli* XL10-Gold

Após a precipitação do DNA plasmídico, ressuspendeu-se em tampão de ligação fornecido pelo Rapid DNA Ligation Kit™ (Roche), seguindo-se as instruções do fabricante para a ligação do fragmento pretendido com o vector recipiente.

Transformaram-se células ultracompetentes *E.coli* XL10-Gold conforme as instruções do fabricante, plaqueando, em meio LB suplementado com Kan (35 µg/ml), as células transformadas e a mistura com o vector recipiente sem o fragmento POR^{Y459H} (controlo negativo). As placas foram incubadas a 37°C entre 16-24 horas.

2.3.4. Verificação da clonagem do fragmento POR^{Y459H}

Extraíu-se o DNA plasmídico de 6 colónias crescidas nas placas transformantes descritas anteriormente, realizou-se digestão enzimática utilizando *XbaI* devido ao facto de ter um único local de restrição, linearizando o DNA. Por comparação visual, com o tamanho do controlo positivo (pLCM_hb5_POR^{wt}), igualmente digerido, foi possível a identificação dos clones.

Os clones que demonstraram tamanho aparentemente correcto foram sequenciados (STABVIDA), primeiramente apenas para a porção do gene *POR* contendo a posição Y459, usando o primer R1 (Tabela 2.5, pág.27). Após análise das sequências foi seleccionado apenas o clone com a sequência pretendida, realizando-se a extracção do seu DNA plasmídico usando, segundo instruções do fabricante, o kit QIAFilterTM plasmid Midi (*Qiagen*). Subsequentemente, o plasmídeo foi mandado sequenciar exaustivamente, com a finalidade de verificar as sequências de cDNA do *POR* e *b₅* humano usando os primers R1, R2, R4, F1, F2 e F3 (Figura 3.1, pág.40).

2.4. Construção das estirpes

O método realizado para a construção das estirpes deste estudo foi a transformação por electroporação, descrito por Sambrook e colaboradores (1989), com pequenas modificações. Este método permeabiliza a membrana, por carga eléctrica, formando fendas temporárias que permitem a entrada dos dois plasmídeos que se pretendem combinar pCWh1A2 ou pCWh2A6 (Anexos: Figura 7.1) e pLCM_POR (Anexos: Figura 7.2) ou pLCM_hb5_POR (Anexos: Figura 7.3) (Tabela 2.4, pág.27). Algumas das características das estirpes deste estudo são menos estáveis (ex: manutenção do plasmídeo e *rfa*⁻) sendo necessária a verificação das mesmas.

2.4.1. Transformação por electroporação

Adicionou-se a 30 µl de células PD301, tratadas para se tornarem aptas à electroporação (Sambrook *et al.*, 1989), 1 µl de cada plasmídeo (concentração ± 100 ng/µl) que se pretende combinar (Tabela 2.4). Esta mistura foi colocada no electroporador Bio-Rad Gene Pulser[®] com as seguintes condições seleccionadas: 25 µF, 200 Ω e 1,35 KV que resultou num pulso eléctrico com $\tau \approx 4\text{-}5$ ms. As culturas foram recuperadas com meio NZY (Tabela 2.2) (incubadas durante 1h a 37°C e 230 rpm), plaqueados (50 e 200 µl de cultura transformante) em placas com meio LB suplementado com Amp (50µg/ml), Cm (10µg/ml) e Kan (15µg/ml) e finalmente incubados a 37°C, entre 15 a 16 horas.

2.4.2. Verificação das características fenotípicas das estirpes

Nos ensaios de verificação das características fenotípicas utilizaram-se suspensões bacterianas obtidas por ressuspensão de colónias isoladas nas placas de transformação em 200 µl

de tampão PBS. Para cada estirpe verificada seleccionaram-se 6 colónias provenientes das placas incubadas com cultura transformante.

- Resistência ao cloranfenicol, ampicilina e canamicina

Confirmou-se a resistência ao Cm, Amp e Kan da seguinte maneira. As estirpes utilizadas possuem os vectores plasmídicos, pLCM, que confere resistência à Kan, e pCW que confere resistente à Amp. A resistência ao Cm deve-se ao gene *ogt* ter sido inativado por um transposição que confere resistência ao Cm. Deste modo, as características Cm^r, Amp^r e Kan^r foram confirmadas através do plaqueamento das estirpes como descrito em 2.4.1.

- Auxotrófia para a L-arginina

Para a confirmação da auxotrofia para a L-arginina (L-Arg), cada suspensão bacteriana de colónias a confirmar foi plaqueada em meio M9, suplementado com tiamina (1 µg/ml). O controlo positivo utilizado apenas difere na composição do meio a plaquear, sendo este meio M9 sólido suplementado com tiamina (1 µg/ml) e L-Arg (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C, 48 horas numa estufa. A auxotrofia para a L-Arg foi confirmada através da existência de crescimento na placa cujo meio foi suplementado com L-Arg e, simultaneamente, com ausência de crescimento na placa cujo meio não foi suplementado com este aminoácido.

- Parede celular lipopolissacárida incompleta (LPS^d)

A presença de LPS^d nas estirpes foi confirmada através do uso de agar MacConkey, pelo facto de este meio possuir compostos, tais como, sais biliares e violeta de cristal, que apenas conseguem penetrar na célula da *E.coli* quando tem LPS^d, visto, neste caso, a parede celular ser mais permeável, a estes compostos. Assim sendo, colocou-se numa placa com agar MacConkey 5 µl das suspensões bacterianas incubando a 37°C, 24-48 horas numa estufa. A ausência de crescimento neste meio selectivo confirma a característica LPS^d.

2.4.3. Análise do conteúdo do DNA plasmídico

Primeiramente para extrair o DNA plasmídico utilizaram-se culturas sem expressão de proteínas heterólogas (secção 2.2.1) recorrendo ao kit Plasmid Mini-prep. A análise do DNA foi feita por electroforese em gel de agarose a 1%, utilizando o marcador *HyperLadder I*. O critério de selecção nesta análise é a presença das bandas correspondentes aos controlos, sendo eles os plasmídeos que fazem parte da constituição da estirpe.

2.4.4. Verificação da sensibilidade do alvo genético para detecção de mutagenicidade

Por monitorização da reversão da mutação *ArgE3*, mutação que causa auxotrofia para L-Arg das estirpes em estudo, foi possível verificar a sensibilidade deste alvo genético para detectar mutagenicidade. Para o efeito efectuaram-se testes de mutagenicidade, sem expressão de proteínas heterólogas, que consistem na mistura de uma quantidade fixa de células com quantidades variáveis do composto a ensaiar, adicionados a top's tiamina/arginina (Tabela 2.2) seguida do plaqueamento de meio VB (Tabela 2.2), sendo as placas incubadas durante 48 horas, a 37°C numa estufa.

Por fim, as placas foram fotografadas digitalmente e o número das colónias determinado através da utilização do software LabWorks (versão 4.6) (UVP, Inc.USA).

2.4.5. Avaliação da expressão de citocromo P450 e b_5 humano na estirpe bacteriana

A avaliação da expressão de CYP e b_5 teve como intuito seleccionar de entre os clones de interesse o que apresentava, proporcionalmente ao crescimento celular (DO_{600}), uma melhor expressão de CYP e b_5 metabolicamente activos.

2.4.5.1. Determinação da expressão dos citocromos P450

A observação do espectro diferencial de CYP reduzido complexado com monóxido de carbono (CO) versus CYP reduzido, conforme descrito por Omura e Sato em 1964 e com modificações feitas por Kranendonk (Kranendonk *et al.*, 1999b), permitiu a determinação da expressão dos CYPs. O crescimento da cultura para esta determinação foi realizada com indução da expressão proteica (secção 2.2.2), da qual foram retirados 5 ml para centrifugação a 4000 rpm durante 15 minutos, a 4°C, tendo sido os sedimentos ressuspensos num igual volume de tampão TN (Tabela 2.2).

Aos 5 ml de suspensão adicionou-se ditionito de sódio (concentração final de 4,6 mM), de forma a reduzir todo o CYP presente, e dividiu-se a amostra por 2 cuvets traçando-se uma linha de base entre os 400 e 500 nm, para isso foi utilizado um espectrofotómetro de feixes duplos (SHIMADZU; UV 2401RC). A cuvete amostra foi borbulhada com CO, durante 30 segundos (≈ 1 a 2 bolhas/segundo) tendo sido traçado o espectro diferencial entre os 400 e os 500 nm. Na presença de CYP foi possível detectar o pico característico do complexo formado entre o CO e o CYP reduzido, em redor dos 450 nm. Com o conhecimento do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do complexo CYP-CO ($91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para ΔAbs (450-490 nm)) e da variação da absorvência entre 450 e 490 nm foi possível determinar a concentração do CYP nas diferentes amostras do presente estudo.

2.4.5.2. Determinação da expressão do citocromo b_5 humano

A determinação da expressão do b_5 em *E.coli* foi baseada no método de espectrofotometria diferencial entre o b_5 reduzido e o b_5 oxidado descrito por Estabrook e Werrin Gloer (1978). Aplicando o procedimento descrito por Voice e colaboradores (1999), e adaptado pelo Dr. Bernardo Brito Palma (Duarte *et al.*, 2005a). Estas adaptações têm a finalidade de eliminar possíveis interferências, causadas pelas proteínas de *E.coli* que apresentam um espectro diferencial semelhante ao do b_5 . Subtrai-se ao espectro da estirpe com expressão do b_5 o espectro sem expressão deste mesmo citocromo, tendo as culturas das estirpes crescido exactamente nas mesmas condições experimentais. Para esta determinação manusearam-se culturas com indução da expressão de proteínas heterólogas (secção 2.2.2), retiraram-se 5 ml que foram centrifugados a 4000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, tendo os sedimentos sido ressuspensos em igual volume de tampão TN. A suspensão foi dividida em duas cuvets traçando-se uma linha base entre os 400 e 500 nm, utilizando para isso um espectrofotómetro de feixes duplos (SHIMADZU; UV 2401RC). Adicionou-se à cuvete de amostra ditionito de sódio (concentração final de 4,6 mM), de modo a reduzir todo o b_5 presente, e à cuvete de referência adicionou-se peróxido de hidrogénio (concentração final de 15 mM) de forma a oxidar todo o b_5 presente. De seguida traçou-se o espectro diferencial entre os 400 e 500 nm. Sabendo o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do b_5 para a diferença dos valores de absorvência 409 e 426 nm ($185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a variação da absorvência (409-426 nm) do espectro com expressão do b_5 corrigido com as absorvências correspondentes da estirpe do que não expressa b_5 , com a mesma densidade de cultura (DO_{600}), foi possível determinar a concentração do b_5 presente nas amostras em estudo.

2.5. Isolamento de fracção membrana bacteriana

Para o isolamento das fracções membranares das diversas estirpes de BTC1A2 seguiu-se o procedimento descrito por Palma e colaboradores em 2010 (Palma *et al.*, 2010), com pequenas modificações. Estas modificações consistem na utilização de benzonase (12,5 U/ml), bem como um inibidor de proteases (“complete EDTA free protease inhibitor cocktail”), conforme as instruções do fabricante. O isolamento das membranas das estirpes BTC2A6 teve como excepção, ao anteriormente descrito, os inibidores de proteases adicionados, que foram o PMSF (0,5 mM) e o EDTA (0,5 mM).

2.6. Determinação do conteúdo proteico da fracção membrana

Recorreu-se ao método de Bradford, para determinação do conteúdo proteico da fracção membrana, utilizando o reagente Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad). A amostra foi diluída em

tampão TGE a fim de apresentar um teor em proteína entre 0,2 e 0,8 mg/ml e a concentração proteica foi determinada por interpolação de uma recta de calibração feita com Albumina Sérica Bovina (BSA).

2.7. Determinação do conteúdo dos citocromos P450 na fracção membranar

Para a determinação da expressão dos CYPs nas fracções membranares isoladas a partir das diversas estirpes bacterianas, foi executado o método descrito na secção 2.4.5.1 com a amostra membranar diluída, em tampão TGE, 18 vezes, num volume final de 1,8 ml.

2.8. Determinação do conteúdo do citocromo b_5 na fracção membranar

A determinação do conteúdo do b_5 em fracções membranares foi realizada conforme descrito em 2.4.5.2, utilizando o tampão TGE e a amostra diluída 12,5 vezes, no mesmo tampão do ensaio, num volume final de 1,6 ml. Sabendo o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do b_5 para a diferença dos valores de absorvência 409 e 426 nm ($185 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a variação da absorvência (409-426 nm) do espectro com b_5 corrigido com as absorvências correspondentes da estirpe que não contém b_5 , atendendo à concentração proteica presente (estirpe sem b_5 versus estirpe com b_5), foi possível determinar a concentração do b_5 presente nas amostras membranares.

2.9. Determinação da capacidade de redução do citocromo c pela NADPH-oxidoreductase do citocromo P450

A CYPOR tem a capacidade de reduzir o substrato não fisiológico, o citocromo c (Kranendonk *et al.*, 2008). A velocidade desta reacção pode ser medida através do aumento da absorvência da mistura reaccional a 550 nm ao longo tempo. A mistura reaccional composta por tampão citocromo c reductase (Tabela 2.2) a 37°C, solução de citocromo c (reduzido vs oxidado) (Tabela 2.2) e por amostra foi dividida em 2 cuvetes e colocada num espectrofotómetro de feixe duplo (SHIMADZU: UV 2401RC). A reacção foi iniciada com a adição de NADPH (concentração final de 200 μM), sendo a variação da absorvência a 550 nm acompanhada durante 1 minuto. Com o auxílio do coeficiente de absorvidade molar do citocromo c ($\Delta\epsilon_{550\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pode ser calculada a velocidade com que as variantes da CYPOR reduzem o citocromo c . E sabendo ainda a actividade específica da CYPOR (3200 nmol por minuto) pode ser calculado o conteúdo desta proteína (Parikh *et al.*, 1997).

2.10. Imunodeteção da CYPOR expressa nas estirpes em estudo

A CYPOR pode ser estimada através do cálculo da velocidade com que reduz o citocromo *c* ou através da sua imunodeteção. No entanto, estirpes com variantes de CYPOR não têm assegurada a capacidade catalítica desta proteína, logo, para estas estirpes, não é possível estimar a CYPOR através da sua velocidade para reduzir o citocromo *c*. Deste modo, a estimativa da CYPOR, nas várias estirpes, foi feita por imunodeteção sendo a análise realizada por Western Blot, seguindo o procedimento descrito por Palma e colaboradores (Palma *et al.*, 2010) e por Kranendonk e colaboradores (Kranendonk *et al.*, 2008) com as seguintes alterações. O gel de corrida utilizado no SDS-Page foi o gel pré-fabricado Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad). A membrana utilizada na transferência eletroforética de proteínas foi de PVDF (*polyvinylidene fluoride*) (Immobilon-FL, Millipore corporation) de acordo com as instruções do fabricante. Na imunodeteção das proteínas utilizou-se o kit WesternDot 625 Western blot (Invitrogen), segundo instruções do fabricante, utilizando um anticorpo primário monoclonal da CYPOR (Santa Cruz Biotechnology; *Cytochrome P450 reductase (F-2) mouse monoclonal IgG_{2a}*) e como anticorpo secundário Biotin-XX goat anti-ratinho.

Subsequentemente as membranas foram fotografadas e o conteúdo em CYPOR foi calculado por densiometria, utilizando uma quantidade específica de CYPOR purificada como controlo, com o auxílio do software LabWorks (versão 4.6) (UVP, Inc.USA).

2.11. Ensaios de mutagenicidade com estirpes BTC

Os ensaios de mutagenicidade com estirpes BTC foram efectuados segundo a técnica de pré-incubação em meio líquido descrita por Kranendonk (Kranendonk *et al.*, 1998). Para estirpes que expressam CYP1A2 foram testadas as mutagenicidades dos compostos NNK (Anexos: Figura 7.8a) e IQ (Anexos: Figura 7.8b), enquanto para as estirpes que expressam CYP2A6, os compostos testados foram o NNK e o NNdEA (Anexos: Figura 7.8c).

A técnica consistiu na mistura de: 100 µl de cultura bacteriana, volume variável do composto a estudar, 250 µl de tampão de Ames (Tabela 2.2), 8 µl de uma solução de glucose 1 M e volume variável de água nanopura estéril, de forma a perfazer um volume final total de 800 µl. As misturas foram agitadas e incubadas a 37°C, durante 45 minutos, numa incubadora orbital (New Brunswick scientific; G25), com agitação de 175 rpm. Posteriormente, adicionou-se às misturas 2 ml de top's tiamina/arginina (Tabela 2.2) e plaqueou-se em meio VB (Tabela 2.2).

As placas foram incubadas numa estufa a 37°C, durante 48 horas, tendo o número de colónias/placa sido determinadas como descrito em 2.4.4. A partir do declive da recta calculado por regressão linear da curva dose resposta, de cada composto, foi possível calcular as actividades mutagénicas específicas. A análise estatística, dos ensaios de mutagenicidade, foi realizada através

da aplicação do teste *t* de Student, recorrendo ao software GraphPad de GraphPad Prism, versão 4.03, (GraphPad software. Inc).

2.12. Determinação da actividade catalítica do CYP1A2 e do CYP2A6

Avaliou-se a actividade catalítica do CYP1A2 e do CYP2A6, expresso nas estirpes bacterianas, através da determinação da sua capacidade para mediar determinadas reacções específicas, nomeadamente a *O*-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) mediada pelo CYP1A2 (Burke *et al.*, 1994) e a 7-hidroxilação da cumarina mediada pelo CYP2A6 (Sansen *et al.*, 2007). Os ensaios foram realizados com fracções membranares das estirpes, tendo a concentração de CYP e os tempos de incubação sido escolhidos de modo a serem obtidas velocidades de formação de metabolitos constantes.

2.12.1. *O*-Desmetilação da metoxiresorufina

A MROD é catalisada pelo CYP1A2 com a formação do produto fluorescente resorufina, assim a actividade enzimática do CYP1A2 pode ser medida através da determinação da fluorescência da amostra.

O ensaio foi executado em microplacas de 96 poços, com concentração de CYP1A2 de 8 nM, utilizando-se 7 diferentes concentrações de substrato até um máximo de 2 μ M de metoxiresorufina (Mthr) mantendo constante a concentração do solvente, DMSO, a 0,2% (v/v). Desta forma evitaram-se possíveis interferências com a actividade de CYP1A2, devidas ao solvente em concentrações mais elevadas poder inibir o CYP1A2 (Chauret *et al.*, 1998). O ensaio foi efectuado em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,6) com cloreto de magnésio (3 mM).

As reacções foram iniciadas com a adição a cada poço de um sistema regenerador de NADPH constituído por NADP⁺ (concentração final de 0,5 mM), glucose-6-fosfato (concentração final de 0,5 mM) e desidrogenase da glucose-6-fosfato (concentração final de 0,04 U/ml). As placas foram lidas num leitor de microplacas (Anthos Zenyth 3100) a 37°C, durante 20 minutos tendo a fluorescência do produto (resorufina) (λ de excitação = 535 nm e λ de emissão = 585 nm) sido medida em intervalos de 1 minuto.

Foram ainda realizados ensaios com FAD e FMN (10 μ M) com a finalidade de verificar a possibilidade de restaurar a capacidade das variantes da CYPOR em estudo para suportar a actividade catalítica do CYP.

A velocidade de formação da resorufina foi calculada por interpolação de uma recta de calibração deste composto, preparada exactamente nas mesmas condições experimentais descritas para as amostras. Os parâmetros de velocidade máxima da reacção ($V_{\text{máx}}$) e afinidade aparente do CYP para o substracto ($1/K_m$) foram determinados utilizando as velocidades na equação de

Michaelis-Menten, recorrendo ao software GraphPad de GraphPad Prism, versão 4.03, (GraphPad software, Inc).

2.12.2. 7-Hidroxilação da cumarina

A 7-hidroxilação da cumarina é catalisada pelo CYP2A6 com produção do metabolito fluorescente a 7-hidroxycumarina (7-HC), sendo a actividade enzimática deste CYP determinada como actividade de hidroxilação da cumarina.

Depois de algum trabalho de optimização (dados não mostrados) a medição da actividade mediada pelo CYP2A6 decorreu similarmente a 2.12.1 com as seguintes excepções: o substrato foi utilizado até um máximo de 20 μM (em 0,1% de Acetonitrilo (ACN)), a concentração de CYP2A6 foi de 25nM, tendo a fluorescência (λ de excitação = 390 nm e λ de emissão = 490 nm) sido medida em intervalos de 1 minuto.

Foram ainda realizados ensaios com soluções de FAD e FMN (10 μM) e os parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m para a actividade da cumarina hidroxilase mediada pelo CYP2A6 foram determinados como descrito na secção 2.12.1.

3. Resultados

O trabalho experimental iniciou-se com a construção do plasmídeo pLCM_hb5_POR^{Y459H}. Posteriormente foram montadas as estirpes de *E.coli* BTC1A2_POR, BTC1A2_hb5_POR, BTC2A6_POR e BTC2A6_hb5_POR para as variantes Y459H e Y181D da CYPOR, bem como a estirpe controlo não contendo CYPOR. Das colónias transformantes, foram verificadas as características fenotípicas, analisado o conteúdo de DNA plasmídico, avaliada a sensibilidade do alvo genético para detecção da mutagenicidade e pré-avaliada a expressão de CYP e *b*₅. Após a selecção do transformante, tomando em conta todas as características pretendidas, avaliou-se a expressão de CYP, *b*₅ e CYPOR nas fracções membranares, com a finalidade de caracterizar cada sistema celular quanto ao conteúdo dos factores do complexo enzimático de CYP pretendido.

Após a caracterização e validação para o uso específico, as diferentes estirpes foram aplicadas em ensaios para investigar o efeito e o modo de funcionamento do *b*₅. Estes ensaios constaram em verificar o funcionamento do CYP1A2 e CYP2A6 através de duas abordagens diferentes. Na primeira abordagem (secção 3.2) foram verificadas as capacidades para bioactivar mutagénios, cuja bioactivação é conhecida por ser mediada pelos CYPs em questão, utilizando as bactérias em testes de mutagenicidade. Na segunda abordagem (secção 3.3) foram determinados dois parâmetros cinéticos dos CYPs, para dois substratos padrão, utilizando preparações membranares das estirpes em estudo.

3.1. Montagem e validação dos sistemas celulares

3.1.1. Clonagem do plasmídeo pLCM_hb5_POR^{Y459H}

Dos plasmídeos utilizados no decurso deste estudo apenas foi necessária a construção do plasmídeo pLCM_hb5_POR^{Y459H}, descrita na secção 2.3, devido ao facto dos restantes (Tabela 2.3) já estarem clonados.

A introdução da mutação, que leva à variante Y459H, foi posteriormente confirmada por sequenciação do fragmento pLCM_hb5_POR^{Y459H}. Os primers utilizados foram F1, F2, F3, R1, R2 e R4 (Tabela 2.5) que abarcam, nos dois sentidos, a extensão a confirmar, isto é, o cDNA do *POR* e do *b*₅ e ainda os seus promotores. Na Figura 3.1 está representado o local dos primers, bem como o local da mutação no plasmídeo.

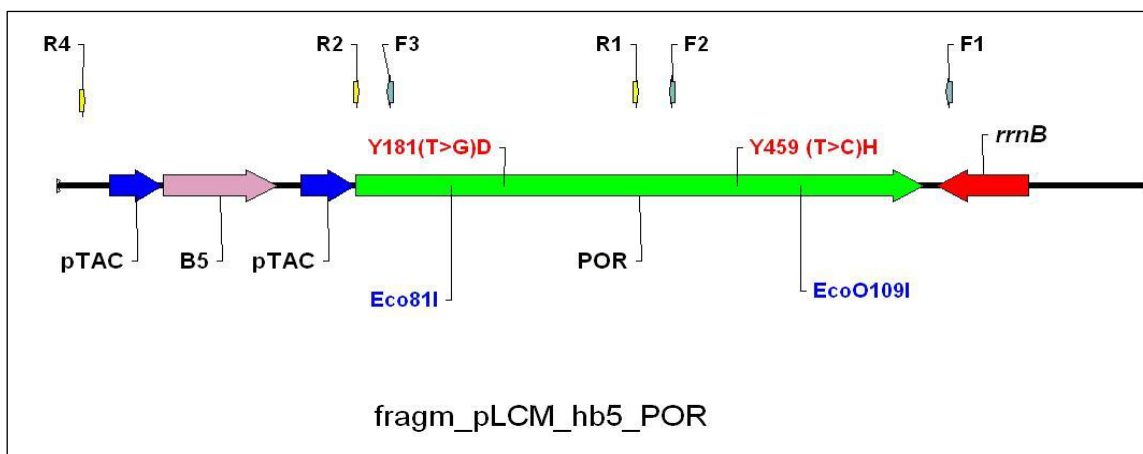


Figura 3.1: Representação gráfica do fragmento do plasmídeo pLCM_hb5_POR.

[Contem a posição das mutações no cDNA do gene *POR* que levam às variantes Y459H e Y181D; posição dos primers *forward* (ciano) e primers *reverse* (amarelo); locais de corte das enzimas de restrição Eco81I e EcoO109I.]

3.1.2. Construção das diferentes estirpes BTC

Para a construção das estirpes deste estudo, as bactérias de *E.coli* PD301 (Tabela 2.4) foram transformadas por electroporação, com os plasmídeos pCWh1A2 ou pCWh2A6, em combinação com os plasmídeos portadores do cDNA do *b₅* e das variantes da CYPOR obtendo deste modo 7 novas estirpes, referenciadas na Tabela 2.4 (página 27). Para 6 colónias transformantes de cada estirpe, foram verificadas as características fenotípicas, o conteúdo em DNA plasmídico, determinados os níveis de expressão de CYP e *b₅* e verificada a sensibilidade do alvo genético para detectar mutagenicidade, utilizando o mutagénio 4NQO que não precisa da bioactivação mediada pelo CYP para ser genotóxico. Assim sendo, foi possível seleccionar o transformante mais adequado para cada estirpe construída.

3.1.2.1. Verificação das características fenotípicas das estirpes

Todos os transformantes apresentaram auxotrofia para L-Arg, verificada pelo crescimento em meio selectivo (secção 2.4.2). A existência de LPS^d foi confirmada em todos os transformantes pela ausência de crescimento em meio MacConkey (secção 2.4.2). Com o crescimento dos transformantes em placas LB (Tabela 2.2) suplementados com Kan, Amp e Cm confirmou-se a presença dos vectores plasmídicos pLCM e pCW, bem como do gene *ogt* inactivo (secção 2.4.2).

3.1.2.2. Análise do conteúdo em DNA plasmídico

Para cada estirpe foi extraído e analisado o conteúdo do DNA plasmídico de todos os transformantes por electroforese, de modo a confirmar a presença e a estabilidade dos plasmídeos introduzidos em cada estirpe. Assim sendo, foi possível verificar a existência de bandas correspondentes a pCWh1A2 (6916 bp) ou pCWh2A6 (6916 bp), pLCM_POR (9079 bp) ou

pLCM_hb5_POR (9738 bp) (secção 2.4.3). Na Figura 3.2 está representado um exemplo dos resultados obtidos, mais especificamente dos transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.

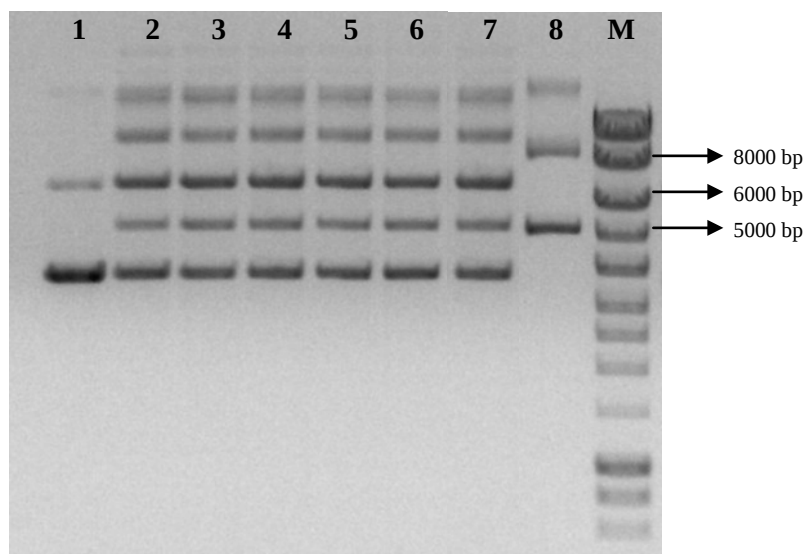


Figura 3.2: Fotografia do gel de electroforese do DNA plasmídico dos transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.
[pista 1: pCWh1A2; pistas 2 a 7: 6 transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}; pista 8: pLCM_hb5_POR^{Y459H}; M: marcador.]

De um modo geral, as amostras apresentaram todas as bandas correspondentes aos plasmídeos que constituem a estirpe, neste caso bandas correspondentes a pCWh1A2 (pista 1 da Figura 3.2) e pLCM_hb5_POR^{Y459H} (pista 8 da Figura 3.2), indicando que a estirpe tem os dois plasmídeos e estão estáveis.

3.1.2.3. Verificação da sensibilidade do alvo genético para detectar mutagenicidade

É conhecida a capacidade de detecção da mutagenicidade de 4NQO nas estirpes BTC (Duarte *et al.*, 2005b), logo para verificar a sensibilidade da detecção de mutagenicidade das estirpes construídas foi utilizado o mutagénio 4NQO (0,15µg). Todos os transformantes (#1 a #6) foram testados com o referido mutagénio, bem como os controlos para cada estirpe, tendo como exemplo Figura 3.3 os transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.

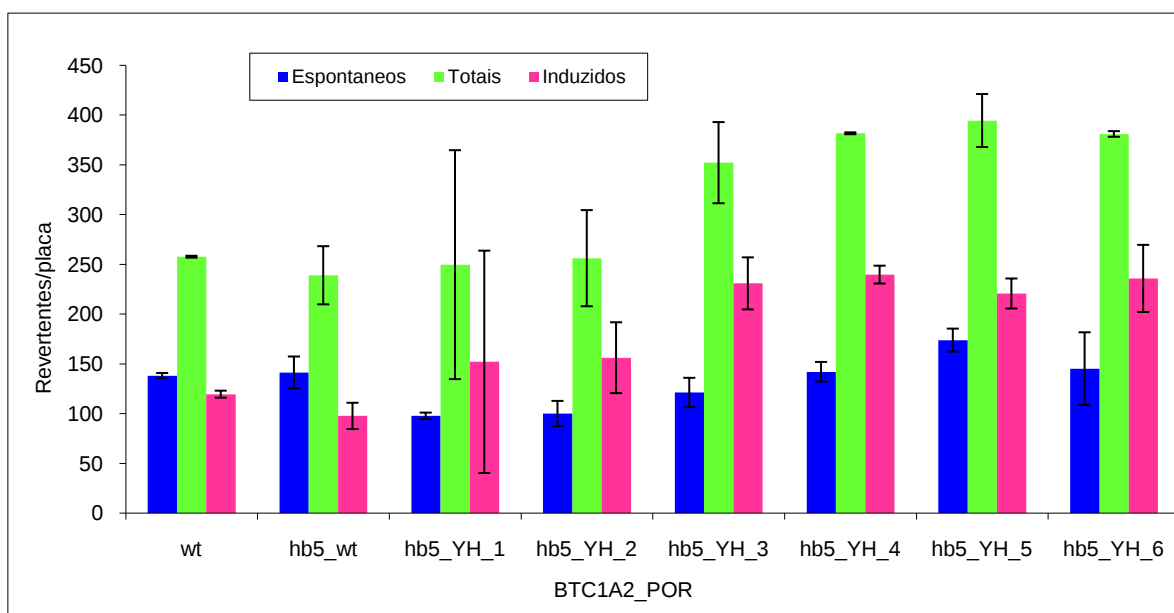


Figura 3.3: Histograma da detecção de mutagenicidade de 4NQO com candidatos da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.

[colunas a azul: revertentes espontâneos; colunas a verde: revertentes totais; colunas a rosa: revertentes induzidos; wt: BTC1A2_POR^{wt}; hb5_wt: BTC1A2_hb5_POR^{wt}; hb5_YH_1-6: candidatos transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.]

Observou-se uma resposta mutagénica para todas as estirpes testadas, existindo variação na resposta espontânea e na resposta absoluta entre os transformantes. Neste caso é possível afirmar que o transformante que apresenta maior sensibilidade na detecção de mutagenicidade é o número 4 (hb5_YH_4), visto ser o transformante que apresenta uma maior resposta absoluta, uma menor resposta espontânea havendo deste modo uma maior diferença entre as duas respostas.

3.1.2.4. Pré-avaliação da expressão dos citocromos P450 e citocromo b_5

A pré-avaliação da expressão de CYP (secção 2.4.5.1) e b_5 (secção 2.4.5.2), foi executado com bactérias inteiras, feita através da quantificação dos seus níveis de expressão por espectrofotometria, tendo em particular atenção o rácio. Como exemplo desta pré-avaliação os espectros diferenciais do CYP (Figura 3.4) e do b_5 (Figura 3.5), de um dos candidatos transformantes da estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}, são apresentados de seguida.

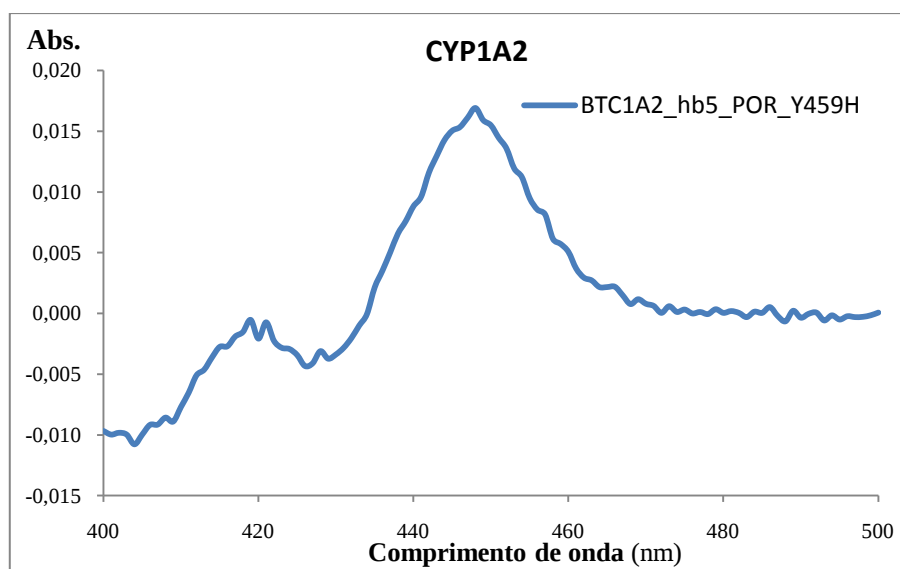


Figura 3.4: Representação gráfica do espectro diferencial do CYP1A2 (CYP complexado com CO versus CYP reduzido) na estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.

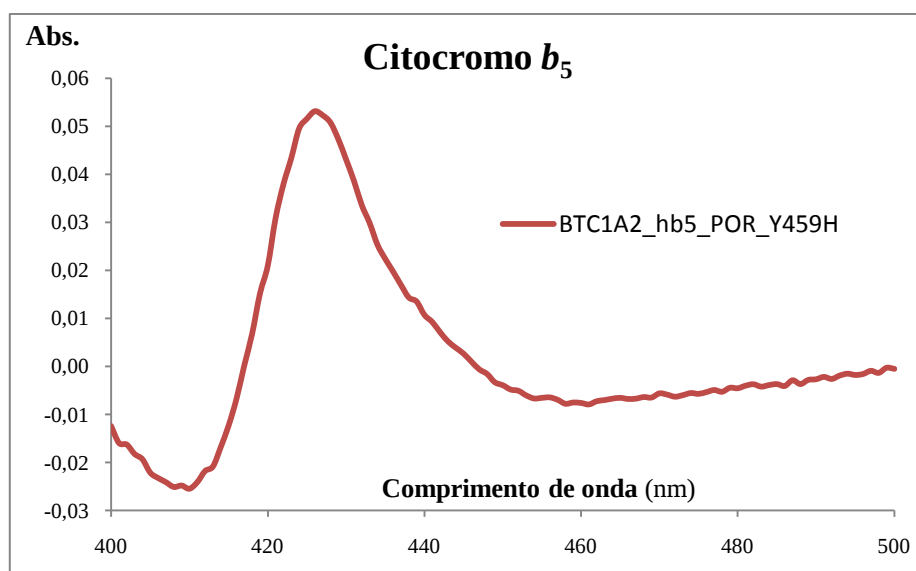


Figura 3.5: Representação gráfica do espectro diferencial do b_5 (b_5 reduzido versus b_5 oxidado) na estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}.

Após a análise dos resultados, apresentados nas secções 3.1.2.1, 3.1.2.2, 3.1.2.3 e 3.1.2.4, foi possível seleccionar um transformante de cada estirpe, o qual satisfazia a conjugação de critérios mais adequada. Os critérios de escolha basearam-se na expressão de CYP e b_5 , presença nos transformantes de todas as bandas correspondentes aos plasmídeos que as possuem e uma maior sensibilidade na detecção de mutagenicidade. No exemplo explicitado o transformante seleccionado foi o candidato número 4.

A Tabela 3.1 evidencia a quantificação de CYP, b_5 e a razão b_5 /CYP em bactérias inteiras, de todas as estirpes manipuladas neste trabalho.

Tabela 3.1: Quantificação de CYP e b_5 , e rácio b_5 /CYP em bactérias inteiras.

Estirpes	[CYP] (nM)	[b_5] (nM)	b_5 /CYP
BTC1A2_POR ^{wt}	195 ± 3	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{wt}	210 ± 11	128 ± 9	0,6
BTC1A2_POR ^{Y459H}	118 ± 5	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	190 ± 9	234 ± 20	1,23
BTC1A2_POR ^{Y181D}	306 ± 12	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Y181D}	189 ± 6	136 ± 10	0,72
BTC1A2_POR ^{Null}	262 ± 14	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Null}	301 ± 20	71 ± 6	0,23
BTC2A6_POR ^{wt}	248 ± 10	-	-
BTC2A6_hb5_POR ^{wt}	167 ± 4	85 ± 6	0,51
BTC2A6_POR ^{Y459H}	149 ± 3	-	-
BTC2A6_hb5_POR ^{Y459H}	217 ± 12	45 ± 3	0,21
BTC2A6_POR ^{Y181D}	163 ± 6	-	-
BTC2A6_hb5_POR ^{Y181D}	205 ± 16	101 ± 6	0,49
BTC2A6_POR ^{Null}	225 ± 11	-	-
BTC2A6_hb5_POR ^{Null}	171 ± 9	57 ± 4	0,33

-: não aplicável

Os rácios b_5 /CYP (Tabela 3.1) das diversas estirpes, são um parâmetro de validação das mesmas para a aplicação neste estudo, apresentam valores semelhantes com os encontrados no fígado humano (1,1 [0,27-2,7]) (Paine *et al.*, 1997; Venkatakrishnan *et al.*, 2000).

3.1.3. Verificação dos factores do complexo enzimático do citocromo P450

As diferentes estirpes foram caracterizadas quanto aos conteúdos relativos de CYP, CYPOR e b_5 tendo como finalidade validar os sistemas bacterianos relativamente aos rácios b_5 /CYP e CYPOR/CYP encontrados no fígado humano. É tomado em consideração as concentrações de cada proteína estarem na mesma ordem de grandeza entre as estirpes, garantindo assim a sua correcta aplicação. Para uma melhor precisão nesta validação foram utilizadas preparações membranares, visto só ser possível a quantificação do CYPOR neste tipo de preparações.

A expressão dos CYPs (secção 2.7) apresentou valores (Tabela 3.2) que variaram entre 53 pmol/mg de proteína na estirpe BTC1A2_hb5_POR^{wt} e 205 pmol/mg de proteína para a BTC2A6_POR^{wt}.

A co-expressão de b_5 e a presença de mutações no gene *POR* não parecem ter efeitos significativos sobre os níveis de expressão dos dois CYPs. A expressão do b_5 varia entre 38

pmol/mg de proteína, para a estirpe BTC1A2_hb5_POR^{wt} e 80 pmol/mg de proteína para a BTC2A6_hb5_POR^{Y181D}.

O nível de expressão da CYPOR nas diferentes estirpes BTC foi estimado por imunodeteção comparativa (Anexos: Figura 7.4 a Figura 7.7), utilizando quantidades estandardizadas de CYPOR purificada. Este método de quantificação do nível de expressão da CYPOR foi validado atendendo aos valores da capacidade de redução do citocromo *c* pela CYPOR, em pmol/mg de proteína, nas estirpes BTC1A2_POR^{wt} (11,6 ± 1,0), BTC1A2_POR^{wt} (7,4 ± 0,3), BTC1A2_hb5_POR^{wt} (13,0 ± 0,2) e BTC2A6_hb5_POR^{wt} (10,4 ± 0,8).

Tabela 3.2: Conteúdo de CYP, *b*₅, CYPOR e respectivos rácios presentes nas fracções membranares.

Estirpes BTC	CYP (pmol/mg proteína)	<i>b</i> ₅ (pmol/mg proteína)	CYPOR (pmol/mg proteína)	<i>b</i> ₅ /CYP	CYPOR/CYP
BTC1A2_POR ^{wt}	65 ± 2	-	13,6 ± 1,0	-	0,21
BTC1A2_hb5_POR ^{wt}	53 ± 2	38 ± 1	6,1 ± 0,2	0,72	0,11
BTC1A2_POR ^{Y459H}	102 ± 9	-	11,6 ± 0,9	-	0,11
BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	120 ± 4	63 ± 3	6,0 ± 0,1	0,52	0,05
BTC1A2_POR ^{Y181D}	71 ± 2	-	20,2 ± 0,6	-	0,28
BTC1A2_hb5_POR ^{Y181D}	91 ± 2	62 ± 2	6,8 ± 0,4	0,69	0,08
BTC1A2_POR ^{Null}	113 ± 1	-	(< 0,1)	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Null}	103 ± 1	44 ± 2	(< 0,1)	0,43	-
BTC2A6_POR ^{wt}	205 ± 3	-	12,9 ± 0,5	-	0,06
BTC2A6_hb5_POR ^{wt}	118 ± 11	68 ± 4	10,7 ± 0,3	0,57	0,09
BTC2A6_POR ^{Y459H}	175 ± 1	-	12,7 ± 0,4	-	0,07
BTC2A6_hb5_POR ^{Y459H}	125 ± 1	45 ± 2	7,9 ± 0,8	0,36	0,06
BTC2A6_POR ^{Y181D}	140 ± 3	-	13,2 ± 0,1	-	0,09
BTC2A6_hb5_POR ^{Y181D}	170 ± 1	80 ± 4	10,1 ± 0,2	0,47	0,06
BTC2A6_POR ^{Null}	153 ± 14	-	(< 0,1)	-	-
BTC2A6_hb5_POR ^{Null}	158 ± 1	55 ± 3	(< 0,1)	0,35	-
Microsomas do fígado humano				1,1[0,27-2,7] ^a	0,2[0,08-0,5] ^b

:- não determinado; ^a - rácios das concentrações de *b*₅ e CYP no fígado humano (Paine *et al.*, 1997; Venkatakrishnan *et al.*, 2000); ^b - rácios das concentrações de CYPOR e CYP no fígado humano (Paine *et al.*, 1997; Venkatakrishnan *et al.*, 2000).

3.1.4. Caracterização da capacidade de redução do citocromo *c* pelas variantes de CYPOR em estudo

O impacto das variantes Y459H e Y181D na funcionalidade da CYPOR foi avaliado através da determinação da velocidade de redução do citocromo *c*. A análise dos resultados obtidos com as estirpes variantes de CYPOR mostrou que ambas as mutações afectam seriamente a capacidade da CYPOR para reduzir o citocromo *c*, levando a níveis basais como os encontrados para a estirpe sem CYPOR (Figura 3.6).

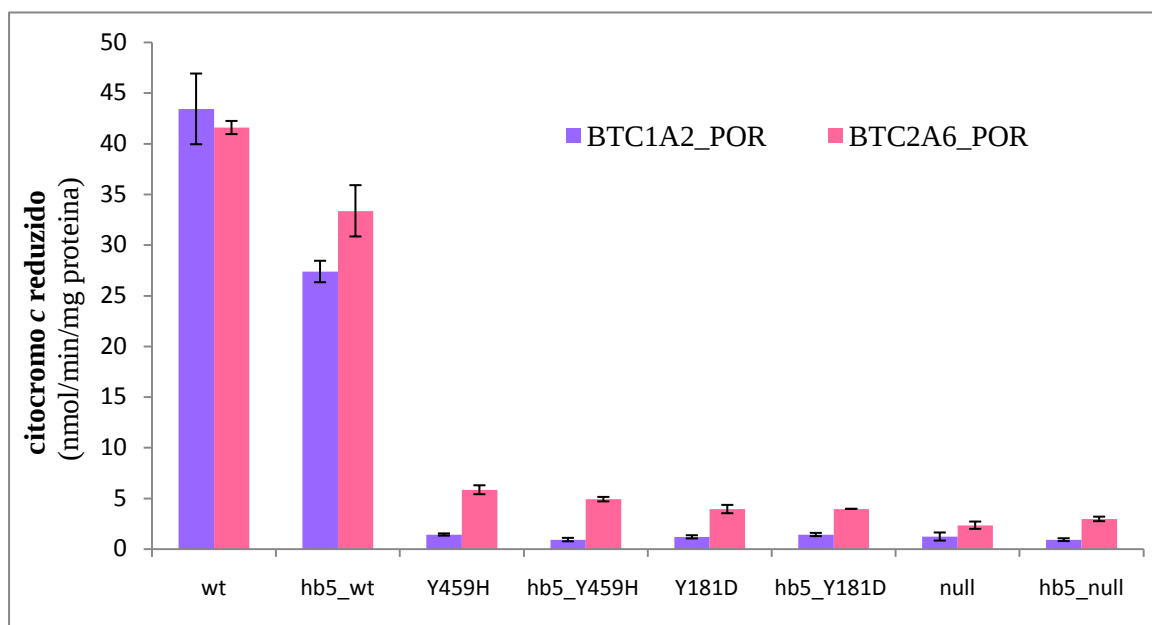


Figura 3.6: Histograma da velocidade de redução do citocromo *c* nas estirpes BTC1A2_POR e BTC2A6_POR.

[colunas a roxo: estirpes com CYP1A2; colunas a rosa: estirpes com CYP2A6; wt: BTCCYP_POR^{wt}; hb5_POR: BTCCYP_hb5_POR^{wt}; null: BTCCYP_POR^{null}; hb5_null: BTCCYP_hb5_POR^{null}; Y459H: BTCCYP_POR^{Y459H}; hb5_Y459H: BTCCYP_hb5_POR^{Y459H}; Y181D: BTCCYP_POR^{Y181D}; hb5_Y181D: BTCCYP_hb5_POR^{Y181D}.]

3.2. Efeito do citocromo *b*₅ sobre a actividade catalítica do CYP1A2 e CYP2A6:

Estudos de bioactivação

Com a finalidade de avaliar o efeito do *b*₅ na bioactivação dos dois CYPs as estirpes foram aplicadas, com variantes da CYPOR, em ensaios de mutagenicidade utilizando as bactérias BTC mencionadas na Tabela 2.4. Foram testados três pré-carcinogénios, o NNK, o NNdEA e o IQ, uma vez que os CYPs em causa medeiam a bioactivação dos respectivos compostos. Para as estirpes que expressam CYP1A2 utilizou-se o NNK e IQ, enquanto para as estirpes que expressam CYP2A6 os pré-carcinogénios utilizados foram com NNK e o NNdEA.

No Figura 3.7 está patente um exemplo da curva dose-resposta do NNdEA da estirpe BTC2A6_POR^{wt}, que tem uma actividade mutagénica de 538 ± 21 rev/ μ mol.

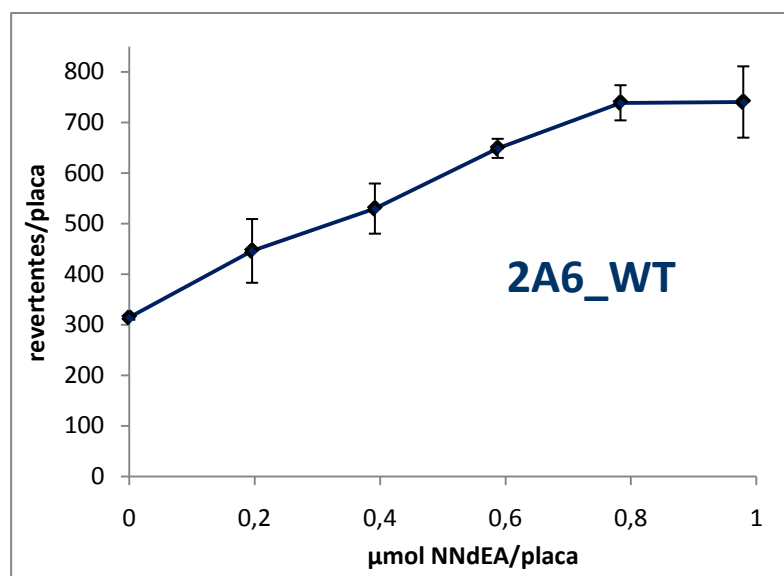


Figura 3.7: Gráfico representativo da curva dose-resposta em mutagenicidade do NNdEA com a estirpe BTC2A6_POR^{wt}.

Todas as actividades mutagénicas (Anexos: Tabela 7.1) foram normalizadas relativamente às estirpes no qual o CYP foi co-expresso com a variante da CYPOR consensual (*wild-type*), mas sem *b*₅.

A Figura 3.8 representa os dados obtidos para as estirpes com CYP1A2 na presença ou ausência da expressão de *b*₅, sendo a actividade do CYP sustentada pelas diferentes variantes de CYPOR. A capacidade de CYP1A2 na bioactivação do NNK e IQ, em produtos mutagénicos, mostrou-se ser debilitada na presença das variantes Y459H e Y181D da CYPOR, nomeadamente em 60% e 20% de actividade, relativamente quando esta era sustentada com a variante *wild-type* da CYPOR. É de salientar o facto da alteração Y181D da CYPOR se ter revelado mais debilitante, levando à redução da actividade de CYP1A2 até níveis semelhantes aos do controlo negativo, BTC1A2_POR^{null}.

Comparativamente à estirpe BTC1A2_POR^{wt} a actividade mutagénica relativa do NNK na estirpe BTC1A2_hb5_POR^{wt} aumentou 150%, enquanto que do IQ parece ter sido reduzida embora essa redução seja pouco significativa ($p < 0,01$) (Figura 3.8). Em todas as restantes estirpes que expressam o *b*₅ ocorreu um aumento da bioactivação dos pré-carcinogénios em relação às estirpes sem *b*₅, tendo a bioactivação do NNK um aumento mais acentuado. É de realçar que a estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y181D}, para o NNK, atingiu valores de actividade mutagénica próximos da BTC1A2_POR^{wt}, enquanto a estirpe BTC1A2_hb5_POR^{Y459H} aumentou a sua actividade mutagénica em 50%, em relação à BTC1A2_POR^{wt} (Figura 3.8). Foi ainda verificado que a BTC⁰_hb5_POR^{wt} tinha níveis de actividade basais semelhantes ao controlo negativo BTC1A2_POR^{null} e à BTC1A2_POR^{Y181D}.

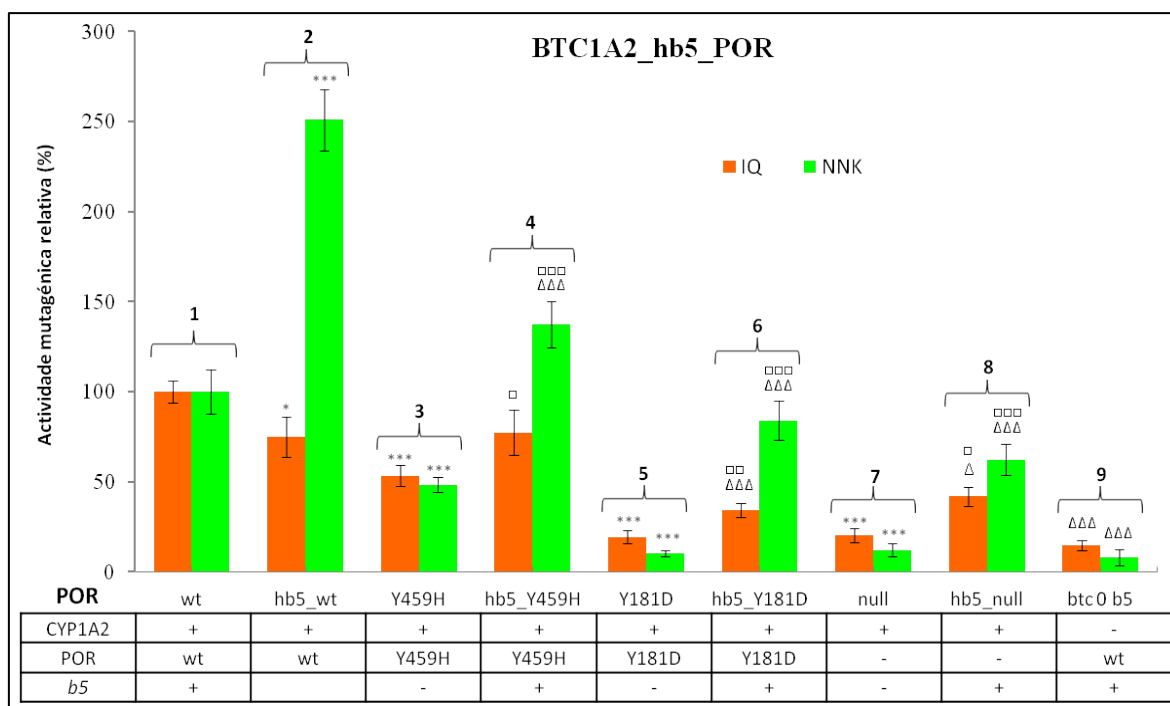


Figura 3.8: Histograma das actividades mutagénicas relativas dos pró-carcinogénios NNK e IQ nas estirpes com CYP1A2, b_5 e com as variantes da CYPOR, em relação à $BTC1A2_POR^{wt}$.

[1 - wt: $BTC1A2_POR^{wt}$; 2 - hb5_wt: $BTC1A2_hb5_POR^{wt}$; 3 - Y459H: $BTC1A2_POR^{Y459H}$; 4 - hb5_Y459H: $BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}$; 5 - Y181D: $BTC1A2_POR^{Y181D}$; 6 - hb5_Y181D: $BTC1A2_hb5_POR^{Y181D}$; 7 - null: $BTC1A2_POR^{null}$; 8 - hb5_null: $BTC1A2_hb5_POR^{null}$; 9 - btc 0 b5: $BTC^0_hb5_POR$. Os graus de significância são representados pelos símbolos (*) em relação à $BTC1A2_POR^{wt}$, (Δ) em relação a $BTC1A2_hb5_POR^{wt}$ e (□) em relação às correspondentes estirpe variantes sem b_5 ; $P < 0,0001$ (ΔΔΔ; □□□; ***), $P < 0,001$ (ΔΔ; □□; **), $P < 0,01$ (Δ; *, □).]

Relativamente à estirpe que expressa CYP2A6 sem b_5 verificou-se que, comparativamente aos valores obtidos com $BTC2A6_POR^{wt}$, a bioactivação do NNdEA tem uma redução significativa ($p < 0,0001$) na estirpe com a variante Y459H da CYPOR (Figura 3.9). Em relação ao NNK, não parece que a $BTC2A6_POR^{null}$ seja capaz de bioactivar este composto, no entanto as estirpes similares mas com as variantes Y459H e Y181D da CYPOR evidenciam aumentos na bioactivação do NNK. Estes aumentos foram de 3,5 vezes para a $BTC2A6_POR^{Y181D}$ não sendo significativo para a $BTC2A6_POR^{Y459H}$ uma vez que teve um aumento de apenas 1,5 vezes (Figura 3.9).

Tendo como base comparativa os valores obtidos com a estirpe $BTC2A6_POR^{wt}$, a bioactivação do NNdEA triplicou e a do NNK aumentou cerca de 8 vezes para a estirpe $BTC1A2_hb5_POR^{wt}$, mostrando a diferença significativa que provoca a presença do b_5 nesta estirpe. Em todas as restantes estirpes que expressam o b_5 foi evidente, exceptuando a estirpe $BTC^0_hb5_POR^{wt}$ que não apresenta bioactivação para nenhum dos compostos, um aumento da bioactivação dos pré-carcinogénios em relação às estirpes sem b_5 (Figura 3.9).

As estirpes que expressam o b_5 conjuntamente com as variantes alteradas da CYPOR apresentam um aumento entre os 200% e os 1300% da bioactivação do NNdEA em relação os valores obtidos para a estirpe $BTC1A2_POR^{wt}$. É de realçar que, em relação à

BTC2A6_hb5_POR^{wt}, para o composto NNK, apesar de um aumento da sua bioactivação por parte de todas as estirpes com *b*₅, a estirpe BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} duplicou os valores da actividade mutagénica, enquanto para as estirpes BTC2A6_hb5_POR^{Y459H} e BTC2A6_hb5_POR^{Null} não se verificaram alterações significativas (Figura 3.9).

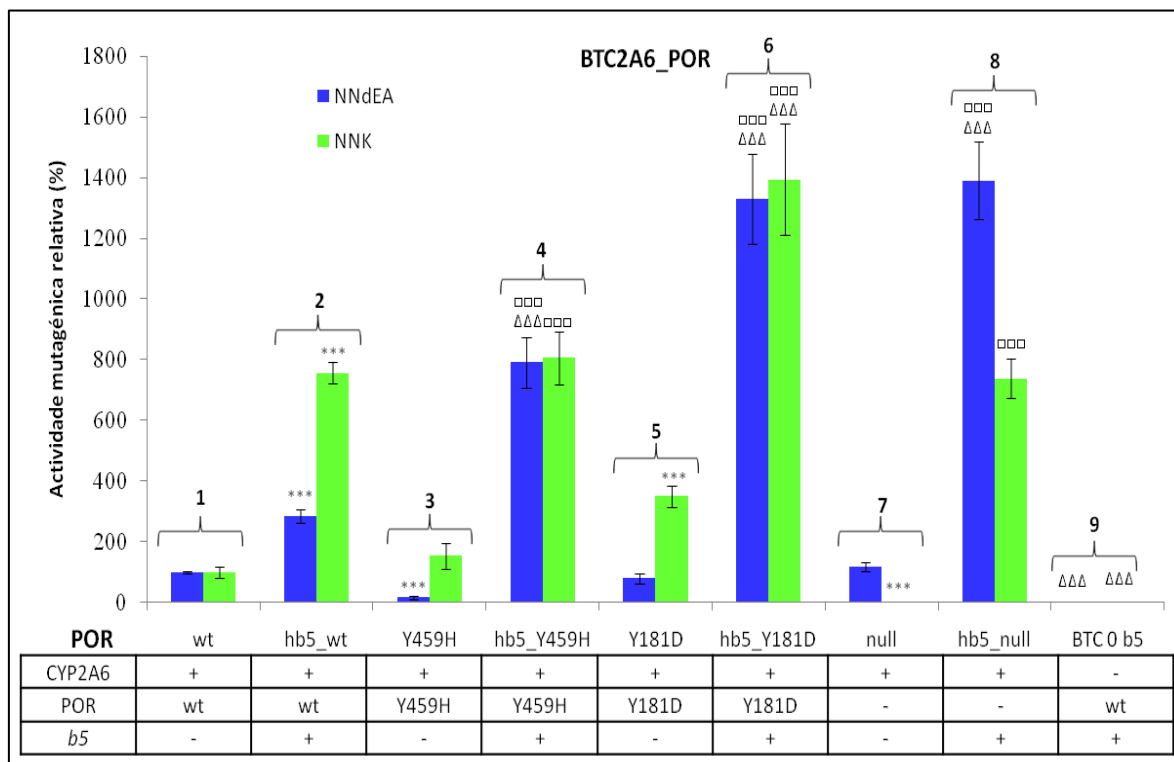


Figura 3.9: Histograma representativo das actividades mutagénicas relativas dos pró-carcinogénios NNK e NNdEA nas estirpes com CYP2A6, *b*₅ e com as variantes da CYPOR, em relação à BTC2A6_POR^{wt}. [1 - wt: BTC2A6_POR^{wt}; 2 - hb5_wt: BTC2A6_hb5_POR^{wt}; 3 - Y459H: BTC2A6_POR^{Y459H}; 4 - hb5_Y459H: BTC2A6_hb5_POR^{Y459H}; 5 - Y181D: BTC2A6_POR^{Y181D}; 6 - hb5_Y181D: BTC2A6_hb5_POR^{Y181D}; 7 - null: BTC2A6_POR^{null}; 8 - hb5_null: BTC2A6_hb5_POR^{null}; 9 - BTC 0 b5: BTC⁰_hb5_POR. Os graus de significância são representados pelos símbolos (*) em relação à BTC2A6_POR^{wt}, (Δ) em relação à BTC2A6_hb5_POR^{wt} e (□) em relação às correspondentes estirpes variantes sem *b*₅; P<0,0001(ΔΔΔ;□□□;***).]

3.3. Efeito do citocromo *b*₅ sobre a actividade catalítica do CYP1A2 e CYP2A6:

Estudos de cinética

Para determinar o efeito da presença do *b*₅ relativamente à actividade catalítica do CYP1A2 e CYP2A6 com variantes da CYPOR, foram usadas preparações membranares das estirpes em estudo. Para este fim foram determinados os parâmetros cinéticos, *V*_{máx} e *K*_m, da reacção de *O*-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) mediada pelo CYP1A2, e da reacção de 7-hidroxilação da cumarina mediada pelo CYP2A6, sendo estas duas reacções padrão para cada um dos CYPs. As reacções mencionadas foram igualmente realizadas na presença dos grupos prostéticos FAD e FMN, visto que a perda da função das variantes Y459H e Y181D da CYPOR foi supostamente causada por uma diminuição da afinidade de ligação destas duas variantes de *POR* para estes

grupos prostéticos, respectivamente (Marohnic *et al.*, 2006; Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009).

Todas as estirpes que evidenciaram ter capacidade para mediar as respectivas reacções demonstraram curvas de velocidades que podem ser representadas graficamente de acordo com a equação de Michaelis-Menten. Como exemplo dos gráficos correspondentes a este modelo, temos o Figura 3.10 para a reacção de MROD e o Figura 3.13 para a reacção de 7-Hidroxilação da cumarina. Para as restantes reacções, nomeadamente, MROD com FAD (Anexos: Figura 7.9), MROD com FMN (Anexos: Figura 7.10), 7-hidroxilação da cumarina com FAD (Anexos: Figura 7.11) e 7-hidroxilação da cumarina com FMN (Anexos: Figura 7.12), os gráficos encontram-se em anexo.

No Figura 3.11 e Figura 3.12 estão representados os parâmetros cinéticos, $V_{\text{máx}}$ e K_m , bem como a eficácia da reacção ($V_{\text{máx}}/K_m$) respectivamente, para as reacções MROD (Anexos: Tabela 7.2). No Figura 3.14 e Figura 3.15 estão representados os mesmos parâmetros mas da reacção catalisada pelo CYP2A6, a 7-Hidroxilação da cumarina (Anexos: Tabela 7.3).

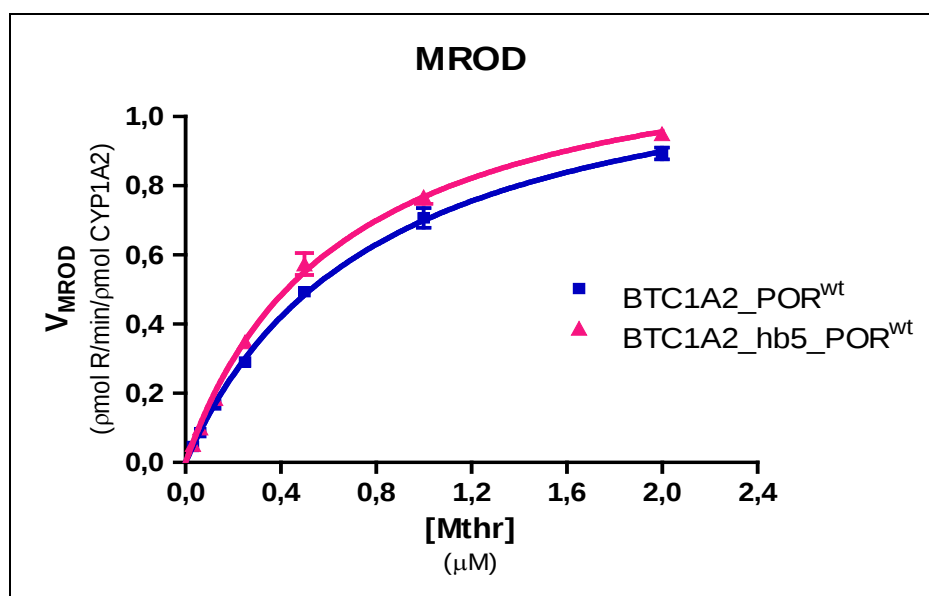


Figura 3.10: Gráfico da velocidade de *O*-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) em função da concentração de metoxiresorufina. [R: resorufina]

As membranas da BTC1A2_POR^{wt} e da BTC1A2_hb5_POR^{wt} apresentaram actividade de CYP1A2, sendo capazes de mediar a reacção de MROD, contudo na ausência de CYPOR ou com as variantes Y459H e Y181D da mesma, quer na presença ou ausência de *b*₅ não houve detecção da actividade de CYP1A2. Na reacção com FAD (10 µM) e FMN (10 µM) apenas as estirpes na ausência da CYPOR não apresentaram actividade deste CYP (Figura 3.11).

Tendo como termo de comparação as correspondentes estirpes *wild-type* de CYPOR, as estirpes BTC1A2_POR^{Y459H} e BTC1A2_POR^{Y181D} recuperaram a $V_{\text{máx}}$, em cerca de 56% e 38%, e o K_m em 66% e 57%, respectivamente. Relativamente às estirpes BTC1A2_hb5_POR^{Y459H} e

BTC1A2_hb5_POR^{Y181D}, verificou-se uma recuperação da $V_{\text{máx}}$ em cerca de 30% e 33%, assim como do K_m em aproximadamente 47% e 45%, respectivamente (Figura 3.11).

Nas reacções com os grupos prostéticos as membranas com b_5 exibiram velocidades máximas inferiores às correspondentes membranas sem b_5 , contudo a diminuição do K_m nas estirpes com b_5 evidencia um aumento da afinidade do CYP1A2 para o substrato. Sendo este aumento entre 11% e 18% para as membranas *wild-type* e 30% a 42% para as variantes Y459H e Y181D da CYPOR, respectivamente (Figura 3.11).

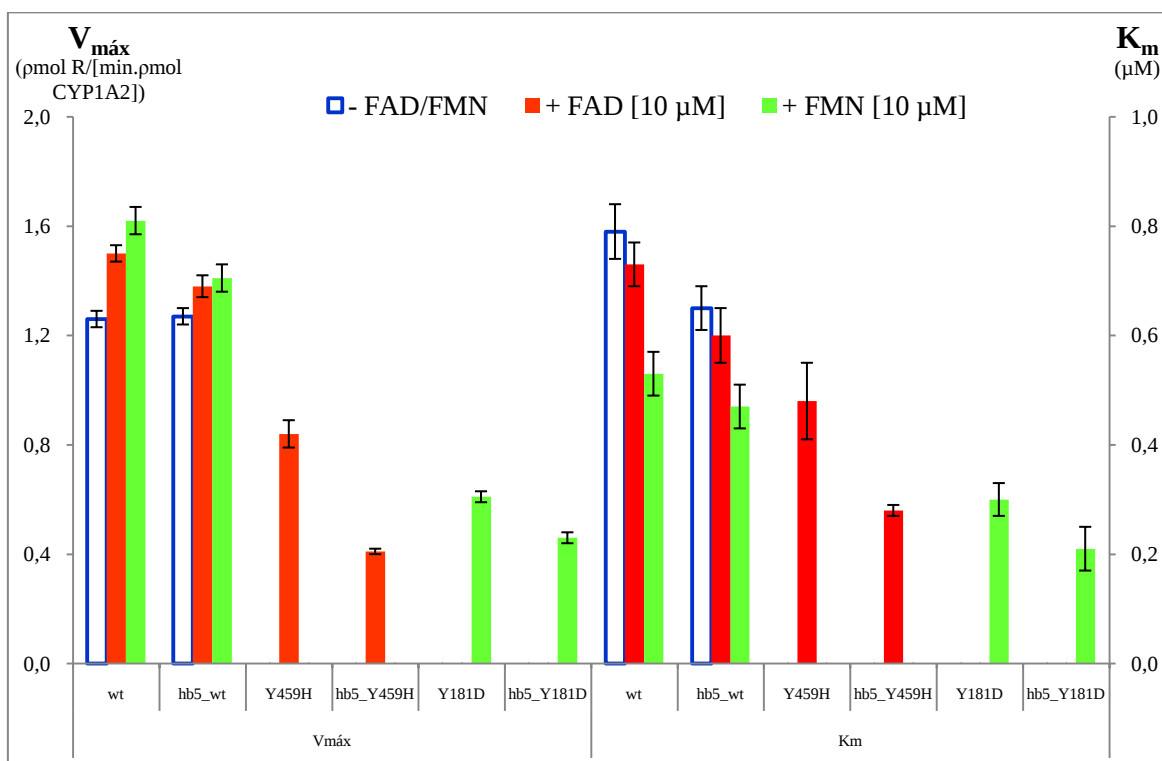


Figura 3.11: Histograma dos parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m para a reacção de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD), consoante as diferentes membranas com CYP1A2.

[branco: MROD sem FAD/FMN; vermelho: MROD com FAD [10 μM]; verde: MROD com FMN [10 μM]; R: resorufina; wt: BTC1A2_POR^{wt}; hb5_POR: BTC1A2_hb5_POR^{wt}; Y459H: BTC1A2_POR^{Y459H}; hb5_Y459H: BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}; Y181D: BTC1A2_POR^{Y181D}; hb5_Y181D: BTC1A2_hb5_POR^{Y181D}.]

Comparativamente à membrana com CYP1A2 combinada com a variante consensual da CYPOR, as membranas correspondentes com as variantes Y459H e Y181D da CYPOR demonstraram uma diminuição da eficácia da reacção em 12% e 35%, respectivamente (Figura 3.12). Na presença de b_5 a eficácia da reacção para a BTC2A6_hb5_POR^{wt} aumenta em 25% na reacção de MROD, 10% na presença de FAD, apesar de diminuir em 3% na reacção com FMN (Anexos: Tabela 7.2). Para a estirpe BTC2A6_hb5_POR^{Y459H} a presença de b_5 teve um factor de influência na eficácia da reacção de 0,83, e um factor positivo de 1,1 na presença da variante Y181D da CYPOR (Figura 3.12).

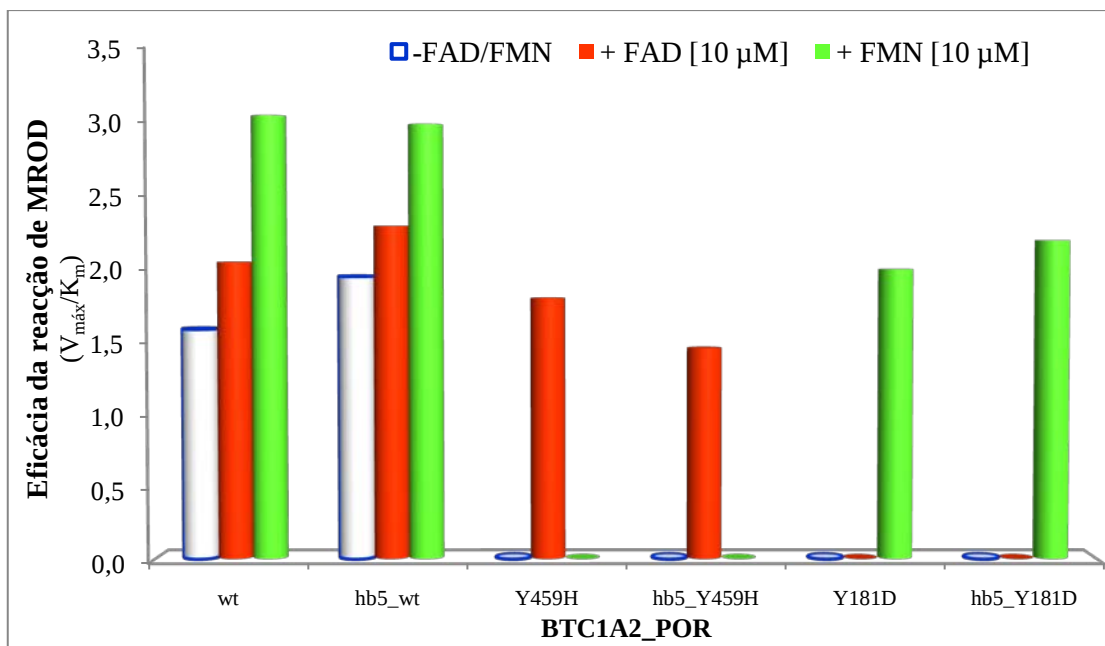


Figura 3.12: Histograma da eficácia da reacção ($V_{\max}/K_m$) de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD), consoante as diferentes membranas com CYP1A2.

[branco: MROD sem FAD/FMN; vermelho: MROD com FAD [10 µM]; verde: MROD com FMN [10 µM]; wt: BTC1A2_POR^{wt}; hb5_POR: BTC1A2_hb5_POR^{wt}; Y459H: BTC1A2_POR^{Y459H}; hb5_Y459H: BTC1A2_hb5_POR^{Y459H}; Y181D: BTC1A2_POR^{Y181D}; hb5_Y181D: BTC1A2_hb5_POR^{Y181D}.]

O CYP2A6 nas membranas *wild-type* de CYPOR foi capaz de mediar a reacção de 7-hidroxilação da cumarina, contudo na ausência da CYPOR ou com as variantes Y459H e Y181D não houve detecção da actividade deste CYP.

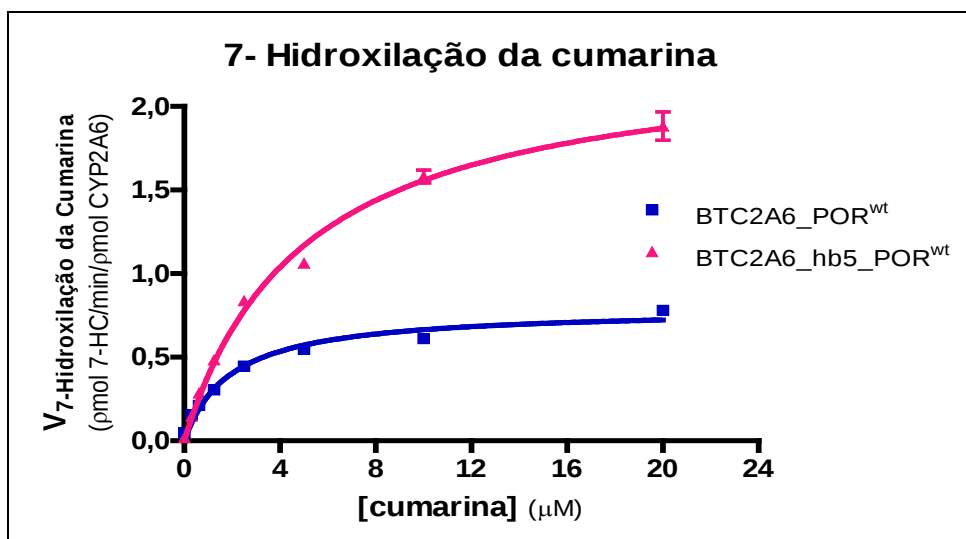


Figura 3.13: Gráfico da velocidade de 7-hidroxilação da cumarina em função da concentração de cumarina. [7-HC: 7-hidroxycumarina]

Nos ensaios com a adição dos grupos prostéticos, FAD e FMN, foi possível verificar que as estirpes com as alterações Y459H e Y181D na CYPOR recuperaram parcialmente a actividade do

CYP2A6 (Figura 3.14). A $V_{\text{máx}}$ aumentou aproximadamente em 53% e 23% para as estirpes BTC2A6_POR^{Y459H} e BTC2A6_POR^{Y181D}, respectivamente, e aproximadamente em 45% e 17% para as estirpes correspondentes que co-expressam b_5 . Relativamente à afinidade do CYP2A6 para o substrato (K_m), a recuperação foi de cerca de 62% para a BTC2A6_POR^{Y459H} e para a BTC2A6_POR^{Y181D} e de 53% para a BTC2A6_hb5_POR^{Y459H} e 34% para a BTC2A6_hb5_POR^{Y181D}. Os dados obtidos pelas estirpes correspondentes com a variante *wild-type* da CYPOR, foram usados como termo de comparação para as percentagens mencionadas acima (Figura 3.14).

A presença de b_5 parece causar alterações significativas quer na $V_{\text{máx}}$, que aumenta, quer na afinidade para o substrato que diminui pois a estirpe com b_5 ostenta um K_m mais elevado. A $V_{\text{máx}}$ e o K_m aumentaram em cerca de três vezes para a BTC2A6_hb5_POR^{wt} nos ensaios com e sem FAD, contudo apenas aumentaram em duas vezes no ensaio com FMN. Para as estirpes com b_5 e com as variantes Y459H e Y181D o aumento dos parâmetros referidos anteriormente foi de duas vezes excepto para a estirpe BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} na qual o K_m não se alterou (Figura 3.14).

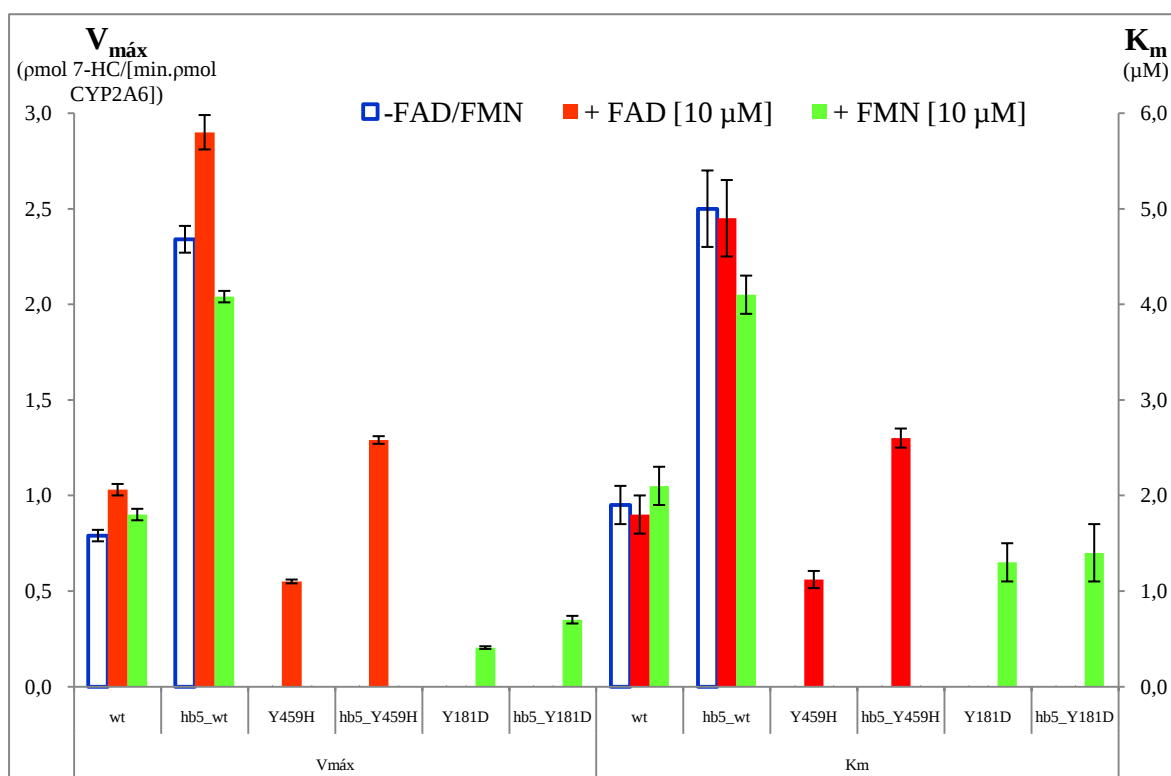


Figura 3.14: Histograma dos parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m para a reacção de 7-hidroxilação da cumarina, consoante as diferentes membranas com CYP2A6.

[branco: 7-Hidroxilação da cumarina sem FAD/FMN; vermelho: 7-hidroxilação da cumarina com FAD [10 μM]; verde: 7-Hidroxilação da cumarina com FMN [10 μM]; 7-HC: 7-hidroxycumarina; wt: BTC2A6_POR^{wt}; hb5_POR: BTC2A6_hb5_POR^{wt}; Y459H: BTC2A6_POR^{Y459H}; hb5_Y459H: BTC2A6_hb5_POR^{Y459H}; Y181D: BTC2A6_POR^{Y181D}; hb5_Y181D: BTC2A6_hb5_POR^{Y181D}.]

A eficácia da reacção diminui 11% para a estirpe com CYP2A6 combinada com a variante Y459H da CYPOR e 60% para a correspondente estirpe com a variante Y181D, relativamente à

estirpe BTC1A2_POR^{wt} (Figura 3.15). A presença de b_5 aparenta causar alterações na eficácia da reacção, que aumenta 1,2 e 1,6 vezes para a BTC2A6_hb5_POR^{wt} nas reacções de 7-hidroxilação da cumarina sem grupos prostéticos e com FMN respectivamente, contudo apenas aumentaram 3,5% na reacção com FMN (Anexos: Tabela 7.3). Para as estirpes com b_5 e com as variantes Y459H e Y181D o aumento da eficácia foi de 56% para a estirpe BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} na presença de FMN e apenas de 2% para a correspondente estirpe com a variante Y459H na presença de FAD (Figura 3.15).

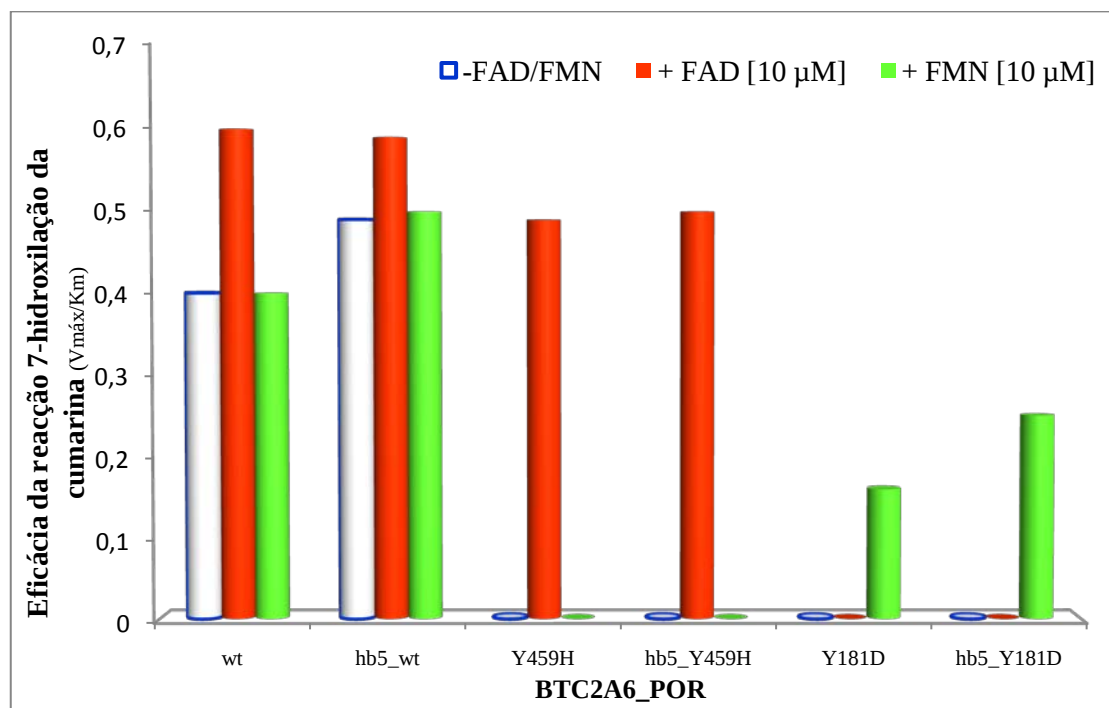


Figura 3.15: Histograma da eficácia da reacção ($V_{\text{máx}}/K_m$) de 7-hidroxilação da cumarina, consoante as diferentes membranas com CYP2A6.

[branco: 7-Hidroxilação da cumarina sem FAD/FMN; vermelho: 7-hidroxilação da cumarina com FAD [10 µM]; verde: 7-Hidroxilação da cumarina com FMN [10 µM]; wt: BTC2A6_POR^{wt}; hb5_POR: BTC2A6_hb5_POR^{wt}; Y459H: BTC2A6_POR^{Y459H}; hb5_Y459H: BTC2A6_hb5_POR^{Y459H}; Y181D: BTC2A6_POR^{Y181D}; hb5_Y181D: BTC2A6_hb5_POR^{Y181D}.]

4. Discussão

Com o presente estudo, pretendeu-se obter uma melhor compreensão do funcionamento do complexo enzimático do CYP, mais especificamente o efeito do b_5 neste complexo. Como foi anteriormente sugerido (Schenkman e Jansson, 2003), o b_5 pode exercer o seu efeito ao nível da transferência de electrões. Assim, foram estudadas duas variantes da CYPOR relacionadas com a Síndrome de Antley-Bixler, Y459H e Y181D, que estão debilitadas na ligação dos grupos prostéticos FAD e FMN, respectivamente, diminuindo a capacidade de transferência de electrões pela CYPOR (Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009). Recorrendo a um sistema bacteriano biplasmídico, as duas variantes foram combinadas separadamente com o b_5 e com o CYP1A2 ou CYP2A6. A escolha destes dois CYPs baseou-se em estudos anteriores deste grupo, que mencionavam que a presença de b_5 exerce um forte estímulo sobre a actividade catalítica do CYP2A6, e que o CYP1A2 aparenta uma relativa insensibilidade à presença desta proteína na sua actividade (Duarte *et al.*, 2007). Por conseguinte, foram usadas duas abordagens, a determinação da capacidade dos CYPs para bioactivar mutagénios e a determinação de dois parâmetros cinéticos destes dois CYPs, utilizando substratos padrão.

O sistema celular biplasmídico utilizado, *E.coli* K12 BTC-CYP (Duarte *et al.*, 2005b), é apropriado para efectuar a expressão heteróloga dos factores proteicos do complexo enzimático do CYP, devido ao facto da *E.coli* K12 (Kranendonk *et al.*, 1994) não possuir CYPs, possibilitando desta forma o estudo da actividade destas enzimas sem interferência de CYPs endógenos, como é o caso com outros sistemas celulares (Kranendonk *et al.*, 2000). Este sistema biplasmídico possibilita ainda obter razões molares CYPOR/CYP e b_5 /CYP mais próximas daquelas encontradas nos microssomas do fígado humano, um factor determinante para a actividade de um determinado CYP num dado tecido, fracção celular ou sistema celular com expressão heteróloga destas proteínas (Crespi e Miller, 1999; Kranendonk *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2005a; Im e Waskell, 2010). Outros estudos (Enoch e Strittmatter, 1979; Mokashi *et al.*, 2003; Guengerich, 2005a) demonstraram que a CYPOR se tinha mostrado capaz de reduzir o b_5 de forma tão eficiente como a sua reductase. Deste modo, como anteriormente publicado por este grupo (Duarte *et al.*, 2005a, 2007) não houve a necessidade de expressar a NADH-reductase do citocromo b_5 no sistema celular empregue. Os resultados obtidos na primeira parte deste trabalho visaram a validação do sistema bacteriano para o estudo do b_5 na actividade do CYP1A2 e CYP2A6. Devido a ter sido demonstrado, que nas bactérias, os rácios b_5 /CYP e CYPOR/CYP (Tabela 3.2) eram iguais ou muito próximos ao encontrado no fígado humano, 1,1[0,27-2,7] e 0,2[0,08-0,5] respectivamente (Paine *et al.*, 1997; Venkatakrisnan *et al.*, 2000), foi possível validar o sistema para a sua utilização no estudo das actividades dos CYPs.

O nível de expressão da CYPOR teve um decréscimo de cerca de 50% para as estirpes BTC1A2_hb5_POR^{wt} e de cerca de 20% para BTC2A6_hb5_POR^{wt}, relativamente às correspondentes estirpes sem *b*₅. Apesar do conteúdo em CYPOR sofrer diminuições quando esta proteína é co-expressa com o *b*₅, as razões CYPOR/CYP mantiveram-se iguais ou muito próximas ao encontrado no fígado humano. O decréscimo da expressão da CYPOR já foi referido por este grupo, tendo sido mais acentuado anteriormente, aproximadamente 80% (Duarte *et al.*, 2007). Estas diminuições menos acentuadas, obtidas com o sistema actual, deveram-se à alteração do modo de co-expressão, nomeadamente a passagem de um sistema bicistrónico para um sistema independente da CYPOR e *b*₅, no qual a expressão de cada cDNA fica sob regulação de um promotor *tac*. Foi verificado que a expressão das proteínas de forma policistrónica pode ser seriamente afectada pela posição em que se encontra o cDNA face ao promotor. De uma maneira geral, a expressão das proteínas vai diminuindo à medida que o seu cDNA vai sendo clonado mais a jusante do promotor, provavelmente devido à ocorrência de uma atenuação ao longo da transcrição do DNA ou da tradução do RNA (Cooper e Porter, 2001).

Os resultados obtidos no ensaio de redução do citocromo *c* (Figura 3.6) denotam claramente o efeito deletério que as variantes Y459H e Y181D exercem sobre a funcionalidade da CYPOR. Estes dados corroboram os resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo (Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009) e ainda por outros autores (Marohnic *et al.*, 2006; Dhir *et al.*, 2007; Fluck *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

O resultado da validação dos sistemas bacterianos comprova que este é apropriado para o estudo das actividades dos CYPs. Portanto prosseguiu-se para a primeira abordagem de resposta ao objectivo, que consistia na determinação da influência do *b*₅ sobre a capacidade dos CYPs para bioactivar mutagénios, e em especial na determinação do efeito que o *b*₅ pode ter na situação em que a capacidade da CYPOR para suportar a actividade catalítica dos CYPs se encontra comprometida. Para tal compararam-se as actividades mutagénicas de dois pré-genotóxicos para cada CYP (NNK e IQ para o CYP1A2 e NNK e NNdEA para o CYP2A6), obtidas com as estirpes BTC_CYP_POR e correspondentes estirpes que expressam *b*₅.

Estudos do grupo do Doutor Michael Waterman (Jenkins e Waterman, 1994; Jenkins *et al.*, 1997; Jenkins e Waterman, 1998, 1999) referem que os CYPs de mamíferos podem ter a sua actividade sustentada pela transferência de electrões por parte do sistema redox da *E.coli*, nomeadamente o flavodoxina/ flavodoxina reductase (Fld/FdR). Também num estudo publicado pelo nosso grupo (Kranendonk *et al.*, 2008), no qual se utilizou o sistema biplasmídico *E.coli* K12 BTC-CYP, supôs-se que a actividade do CYP1A2 na ausência da CYPOR teria sido sustentada pelo Fld/FdR. Outra possível via de transferência electrónica para os CYPs é, na ausência da NADH-reductase do citocromo *b*₅, a combinação da CYPOR com o *b*₅. Nesta via a transferência do primeiro electrão fica a cargo da CYPOR, podendo o segundo electrão, necessário ao funcionamento do ciclo catalítico do CYP, ser doado pelo *b*₅ (Enoch e Strittmatter, 1979), uma vez

que as diferenças de potencial médio de redução impossibilitam esta proteína de fornecer o primeiro electrão (Schenkman e Jansson, 2003). Deste modo, a actividade dos CYPs no sistema biplasmídico deste trabalho pode ser suportada por várias vias de transferência electrónica, como evidenciado na Figura 4.1.

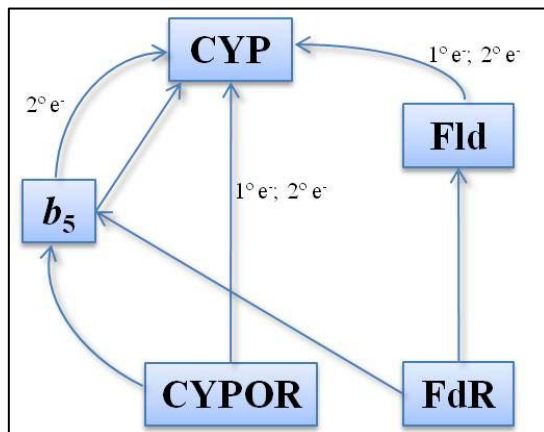


Figura 4.1: Possíveis vias de transferência electrónica na BTC_CYP_POR e BTC_CYP_hb5_POR.

Foi demonstrado neste estudo (Figura 3.8; Figura 3.9; Anexos: Tabela 7.1) que os CYPs nas estirpes sem CYPOR têm capacidade de bioactivar compostos, excepto na estirpe BTC2A6_POR^{null} com o composto NNK. Esta capacidade de bioactivação, na ausência de CYPOR, pode ser explicada por o Fld/FdR ter capacidade de sustentar a actividade do CYP1A2 e CYP2A6 (Figura 4.1), mas a sua eficiência depende do substrato.

Os resultados obtidos com as estirpes com CYP1A2, sem b_5 e com as variantes Y459H ou Y181D demonstraram que a actividade deste CYP para bioactivar o IQ foi diminuída em aproximadamente 50% e 80%, respectivamente (Figura 3.8: comparação entre o bloco de dados 1 vs 3 e 1 vs 5), relativamente à BTC1A2_POR^{wt}. Esta diminuição evidencia o efeito negativo que estas variantes da CYPOR têm na actividade do CYP1A2, confirmando os resultados obtidos anteriormente por este grupo (Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009). Contudo, a variante Y181D apresentou um valor de bioactivação do IQ semelhante ao da estirpe BTC1A2_POR^{null} (Figura 3.8: 5 vs 7) em que os seus níveis de bioactivação foram considerados níveis basais, aparentando que a variante Y181D da CYPOR tem um efeito mais prejudicial na actividade do CYP1A2, do que a variante Y459H (Figura 3.8: 1 vs 3; 1 vs 5; 1 vs 7).

Comparando os resultados da bioactivação do IQ na presença e ausência de b_5 , as estirpes BTC1A2_hb5_POR^{wt} ($p < 0,01$), BTC1A2_hb5_POR^{Y459H} ($p < 0,01$) e BTC1A2_hb5_POR^{Y181D} ($p < 0,001$) (Figura 3.8: 1 vs 2; 2 vs 3; 4 vs 5) revelaram que o CYP1A2 é aparentemente sensível na bioactivação do IQ à presença de b_5 . Tomando em conta a sugestão que o b_5 e a CYPOR competem pelo mesmo sítio de ligação ao CYP (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Im e Waskell, 2010) e que o b_5 demonstrou um efeito mais estimulatório na estirpe com a variante Y181D da CYPOR

relativamente à variante Y459H, podemos supor que a afinidade para o CYP é menor com a CYPOR-Y181D do que com a CYPOR-Y459H.

Os nossos resultados demonstraram que na presença de b_5 a bioativação aumentou (Figura 3.8: 7 vs 8) nas estirpes com CYP1A2 e sem CYPOR, cuja bioativação deve ter sido sustentada pelo sistema Fld/FdR. Foi sugerido anteriormente por outros autores (Enoch e Strittmatter, 1979; Zhang *et al.*, 2007) que o b_5 é capaz de reduzir o CYP, sendo da sua competência a transferência do segundo electrão no ciclo catalítico do CYP. Para o efeito o b_5 tem que estar reduzido, pelo que os nossos resultados parecem indicar a ocorrência desta redução através do sistema Fld/FdR. Foi confirmado por nós (dados não mostrados) que o b_5 se encontra no seu estado ferroso nas estirpes com ausência de CYPOR.

A BTC1A2_hb5_POR^{wt} não demonstrou aumento da bioativação do IQ, relativamente à correspondente estirpe sem b_5 , no entanto o CYP1A2 teve a sua actividade aproximadamente duplicada com a estirpe BTC1A2_hb5_POR^{null} (Figura 3.8: 1 vs 2; 7 vs 8). Tal como outros autores observaram (Zhang *et al.*, 2007) o b_5 e a CYPOR competem pelo mesmo sítio de ligação ao CYP, logo na ausência da CYPOR (1º electrão transferido pelo Fld/FdR (Figura 4.1)), o b_5 não tem de competir para se ligar ao CYP e desta forma consegue mais facilmente transferir o segundo electrão. Estes dados também indicam que o b_5 é capaz de transferir o segundo electrão mais eficientemente do que a CYPOR, levando ao aumento da bioativação pelo CYP1A2. Estes dados corroboram o que sugerido anteriormente (Schenkman e Jansson, 2003), que indicava como um dos possíveis mecanismos de estimulação da actividade dos CYPS a mais rápida transferência do segundo electrão pelo b_5 , tendo esta hipótese sido comprovada por outros estudos (Im e Waskell, 2010).

Os valores da bioativação do NNK diminuíram substancialmente nas estirpes com CYP1A2, sem b_5 e com as variantes Y459H ($\approx 53\%$) e Y181D ($\approx 90\%$) da CYPOR, relativamente à BTC1A2_POR^{wt} (Figura 3.8: 1 vs 3; 1 vs 5). Estes resultados confirmam a diminuição da actividade do CYP1A2 bioactivar o IQ, como anteriormente descrito para as estirpes com CYPOR-Y459H e CYPOR-Y181D, salientando um efeito mais prejudicial para a actividade do CYP1A2 quando sustentado com a variante Y181D da CYPOR, relativamente à CYPOR-Y459H, levando-a a níveis basais (Figura 3.8: 1 vs 3; 1 vs 5; 1 vs 7).

A actividade do CYP1A2 na bioativação do NNK aumentou em todas as estirpes na presença de b_5 . Os resultados revelaram aumentos de cerca de 2,5 vezes na BTC1A2_hb5_POR^{wt} (Figura 3.8: 1 vs 2), de 3,0 vezes quando sustentado com a variante Y459H (Figura 3.8: 3 vs 4) e de $\approx 8,0$ vezes com a variante Y181D da CYPOR (Figura 3.8: 5 vs 6), comparativamente às suas correspondentes estirpes sem b_5 . Estes dados e como anteriormente sugerido (bioativação do IQ) corroboram a hipótese de que o b_5 é mais eficiente na competição com a CYPOR-Y181D devido à menor afinidade desta variante para o CYP1A2, relativamente as estirpes com a variante Y459H.

Os resultados da bioactivação do CYP1A2 na estirpe BTC1A2_hb5_POR^{wt} demonstraram que o b_5 não aparenta causar efeito na bioactivação do IQ, no entanto na bioactivação do NNK o efeito do b_5 é substancialmente estimulatório (Figura 3.8: 1 vs 2). Estes dados demonstram que, na presença do mesmo CYP, o b_5 tem diferentes efeitos mediante o composto que é metabolizado, tal como foi referido por outros (Mokashi *et al.*, 2003; Yamaori *et al.*, 2003).

Assim, os resultados provenientes da bioactivação do NNK e do IQ pelo CYP1A2 parecem demonstrar que o b_5 tem um efeito estimulatório dependente do substrato metabolizado e que a sua eficiência na competição é maior com a variante Y181D, devido à hipótese da menor afinidade desta para com o CYP.

O sistema Fld/FdR também revelou capacidade para sustentar a actividade do CYP2A6. Facto que é explícito nos resultados da bioactivação do NNdEA, que demonstraram valores iguais ou semelhantes nas estirpes BTC2A6_POR^{wt} e BTC2A6_POR^{null} (Figura 3.9: 1 vs 7), indicando que o sistema bacteriano Fld/FdR é eficiente para sustentar a bioactivação deste mutagénio pelo CYP2A6.

Contrariamente ao constatado com o CYP1A2, nos resultados com o CYP2A6 foi possível observar que na presença da variante Y181D da CYPOR a actividade da bioactivação do NNdEA é maior ($\approx 80\%$ da actividade BTC2A6_POR^{wt}) do que na presença da variante Y459H ($\approx 20\%$ da actividade BTC2A6_POR^{wt}) (Figura 3.9: 1 vs 3; 1 vs 5). Estes dados, em que o Fld/FdR tem capacidade para sustentar o CYP2A6 e que a actividade do CYP é menos afectada pela variante Y181D, parecem sugerir que a CYPOR e a Fld/FdR competem pelo mesmo sítio de ligação ao CYP.

Similarmente ao que se observou com o CYP1A2, a CYPOR-Y459H compete mais eficazmente com o b_5 pelo CYP2A6, do que a CYPOR-Y181D. Deste modo verifica-se um aumento mais acentuado da bioactivação de NNdEA para a BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} (≈ 13 vezes) do que para a BTC2A6_hb5_POR^{Y459H} (8 vezes), relativamente às correspondentes estirpes sem b_5 (Figura 3.9: 3 vs 4; 5 vs 6). A bioactivação de NNdEA mediada pelo CYP2A6, na presença de b_5 , atinge níveis semelhantes aos verificados quando na ausência da CYPOR ou quando na presença da variante Y181D da CYPOR (Figura 3.9: 6 vs 8).

O facto de na presença de b_5 a variante Y459H da CYPOR ter uma maior bioactivação do NNdEA (8 vezes) do que a CYPOR-*wild type* (3 vezes), comparativamente com as correspondentes estirpes sem b_5 (Figura 3.9: 1 vs 2; 3 vs 4), pode efectivamente indicar uma afinidade mais baixa do CYPOR-Y459H para o CYP2A6, em relação à CYPOR-*wild type*. Estes dados são contraditórios aos do CYP1A2, onde se encontraram níveis semelhantes de bioactivação pelo CYP quando sustentado pelas variante Y459H e *wild type*. Assumindo que o b_5 é mais eficientemente mantido reduzido quando na presença da CYPOR-Y459H do que quando na presença da CYPOR-*wild type*, pode ser explicada pela FdR ter uma maior capacidade de reduzir o b_5 , havendo uma maior quantidade de b_5 reduzido disponível para actuar.

A bioactivação do NNK pelo CYP2A6 mostrou-se ser mais sensível à presença de b_5 do que a bioactivação do NNdEA (Figura 3.9: 1 vs 2). Os resultados provenientes da bioactivação do NNK mediado pelo CYP2A6 vão de encontro com a hipótese de que o b_5 tem uma maior eficácia na competição pelo CYP quando sustentado com a variante Y181D. Isto porque o aumento da bioactivação do NNK foi mais acentuado para a estirpe BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} ($p < 0,0001$ em relação a BTC2A6_POR^{Y181D}) do que na estirpe com a variante Y459H (Figura 3.9: 3 vs 4; 5 vs 6).

Os dados provenientes da bioactivação do NNK pelo CYP2A6 estão em concordância com a hipótese da variante Y181D da CYPOR apresentar menos afinidade na interacção com o CYP. Isto é, a BTC2A6_POR^{wt} e a BTC2A6_POR^{Y459H} tiveram níveis semelhantes de bioactivação do NNK, sendo a bioactivação mais elevada para a estirpe BTC2A6_POR^{Y181D} ($p < 0,0001$ em relação a BTC2A6_POR^{wt}) (Figura 3.9: 1 vs 3; 1 vs 5). Podemos postular que a Fld parece assemelhar-se funcionalmente com o b_5 , isto é, parece ter a capacidade de mimetizar as funções exercidas pelo b_5 , tornando-se evidente porque a bioactivação do NNK pelo CYP2A6 e pelo CYP1A2 se ter revelado muito sensível à presença de b_5 . A bioactivação do NNK pelo CYP2A6 é tão dependente do b_5 que nem mesmo a Fld consegue sustentar a bioactivação, pensando ser esta a razão de na estirpe BTC2A6_POR^{null} não ter sido detectada bioactivação (Figura 3.9: 7). No entanto, o b_5 em conjunto com a Fld, na ausência da CYPOR, demonstraram ser capazes de bioactivar o NNK até níveis semelhantes ao da bioactivação com a BTC2A6_hb5_POR^{wt} (Figura 3.9: 2 vs 8).

Os resultados obtidos na determinação da capacidade do CYP1A2 e do CYP2A6 para bioactivar mutagénios demonstraram que o CYP1A2 é relativamente insensível à presença de b_5 e que o efeito do b_5 na actividade de um CYP varia mediante o substrato metabolizado. Foi também demonstrado que o b_5 tem uma maior eficácia na competição pelo CYP quando em presença da CYPOR-Y181D, parecendo que CYPOR com esta variante tem uma menor afinidade na interacção com o CYP.

A primeira abordagem para responder ao objectivo do presente estudo visava estudar a capacidade dos CYPs bioactivarem mutagénios. Esta capacidade é expressa em actividade mutagénica (revertentes por quantidade de pré-genotóxico) que é directamente proporcional à eficácia da reacção enzimática ($V_{\text{máx}}/K_m$) do CYP. Assim sendo, os resultados da segunda abordagem do presente estudo, que se baseou na determinação de dois parâmetros cinéticos, permitem analisar a eficácia da reacção através da velocidade máxima da reacção ($V_{\text{máx}}$) e da afinidade aparente do CYP para o substrato (K_m), parâmetros que definem a reacção enzimática. Para esta determinação foram realizados ensaios enzimáticos com preparações membranares das estirpes BTCCYP_POR e BTCCYP_hb5_POR, utilizando substratos padrão que são desalquilados (metoxioresorufina pelo CYP1A2) ou hidroxilados (cumarina pelo CYP2A6), gerando produtos fluorescentes que permitem a sua fácil detecção (Duarte *et al.*, 2007).

A adição dos grupos prostéticos (FAD e FMN) aos ensaios enzimáticos teve como intuito recuperar a capacidade das variantes da CYPOR para suportar a actividade catalítica do CYP

(Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009) e restaurar os grupos prostéticos possivelmente perdidos durante o processo de extracção das fracções membranares. As concentrações utilizadas de FMN e FAD foram em excesso, tomando em conta a afinidade aparente demonstrada pelas variantes Y459H e Y181D da CYPOR para estes grupos prostéticos (Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009). Deste modo, os resultados foram comparados no que concerne à presença do mesmo grupo prostético.

As membranas com CYP1A2 ou CYP2A6 na ausência ou presença de b_5 sem CYPOR não foram capazes de sustentar a actividade catalítica destes CYPs (Anexos: Tabela 7.2; Tabela 7.3). Contudo, com a adição dos grupos prostéticos a actividade catalítica do CYP1A2 (Anexos: Tabela 7.2) e do CYP2A6 (Anexos: Tabela 7.3), quando sustentada com a CYPOR-Y459H, recuperou 86% da actividade da CYPOR *wild-type*. Com a variante Y181D a recuperação foi mais acentuada nas membranas com CYP1A2 (65%) do que com o CYP2A6 (37%) (Figura 3.11; Figura 3.14). Nas membranas com b_5 a adição dos grupos prostéticos permitiu que fosse recuperada em 71% quando sustentada com as variantes Y459H e Y181D da CYPOR tende a actividade do CYP2A6 apresentado uma maior recuperação nas membranas da estirpe BTC2A6_hb5_POR^{Y459H} (88%) do que nas da BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} (58%) (Figura 3.11; Figura 3.14). Estes resultados demonstram que a recuperação foi menor nas membranas com CYPOR-Y181D do que com a CYPOR-Y459H, o que leva a crer que a variante Y181D da CYPOR tenha um efeito mais debilitador para suportar a actividade destes CYPs.

A reacção de MROD mediada pelo CYP1A2 parece não ser especialmente afectada pela presença do b_5 , visto que a eficácia da reacção com a CYPOR *wild-type* não se alterou consensualmente, aumentando 25% (sem grupos prostéticos), 10% (com FAD) e diminuindo em 3% (com FMN) (Figura 3.11). Por outro lado, o b_5 não demonstra um efeito notório na eficácia da reacção nem mesmo após a adição dos grupos prostéticos às variantes da CYPOR Y459H e Y181D, pois nas membranas com a variante Y459H a presença de b_5 diminui a eficácia em 19% e aumenta em 10% com a variante Y181D.

A reacção de 7- hidroxilação da cumarina medida pelo CYP2A6 parece mais sensível à presença de b_5 , uma vez a eficácia da reacção da BTC2A6_hb5_POR^{wt} aumentar 19%, 4% e 16% nas reacções sem adição de grupos prostéticos, com FAD ou com FMN, respectivamente (Figura 3.14; Anexos: Tabela 7.3). A eficácia da reacção também aumentou nas membranas em que os CYPs são sustentados com as CYPORs debilitadas, no entanto o aumento foi mais acentuado na BTC2A6_hb5_POR^{Y181D} (56%) do que com a variante Y459H (2%), comparativamente às correspondentes estirpes sem b_5 (Tabela 7.3; Figura 3.14). Assim sendo, tal como anteriormente demonstrado com os resultados da bioactivação pelo CYP2A6, o b_5 aparenta ter um efeito estimulatório mais significativo com a variante Y181D da CYPOR, relativamente à CYPOR-Y459H.

Os dados relativos aos ensaios enzimáticos das estirpes com CYP1A2 e CYP2A6 demonstram que o CYP2A6 é mais sensível à presença de b_5 corroborando os resultados obtidos anteriormente num estudo deste grupo (Duarte *et al.*, 2007) e outros estudos (Yamaori *et al.*, 2003), que referiram que o b_5 tinha diferentes efeitos mediante o CYP presente, porém os efeitos observados são dependentes da razão CYPOR/CYP (Yamazaki *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2007). A variante Y181D da CYPOR é mais sensível à presença de b_5 , sendo que a influência do b_5 na actividade catalítica do CYP1A2 e CYP2A6 é ao nível da velocidade da reacção devido às maiores alterações na $V_{\text{máx}}$ da reacção e menores no K_m .

5. Conclusão

Em suma os resultados apresentados nas duas abordagens de resposta ao objectivo corroboram outros estudos, revelando ainda novos dados que nos permitem uma melhor compreensão do funcionamento do complexo enzimático do CYP, mais especificamente o efeito do b_5 neste complexo. Os resultados da bioactivação de compostos genotóxicos revelaram a capacidade dos CYPs bioactivarem na ausência da CYPOR, o que pode ser explicada pelo sistema Fld/FdR ter capacidade para sustentar a actividade dos CYPs, corroborando o que outros autores tinham descrito anteriormente (Jenkins e Waterman, 1999). O Fld/FdR pode sustentar a actividade do CYP pelo facto da flavodoxina ser uma proteína de ligação ao FMN semelhante ao domínio de ligação FMN da CYPOR, para além disso a reductase da flavodoxina é semelhante ao terminal carboxilo que liga o FAD ao NADPH na CYPOR (Porter e Kasper, 1986; Ostrowski *et al.*, 1989; Karplus *et al.*, 1991). Apesar dos resultados da bioactivação deste estudo demonstrarem que o Fld/FdR é capaz de sustentar actividade dos CYPs, os resultados dos ensaios enzimáticos não nos permitem observar o mesmo. Esta divergência de resultados pode ser explicada pelo facto de nas fracções membranares, com as quais são realizados os ensaios enzimáticos, não existir o Fld/FdR, visto serem proteínas citosólicas. Numa perspectiva futura deverão ser realizados ensaios enzimáticos aos quais se adicionará fracções citosólicas (Fld/FdR), confirmando que este sistema é capaz de sustentar a actividade dos CYPs. Os resultados demonstraram que a CYPOR e o Fld/FdR parecem competir pelo mesmo sítio de ligação ao CYP. Sendo este facto apoiado por, como anteriormente mencionado, a CYPOR e o Fld/FdR serem homologas estruturalmente e ambas capazes de sustentar a actividade do CYP.

Os resultados dos ensaios enzimáticos com os seus substratos padrão (desalquilação da metoxiresorufina e hidroxilação da cumarina) (Figura 3.11; Figura 3.14) e dos ensaios de bioactivação de três diferentes pré-carcinogénios, nomeadamente NNK, IQ e NNdEA (Figura 3.8; Figura 3.9) revelaram que tanto a variante Y459H como a Y181D da CYPOR comprometem seriamente a capacidade da CYPOR para suportar a actividade catalítica do CYP1A2 e do CYP2A6. Estes dados corroboram os já publicados noutros estudos deste grupo (Kranendonk *et al.*, 2008; Marohnic *et al.*, 2009) e ainda por outros autores (Marohnic *et al.*, 2006; Dhir *et al.*, 2007; Fluck *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). No entanto, a CYPOR com a variante Y181D demonstrou ter um efeito mais debilitador na actividade dos CYPs. O efeito mais negativo na actividade dos CYPs quando sustentada com esta variante é devido a uma alteração conformacional, provocada pela alteração do aminoácido neutro, a tirosina, por um aminoácido ácido, o aspartato, aparentemente causar uma menor afinidade entre a CYPOR e o CYP. A substituição do grupo fenol da tirosina pelo grupo ácido carboxílico da cadeia lateral do aspartato diminui a ligação do FMN com implicações para a incorporação do FMN, para o ciclo oxidação/redução e para as interacções

de acoplamento com a superfície dos CYPs. Deste modo, sugere-se que a tirosina na posição 181 (Y181) está envolvida na correcta ligação do FMN à CYPOR e nas interacções proteicas entre CYPOR e CYP. A substituição da tirosina pelo aspartato causa uma diminuição da ligação do FMN à CYPOR, diminuindo a transferência de electrões para o CYP, que por sua vez demonstra uma menor afinidade, assumindo assim que o FMN faz parte das interacções proteicas entre a CYPOR e o CYP, como já pressuposto por este grupo (Marohnic *et al.*, 2009). No modelo de funcionamento da CYPOR, que assume duas conformações, aberta e fechada, a redução do FMN supostamente inicia o rearranjo conformacional da CYPOR, como anteriormente descrito (Aigrain *et al.*, 2009; Hamdane *et al.*, 2009). Por outro lado, a falta da ligação do FMN, leva à não alteração da conformação fechada para aberta, não transferindo os electrões para o CYP devido à interacção da estrutura dinâmica CYPOR-CYP apenas ocorrer quando a CYPOR se encontra na conformação aberta.

O b_5 tem um efeito estimulatório na actividade catalítica do CYP1A2 e do CYP2A6 no entanto esse efeito aparenta ser maior no CYP2A6 revelando que a actividade deste CYP tem uma maior dependência da presença de b_5 . Nos ensaios enzimáticos não foi tão notório o efeito estimulador do b_5 porque, como mencionado anteriormente, o b_5 necessita de estar reduzido para poder actuar. A redução do b_5 não esta assegurada porque a CYPOR encontra-se debilitada, comprometendo o seu efeito não só na actividade do CYP como na sua capacidade para reduzir o b_5 , e porque nestes ensaios não esta presente a FdR (proteína citosólica), que comprovou ter grande capacidade para reduzir o b_5 .

Apesar da diminuição do nível da expressão da CYPOR nas estirpes que co-expressam o b_5 , esta diminuição aparentemente é de menor importância, pois a razão encontra-se dentro do encontrado em microssomas do fígado humano. No entanto, a diminuição da CYPOR expressa nas estirpes com CYP1A2 é mais acentuada do que nas com CYP2A6, podendo eventualmente traduzir a menor actividade do CYP1A2 em relação ao CYP2A6. O efeito do b_5 também varia consoante o substrato que é metabolizado, tendo-se mostrado mais sensível na bioactivação do NNK. Estas constatações corroboram o que outros estudos afirmavam (Mokashi *et al.*, 2003; Yamaori *et al.*, 2003), sendo que o tipo de efeito do b_5 sobre a actividade catalítica nos CYPs está dependente da forma do CYP e do substrato.

Os dados deste estudo admitem que a CYPOR e o b_5 competem pelo mesmo sítio de ligação ao CYP, tal como outros estudos tinham publicado (Zhang *et al.*, 2007; Im e Waskell, 2010) para o CYP2B4. Por outro lado, o facto de o b_5 ter um efeito mais estimulatório quando a actividade do CYP é sustentada com a CYPOR-Y181D reforça a hipótese que a afinidade da variante Y181D da CYPOR para o CYP é menor que na variante Y459H e *wild-type*. Deste modo, podemos sugerir que o FMN não só contribui para o processo redox, mas também para alcançar uma correcta interacção proteína-proteína, como foi demonstrado no fotosistema I da *Anabaena* (Frago *et al.*, 2010).

Na ausência da CYPOR, o b_5 só concorre para a cedência do segundo electrão necessário para a catálise do CYP com o sistema Fld/FdR, conduzindo ao aumento da bioactivação. Por outro lado, os resultados demonstraram que a eficácia da reacção aumenta por consequência do aumento da $V_{\text{máx}}$ ser mais acentuado do que o aumento da afinidade aparente do CYP para o substrato ($1/K_m$). Devido ao potencial redox do CYP no estado oxiferoso se tornar mais favorável para que se verifique a transferência de um electrão por parte do b_5 quando está no estado ferroso isto é, do segundo electrão (Schenkman e Jansson, 2003). Deste modo, é possivelmente a passagem do segundo electrão pelo b_5 que leva ao aumento da actividade do CYP. Assim sendo, o mecanismo de estimulação do b_5 parece ser devido à mais rápida transferência do segundo electrão pelo b_5 para o CYP, que confirma outros autores (Schenkman e Jansson, 2003; Im e Waskell, 2010). Por outro lado, devido à transferência do segundo electrão pelo b_5 ser mais rápida do que a taxa de libertação do superóxido (desacoplamento), causa uma diminuição do desacoplamento permitindo assim que mais produto se forme, tornando a reacção mais eficiente.

Futuramente pretende realizar-se ensaios enzimáticos na presença do sistema Fld/FdR, permitindo que o b_5 esteja permanentemente no seu estado ferroso, para exercer o seu efeito competitivo para o CYP. Assim, estes dados levam a um melhor conhecimento da Síndrome de Antley-Bixler, podendo vir a auxiliar na resolução de problemática clínica, devido ao b_5 exercer efeitos na actividade dos CYPs. A aplicação destes conhecimentos na via terapêutica, pode atenuar alterações na esteroideogénese e na sensibilidade a fármacos devido à menor actividade dos CYPs, ou pela via da manipulação genética que permite aos portadores de mutações nos dois alelos metabolizarem substratos.

6. Bibliografía

- Adachi, M., Asakura, Y., Tachibana, K. and Shackleton, C. 2004. Abnormal steroidogenesis in three patients with Antley-Bixler syndrome: apparent decreased activity of 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase and 21-hydroxylase. *Pediatr Int* 46(5): 583-9.
- Agrawal, V., Huang, N. and Miller, W. L. 2008. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenetics and Genomics* 18(7): 569-576.
- Aigrain, L., Pompon, D., Morera, S. and Truan, G. 2009. Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *Embo Reports* 10(7): 742-747.
- Akhtar, M. K., Kelly, S. L. and Kaderbhai, M. A. 2005. Cytochrome b(5) modulation of 17 α hydroxylase and 17-20 lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. *Journal of Endocrinology* 187(2): 267-274.
- Altuve, A., Wang, L., Benson, D. R. and Rivera, M. 2004. Mammalian mitochondrial and microsomal cytochromes b(5) exhibit divergent structural and biophysical characteristics. *Biochem Biophys Res Commun* 314(2): 602-9.
- Antley, R. and Bixler, D. 1975. Trapezoidocephaly, midfacial hypoplasia and cartilage abnormalities with multiple synostoses and skeletal fractures. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11(2): 397-401.
- Arlt, W., Walker, E. A., Draper, N., Ivison, H. E., Ride, J. P., Hammer, F., Chalder, S. M., Borucka-Mankiewicz, M., Hauffa, B. P., Malunowicz, E. M., Stewart, P. M. and Shackleton, C. H. L. 2004. Congenital adrenal hyperplasia caused by mutant P450 oxidoreductase and human androgen synthesis: analytical study. *Lancet* 363(9427): 2128-2135.
- Barnes, H. J., Arlotto, M. P. and Waterman, M. R. 1991. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13): 5597-601.
- Bauer, S. and Shiloach, J. 1974. Maximal exponential-Growth rate and yield of *Escherichia coli* obtainable in a bench-scale fermentor. *Biotechnology and Bioengineering* 16(7): 933-941.
- Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R. and Mayer, R. T. 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 48(5): 923-36.
- Chauret, N., Gauthier, A. and Nicoll-Griffith, D. A. 1998. Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 26(1): 1-4.
- Clarke, T. A., Im, S. C., Bidwai, A. and Waskell, L. 2004. The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b5 in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis. *J Biol Chem* 279(35): 36809-18.
- Cooper, M. T. and Porter, T. D. 2000. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. *Mutat Res* 454(1-2): 45-52.
- Cooper, M. T. and Porter, T. D. 2001. Cytochrome b(5) coexpression increases the CYP2E1-dependent mutagenicity of dialkyl nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 484(1-2): 61-8.
- Crespi, C. L. and Miller, V. P. 1999. The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes--state of the art and prospects for the future. *Pharmacol Ther* 84(2): 121-31.
- Crudden, G., Chitti, R. E. and Craven, R. J. 2006. Hpr6 (heme-1 domain protein) regulates the susceptibility of cancer cells to chemotherapeutic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316(1): 448-455.
- Dhir, V., Ivison, H. E., Krone, N., Shackleton, C. H., Doherty, A. J., Stewart, P. M. and Arlt, W. 2007. Differential inhibition of CYP17A1 and CYP21A2 activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P. *Mol Endocrinol* 21(8): 1958-68.

- Dhir, V., Ivison, H. E., Krone, N., Shackleton, C. H. L., Doherty, A. J., Stewart, P. M. and Arlt, W. 2007. Differential inhibition of CYP17A1 and CYP21A2 activities by the P450 oxidoreductase mutant A287P. *Molecular Endocrinology* 21(8): 1958-1968.
- Ding, X. and Kaminsky, L. S. 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 149-73.
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Gilep, A. A., Laires, A., Oliveira, J. S., Usanov, S. A., Rueff, J. and Kranendonk, M. 2005a. 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. *Mutagenesis* 20(2): 93-100.
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Gilep, A. A., Laires, A., Oliveira, J. S., Usanov, S. A., Rueff, J. and 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. (2005) *Mutagenesis* 20, 93-100). *Mutagenesis* 22(1): 75-81.
- Duarte, M. P., Palma, B. B., Laires, A., Oliveira, J. S., Rueff, J. and Kranendonk, M. 2005b. *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(3): 199-208.
- Durr, U. H. N., Waskell, L. and Ramamoorthy, A. 2007. The cytochromes P450 and b(5) and their reductases - Promising targets for structural studies by advanced solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1768(12): 3235-3259.
- Durr, U. H. N., Yamamoto, K., Im, S. C., Waskell, L. and Ramamoorthy, A. 2007. Solid-state NMR reveals structural and dynamical properties of a membrane-anchored electron-carrier protein, cytochrome b(5). *Journal of the American Chemical Society* 129(21): 6670-6671.
- Ellis, J., Gutierrez, A., Barsukov, I. L., Huang, W. C., Grossmann, J. G. and Roberts, G. C. 2009. Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J Biol Chem* 284(52): 36628-37.
- Enoch, H. G. and Strittmatter, P. 1979. Cytochrome b5 reduction by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* 254(18): 8976-81.
- Fernandez-Salguero, P., Hoffman, S. M., Cholerton, S., Mohrenweiser, H., Raunio, H., Rautio, A., Pelkonen, O., Huang, J. D., Evans, W. E., Idle, J. R. and et al. 1995. A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. *Am J Hum Genet* 57(3): 651-60.
- Fisher, C. W., Caudle, D. L., Martin-Wixtrom, C., Quattrochi, L. C., Tukey, R. H., Waterman, M. R. and Estabrook, R. W. 1992b. High-level expression of functional human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*. *FASEB J* 6(2): 759-64.
- Fluck, C. E., Mullis, P. E. and Pandey, A. V. 2010. Reduction in hepatic drug metabolizing CYP3A4 activities caused by P450 oxidoreductase mutations identified in patients with disordered steroid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 401(1): 149-53.
- Fluck, C. E., Nicolo, C. and Pandey, A. V. 2007. Clinical, structural and functional implications of mutations and polymorphisms in human NADPH P450 oxidoreductase. *Fundam Clin Pharmacol* 21(4): 399-410.
- Frago, S., Lans, I., Navarro, J. A., Hervas, M., Edmondson, D. E., De la Rosa, M. A., Gomez-Moreno, C., Mayhew, S. G. and Medina, M. 2010. Dual role of FMN in flavodoxin function: electron transfer cofactor and modulation of the protein-protein interaction surface. *Biochim Biophys Acta* 1797(2): 262-71.
- Friedberg, T., Pritchard, M. P., Bandera, M., Hanlon, S. P., Yao, D., McLaughlin, L. A., Ding, S., Burchell, B. and Wolf, C. R. 1999. Merits and limitations of recombinant models for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: An intralaboratory comparison. *Drug Metabolism Reviews* 31(2): 523-544.
- Fukami, M., Horikawa, R., Nagai, T., Tanaka, T., Naiki, Y., Sato, N., Okuyama, T., Nakai, H., Soneda, S., Tachibana, K., Matsuo, N., Sato, S., Homma, K., Nishimura, G., Hasegawa, T. and Ogata, T. 2005. Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler

- syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1): 414-26.
- Ghotbi, R., Christensen, M., Roh, H. K., Ingelman-Sundberg, M., Aklillu, E. and Bertilsson, L. 2007. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *European Journal of Clinical Pharmacology* 63(6): 537-546.
- Gonzalez, F. J. and Korzekwa, K. R. 1995. Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 369-90.
- Guengerich, F. P. 2001. Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 488(3): 195-209.
- Guengerich, F. P. 2004. Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug Metab Rev* 36(2): 159-97.
- Guengerich, F. P. 2005. Human Cytochrome P450 Enzymes Cytochrome P450 - structure, Mechanism, and Biochemistry. P. Montellano. New York, Cytochrome P450 - structure, Mechanism, and Biochemistry: 377-463.
- Guengerich, F. P. 2005a. Reduction of cytochrome b5 by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* 440(2): 204-11.
- Guengerich, F. P. 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8(1): E101-11.
- Guengerich, F. P. 2008. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21(1): 70-83.
- Guengerich, F. P., Martin, M. V., Sohl, C. D. and Cheng, Q. 2009. Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Nat Protoc* 4(9): 1245-51.
- Hamdane, D., Xia, C. W., Im, S. C., Zhang, H. M., Kim, J. J. P. and Waskell, L. 2009. Structure and Function of an NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase in an Open Conformation Capable of Reducing Cytochrome P450. *Journal of Biological Chemistry* 284(17): 11374-11384.
- Henderson, C. J., Otto, D. M., Carrie, D., Magnuson, M. A., McLaren, A. W., Rosewell, I. and Wolf, C. R. 2003. Inactivation of the hepatic cytochrome P450 system by conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 278(15): 13480-6.
- Holmans, P. L., Shet, M. S., Martin-Wixtrom, C. A., Fisher, C. W. and Estabrook, R. W. 1994. The high-level expression in *Escherichia coli* of the membrane-bound form of human and rat cytochrome b5 and studies on their mechanism of function. *Arch Biochem Biophys* 312(2): 554-65.
- Huang, N., Pandey, A. V., Agrawal, V., Reardon, W., Lapunzina, P. D., Mowat, D., Jabs, E. W., Van Vliet, G., Sack, J., Fluck, C. E. and Miller, W. L. 2005. Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 76(5): 729-49.
- Hubbard, P. A., Shen, A. L., Paschke, R., Kasper, C. B. and Kim, J. J. 2001. NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. Structural basis for hydride and electron transfer. *J Biol Chem* 276(31): 29163-70.
- Hughes, A. L., Powell, D. W., Bard, M., Eckstein, J., Barbuch, R., Link, A. J. and Espenshade, P. J. 2007. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metabolism* 5(2): 143-149.
- Ikeya, K., Jaiswal, A. K., Owens, R. A., Jones, J. E., Nebert, D. W. and Kimura, S. 1989. Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene, and differences in liver 1A2 mRNA expression. *Mol Endocrinol* 3(9): 1399-408.
- Im, S. C. and Waskell, L. 2010. The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5). *Arch Biochem Biophys*.
- Ingelman-Sundberg, M. 2004. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci* 25(4): 193-200.
- Ingelman-Sundberg, M. 2005. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol* 207(2 Suppl): 52-6.

- Ivanov, A. S., Gnedenko, O. V., Molnar, A. A., Archakov, A. I. and Podust, L. M. 2010. FMN binding site of yeast NADPH-cytochrome P450 reductase exposed at the surface is highly specific. *ACS Chem Biol* 5(8): 767-76.
- Jalas, J. R., Hecht, S. S. and Murphy, S. E. 2005. Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. *Chem Res Toxicol* 18(2): 95-110.
- Jenkins, C. M., Genzor, C. G., Fillat, M. F., Waterman, M. R. and Gomez-Moreno, C. 1997. Negatively charged anabaena flavodoxin residues (Asp144 and Glu145) are important for reconstitution of cytochrome P450 17 α -hydroxylase activity. *J Biol Chem* 272(36): 22509-13.
- Jenkins, C. M. and Waterman, M. R. 1994. Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *J Biol Chem* 269(44): 27401-8.
- Jenkins, C. M. and Waterman, M. R. 1998. NADPH-flavodoxin reductase and flavodoxin from *Escherichia coli*: characteristics as a soluble microsomal P450 reductase. *Biochemistry* 37(17): 6106-13.
- Jenkins, C. M. and Waterman, M. R. 1999. Flavodoxin as a model for the P450-interacting domain of NADPH cytochrome P450 reductase. *Drug Metab Rev* 31(1): 195-203.
- Jiang, Z. W., Dalton, T. R., Jin, L., Wang, B., Tsuneoka, Y., Shertzer, H. G., Deka, R. and Nebert, D. W. 2005. Toward the evaluation of function in genetic variability: Characterizing human SNP frequencies and establishing BAC-transgenic mice carrying the human CYP1A1_CYP1A2 locus. *Human Mutation* 25(2): 196-206.
- Kalow, W. and Tang, B. K. 1991. Caffeine as a metabolic probe - Exploration of the enzyme - Inducing effect of cigarette - smoking. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 49(1): 44-48.
- Kamatani, T., Fujieda, M., Kiyotani, K., Iwano, S. and Kunitoh, H. 2005. Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 306-10.
- Kamatani, T., Fujita, K., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Miyamoto, M. and Ariyoshi, N. 2002. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: application of genetically engineered *Salmonella* expressing human CYP. *Drug Metab Rev* 34(3): 667-76.
- Karplus, P. A., Daniels, M. J. and Herriott, J. R. 1991. Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251(4989): 60-6.
- Ko, J. M., Cheon, C. K., Kim, G. H. and Yoo, H. W. 2009. A case of Antley-Bixler syndrome caused by compound heterozygous mutations of the cytochrome P450 oxidoreductase gene. *Eur J Pediatr* 168(7): 877-80.
- Kranendonk, M., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Fisher, C. W., Rueff, J., Estabrook, R. W. and Vermeulen, N. P. 1999a. *Escherichia coli* MTC, a human NADPH P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 2A6, 3A4, or 3A5: catalytic activities and mutagenicity studies. *Mutat Res* 441(1): 73-83.
- Kranendonk, M., Fisher, C. W., Roda, R., Carreira, F., Theisen, P., Laires, A., Rueff, J., Vermeulen, N. P. and Estabrook, R. W. 1999b. *Escherichia coli* MTC, a NADPH cytochrome P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450: comparison of three types of expression systems. *Mutat Res* 439(2): 287-300.
- Kranendonk, M., Laires, A., Rueff, J., Estabrook, W. R. and Vermeulen, N. P. 2000. Heterologous expression of xenobiotic mammalian-metabolizing enzymes in mutagenicity tester bacteria: an update and practical considerations. *Crit Rev Toxicol* 30(3): 287-306.
- Kranendonk, M., Marohnic, C. C., Panda, S. P., Duarte, M. P., Oliveira, J. S., Masters, B. S. and Rueff, J. 2008. Impairment of human CYP1A2-mediated xenobiotic metabolism by Antley-Bixler syndrome variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys* 475(2): 93-9.

- Kranendonk, M., Mesquita, P., Laires, A., Vermeulen, N. P. and Rueff, J. 1998. Expression of human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*: a system for biotransformation and genotoxicity studies of chemical carcinogens. *Mutagenesis* 13(3): 263-9.
- Kranendonk, M., Ruas, M., Laires, A. and Rueff, J. 1994. Isolation and prevalidation of an *Escherichia coli* tester strain for the use in mechanistic and metabolic studies of genotoxins. *Mutat Res* 312(2): 99-109.
- Laursen, T., Jensen, K. and Moller, B. L. 2010. Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochim Biophys Acta* 1814(1): 132-138.
- Lederer, F., Ghrir, R., Guiard, B., Cortial, S. and Ito, A. 1983. Two homologous cytochromes b5 in a single cell. *Eur J Biochem* 132(1): 95-102.
- LeeRobichaud, P., Kaderbhai, M. A., Kaderbhai, N., Wright, J. N. and Akhtar, M. 1997. Interaction of human CYP17 (P-450(17 alpha), 17 alpha-hydroxylase-17,20-lyase) with cytochrome b(5): Importance of the orientation of the hydrophobic domain of cytochrome b(5). *Biochemical Journal* 321: 857-863.
- Li, D. N., Pritchard, M. P., Hanlon, S. P., Burchell, B., Wolf, C. R. and Friedberg, T. 1999. Competition between cytochrome P-450 isozymes for NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase affects drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 289(2): 661-7.
- Liu, J., Ericksen, S. S., Besspiata, D., Fisher, C. W. and Szklarz, G. D. 2003. Characterization of substrate binding to cytochrome P450 1A1 using molecular modeling and kinetic analyses: case of residue 382. *Drug Metab Dispos* 31(4): 412-20.
- Liu, J., Ericksen, S. S., Sivaneri, M., Besspiata, D., Fisher, C. W. and Szklarz, G. D. 2004. The effect of reciprocal active site mutations in human cytochromes P450 1A1 and 1A2 on alkoxyresorufin metabolism. *Arch Biochem Biophys* 424(1): 33-43.
- Marohnic, C., Panda, S. P., McCammon, K., Rueff, J., Masters, B. S. and Kranendonk, M. 2009. Human Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency Caused by the Y181D Mutation: Molecular Consequences & Rescue of Defect. *Drug Metab Dispos*.
- Marohnic, C. C., Panda, S. P., Martasek, P. and Masters, B. S. 2006. Diminished FAD binding in the Y459H and V492E Antley-Bixler syndrome mutants of human cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 281(47): 35975-82.
- Miller, W. L. 2004. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis with multiple clinical manifestations. *Trends Endocrinol Metab* 15(7): 311-5.
- Mokashi, V., Li, L. and Porter, T. D. 2003. Cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 support the CYP2E1-mediated activation of nitrosamines in a recombinant Ames test. *Arch Biochem Biophys* 412(1): 147-52.
- Mulrooney, S. B., Meinhardt, D. R. and Waskell, L. 2004. The alpha-helical membrane spanning domain of cytochrome b(5) interacts with cytochrome P450 via nonspecific interactions. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1674(3): 319-326.
- Mulrooney, S. B. and Waskell, L. 2000. High-level expression in *Escherichia coli* and purification of the membrane-bound form of cytochrome b(5). *Protein Expr Purif* 19(1): 173-8.
- Nakajima, M., Itoh, M., Sakai, H., Fukami, T., Katoh, M., Yamazaki, H., Kadlubar, F. F., Imaoka, S., Funae, Y. and Yokoi, T. 2006. CYP2A13 expressed in human bladder metabolically activates 4-aminobiphenyl. *Int J Cancer* 119(11): 2520-6.
- Nakamura, K., Martin, M. V. and Guengerich, F. P. 2001. Random mutagenesis of human cytochrome p450 2A6 and screening with indole oxidation products. *Arch Biochem Biophys* 395(1): 25-31.
- Nishino, H. and Ishibashi, T. 2000. Evidence for requirement of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in the microsomal NADPH-sterol Delta 7-reductase system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374(2): 293-298.
- Ostrowski, J., Barber, M. J., Rueger, D. C., Miller, B. E., Siegel, L. M. and Kredich, N. M. 1989. Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J Biol Chem* 264(27): 15796-808.

- Otto, D. M., Henderson, C. J., Carrie, D., Davey, M., Gundersen, T. E., Blomhoff, R., Adams, R. H., Tickle, C. and Wolf, C. R. 2003. Identification of novel roles of the cytochrome p450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic Acid homeostasis. *Mol Cell Biol* 23(17): 6103-16.
- Ouzzine, M., Pillot, T., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Burchell, B. and Siest, G. 1994. Expression and role of the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1*6 analyzed by specific antibodies raised against a hybrid protein produced in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 310(1): 196-204.
- Paine, M. F., Khalighi, M., Fisher, J. M., Shen, D. D., Kunze, K. L., Marsh, C. L., Perkins, J. D. and Thummel, K. E. 1997. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283(3): 1552-62.
- Paine, M. J. I., Scrutton, N. S., Munron, A. W., Gutierrez, a., Roberts, G. C. and Wolf, C. R. 2005. Electron Transfer Partners of cytochrome P450. *Cytochrome P450 - structure, Mechanism, and Biochemistry*. P. Montellano. Kansas, *Cytochrome P450 - structure, Mechanism, and Biochemistry*: 115-128.
- Palma, B. B., MS, E. S., Vosmeer, C. R., Lastdrager, J., Rueff, J., Vermeulen, N. P. and Kranendonk, M. 2010. Functional characterization of eight human cytochrome P450 1A2 gene variants by recombinant protein expression. *Pharmacogenomics J*.
- Pandey, A. V., Fluck, C. E., Huang, N., Tajima, T., Fujieda, K. and Miller, W. L. 2004. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis affecting all microsomal P450 enzymes. *Endocr Res* 30(4): 881-8.
- Pandey, A. V., Kempna, P., Hofer, G., Mullis, P. E. and Fluck, C. E. 2007. Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. *Molecular Endocrinology* 21: 2579-2595.
- Parikh, A., Gillam, E. M. J. and Guengerich, F. P. 1997. Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nature Biotechnology* 15(8): 784-788.
- Parkinson, A. 2008. Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. Curtis D. Klaassen. Kansas, McGraw-Hill: 161-304.
- Porter, T. D. 2002. The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J Biochem Mol Toxicol* 16(6): 311-6.
- Porter, T. D. and Kasper, C. B. 1986. NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry* 25(7): 1682-7.
- Preston, R. J. and Hoffman, G. R. 2008. Genetic Toxicology. *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. C. D. Klaassen. Kansas, McGraw-Hill: 381-414.
- Purnapatre, K., Khattar, S. K. and Sain, K. S. 2008. Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs. *Cancer Letters* 259(1): 1-15.
- Rossini, A., Simao, T. D., Albano, R. M. and Pinto, L. F. R. 2008. CYP2A6 polymorphisms and risk for tobacco-related cancers. *Pharmacogenomics* 9(11): 1737-1752.
- Sambrook, J., Fritsch, T. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. New-York, EUA, Cold Spring Harbor.
- Sansen, S., Hsu, M. H., Stout, C. D. and Johnson, E. F. 2007. Structural insight into the altered substrate specificity of human cytochrome P450 2A6 mutants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464(2): 197-206.
- Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D. and Johnson, E. F. 2007. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *Journal of Biological Chemistry* 282(19): 14348-14355.
- Schacter, B. A., Nelson, E. B., Masters, B. S. S. and Marver, H. S. 1972. Immunochemical Evidence for an Association of Heme Oxygenase with the Microsomal Electron-Transport System. *Journal of Biological Chemistry* 247(11): 3601-3607.
- Schenkman, J. B. and Jansson, I. 2003. The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* 97(2): 139-52.
- Shen, A. L., O'Leary, K. A. and Kasper, C. B. 2002. Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *J Biol Chem* 277(8): 6536-41.

- Shimada, T., Oda, Y., Gillam, E. M., Guengerich, F. P. and Inoue, K. 2001. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab Dispos* 29(9): 1176-82.
- Su, T., Bao, Z., Zhang, Q. Y., Smith, T. J., Hong, J. Y. and Ding, X. 2000. Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 60(18): 5074-9.
- Thier, R., Bruning, T., Roos, P. H., Rihs, H. P., Golka, K., Ko, Y. and Bolt, H. M. 2003. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: The role of selected CYP, NAT and GST genes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 206(3): 149-171.
- Venkatakrishnan, K., von Moltke, L. L., Court, M. H., Harmatz, J. S., Crespi, C. L. and Greenblatt, D. J. 2000. Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches. *Drug Metab Dispos* 28(12): 1493-504.
- Vermeulen, N. P. 1996. Role of metabolism in Chemical toxicity. Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects. C. Ioannides, CRC PRESS: 29-54.
- Wang, M., Roberts, D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. S. and Kim, J. J. P. 1997. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(16): 8411-8416.
- Wang, S. L., Han, J. F., He, X. Y., Wang, X. R. and Hong, J. Y. 2007. Genetic variation of human cytochrome p450 reductase as a potential biomarker for mitomycin C-induced cytotoxicity. *Drug Metab Dispos* 35(1): 176-9.
- Wiebel, F. J., Andersson, T. B., Casciano, D. A., Dickins, M., Fischer, V., Glatt, H., Horbach, J., Langenbach, R. J., Luyten, W., Turchi, G. and Vandewalle, A. 1997. Genetically engineered cell lines: Characterisation and applications in toxicity testing. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 25(6): 625-639.
- Yamaori, S., Yamazaki, H., Suzuki, A., Yamada, A., Tani, H., Kamidate, T., Fujita, K. and Kamataki, T. 2003. Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. *Biochem Pharmacol* 66(12): 2333-40.
- Yamazaki, H., Nakamura, M., Komatsu, T., Ohyama, K., Hatanaka, N., Asahi, S., Shimada, N., Guengerich, F. P., Shimada, T., Nakajima, M. and Yokoi, T. 2002. Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 24(3): 329-37.
- Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M. V. and Guengerich, F. P. 2001. Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase. *J Biol Chem* 276(33): 30885-91.
- Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K. and Schwab, M. 2008. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(6): 1093-1108.
- Zhang, H., Im, S. C. and Waskell, L. 2007. Cytochrome b5 increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem* 282(41): 29766-76.
- Zhang, H., Myshkin, E. and Waskell, L. 2005. Role of cytochrome b5 in catalysis by cytochrome P450 2B4. *Biochem Biophys Res Commun* 338(1): 499-506.
- Zhou, H., Josephy, P. D., Kim, D. and Guengerich, F. P. 2004. Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. *Arch Biochem Biophys* 422(1): 23-30.

7. Anexos

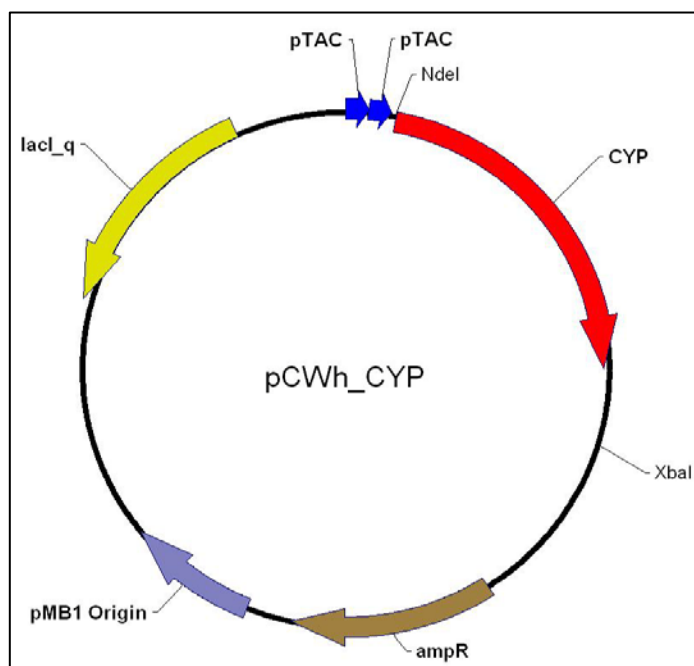


Figura 7.1: Representação esquemática do plasmídeo pCWh_CYP.

[O cDNA de CYP1A2 ou CYP2A6 humano foi clonado a jusante do promotor *tac.tac*, que está sobre o controle do repressor *lacI^q*. O plasmídeo contém o gene que confere resistência para ampicilina (*amp^R*).]

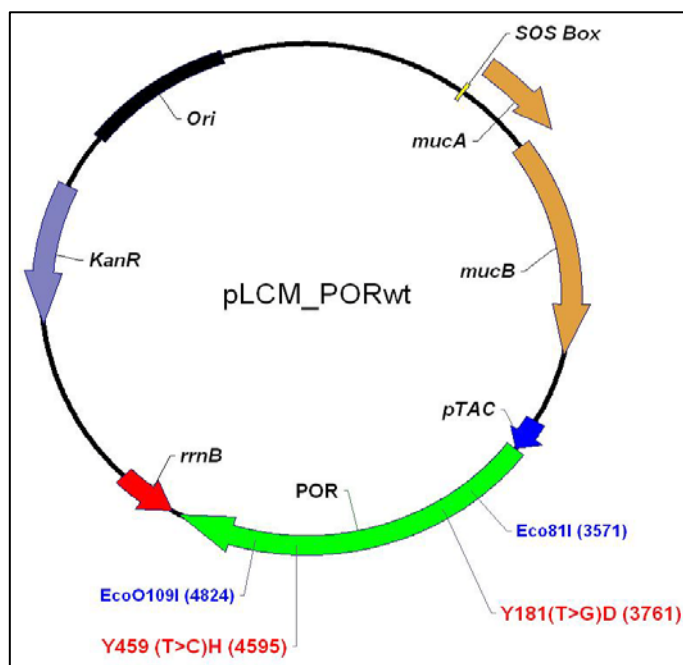


Figura 7.2: Representação esquemática do plasmídeo pLCM_POR.

[O plasmídeo pLCM_POR contém, o cDNA de *POR* humano clonado a jusante do promotor *tac*, gene que confere resistência para canamicina (*Kan^R*), o operon *mucAB*. Estão evidenciados no gene *POR* os locais das alterações que levam às variantes Y459H e Y181D da CYPOR bem como os locais de corte das enzimas de restrição Eco0109I e Eco811I.]

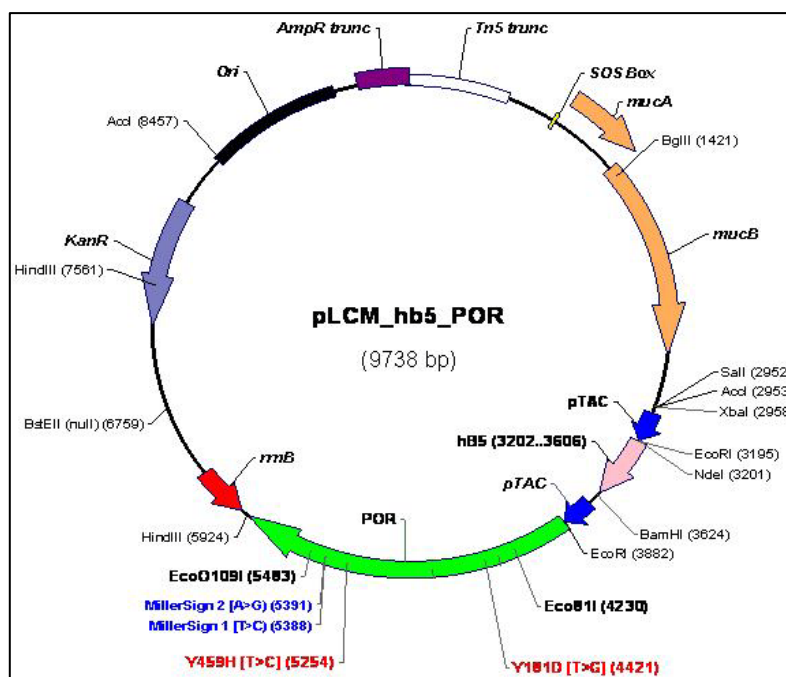


Figura 7.3: Representação esquemática do plasmídeo pLCM hb5 POR.

[O plasmídeo pLCM_hb5_POR contém o gene que confere resistência para canamicina (*Kan^R*), o operon *mucAB*, o cDNA do *b₅* clonado a jusante do promotor *tac* e o cDNA do gene *POR* humano clonado a jusante do promotor *tac*. Estão evidenciados no gene *POR* os locais das alterações que levam às variantes Y459H e Y181D da CYPOR bem como os locais de corte das enzimas de restrição Eco0109I e Eco81I.]

Tabela 7.1: Atividades mutagénicas dos compostos NNK (revertentes/ μmol), IQ (revertentes/nmol) e NNDEA (revertentes/ μmol) para as estirpes em estudo.

Estirpes	Actividades mutagénicas					
	NNK		IQ		NNdEA	
	(revertentes / μ mol)	%	(revertentes/ nmol)	%	(revertentes / μ mol)	%
BTC1A2_POR ^{wt}	1392 $\pm$ 173	100 $\pm$ 12	295 $\pm$ 18	100 $\pm$ 6	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{wt}	3493 $\pm$ 239	251 $\pm$ 17	221 $\pm$ 33	75 $\pm$ 11	-	-
BTC1A2_POR ^{Y459H}	675 $\pm$ 61	48 $\pm$ 4	157 $\pm$ 17	53 $\pm$ 6	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Y459H}	1914 $\pm$ 176	137 $\pm$ 13	228 $\pm$ 37	77 $\pm$ 13	-	-
BTC1A2_POR ^{Y181D}	145 $\pm$ 22	10 $\pm$ 2	57 $\pm$ 10	19 $\pm$ 3	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Y181D}	1172 $\pm$ 148	84 $\pm$ 11	101 $\pm$ 12	34 $\pm$ 4	-	-
BTC1A2_POR ^{Null}	171 $\pm$ 52	12 $\pm$ 4	60 $\pm$ 11	20 $\pm$ 4	-	-
BTC1A2_hb5_POR ^{Null}	868 $\pm$ 123	62 $\pm$ 9	123 $\pm$ 15	42 $\pm$ 5	-	-
BTC ⁰ _hb5_POR	111 $\pm$ 63	8 $\pm$ 5	44 $\pm$ 8	15 $\pm$ 3	-	-
BTC2A6_POR ^{wt}	150 $\pm$ 27	100 $\pm$ 18	-	-	538 $\pm$ 21	100 $\pm$ 4
BTC2A6_hb5_POR ^{wt}	1134 $\pm$ 53	756 $\pm$ 35	-	-	1531 $\pm$ 129	285 $\pm$ 24
BTC2A6_POR ^{Y459H}	230 $\pm$ 62	153 $\pm$ 41	-	-	88 $\pm$ 34	16 $\pm$ 6
BTC2A6_hb5_POR ^{Y459H}	1209 $\pm$ 132	806 $\pm$ 88	-	-	4259 $\pm$ 453	792 $\pm$ 84
BTC2A6_POR ^{Y181D}	525 $\pm$ 52	350 $\pm$ 34	-	-	432 $\pm$ 90	80 $\pm$ 17
BTC2A6_hb5_POR ^{Y181D}	2092 $\pm$ 276	1395 $\pm$ 184	-	-	7155 $\pm$ 794	1330 $\pm$ 148
BTC2A6_POR ^{Null}	0	0	-	-	635 $\pm$ 79	118 $\pm$ 15
BTC2A6_hb5_POR ^{Null}	1107 $\pm$ 98	738 $\pm$ 65	-	-	7483 $\pm$ 685	1391 $\pm$ 127
BTC ⁰ _hb5_POR	0	0	-	-	0	0

-: não aplicável

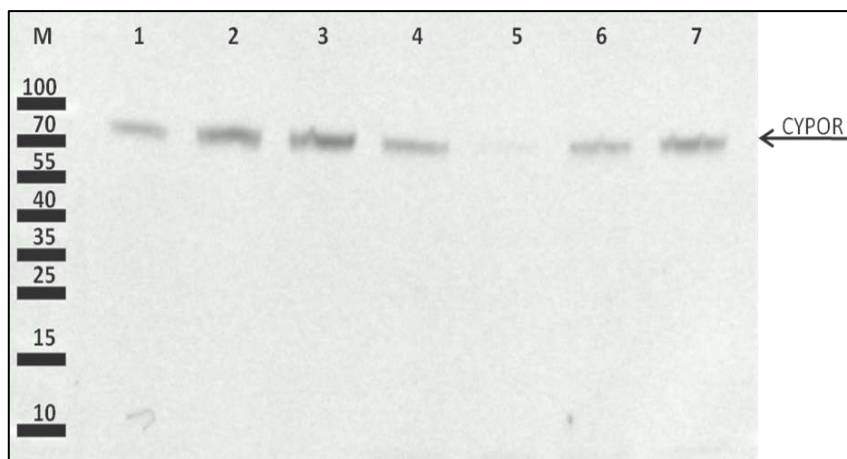


Figura 7.4: Fotografia da membrana de imunodeteccção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC1A2_POR^{wt}, 5) BTC1A2_POR^{null}, 6) BTC1A2_POR^{Y459H} e 7) BTC1A2_POR^{Y181D}. [Linhas 1-3 contêm 10 μ g de proteína membranar; pistas 1-3 contêm 10 ng, 20 ng e 30 ng, respectivamente, de CYPOR recombinante purificada; M: marcador de pesos moleculares em kD.]

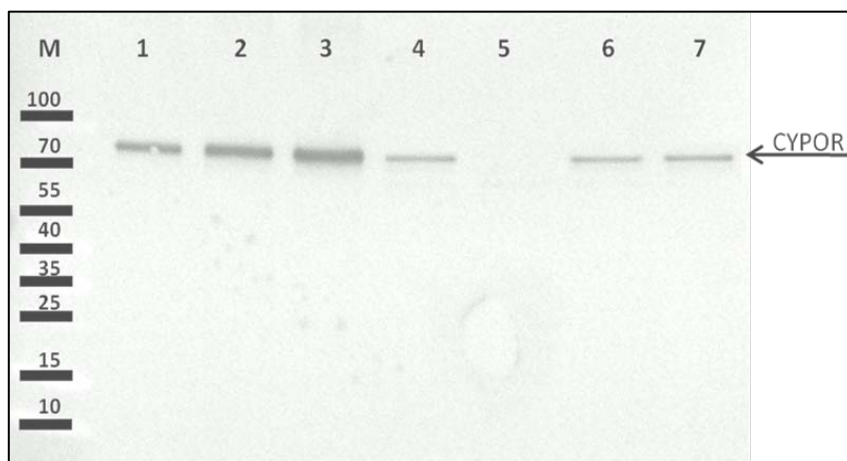


Figura 7.5: Fotografia da membrana de imunodeteccção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC1A2_hb5_POR^{wt}, 5) BTC1A2_hb5_POR^{null}, 6) BTC1A2_hb5_POR^{Y459H} e 7) BTC1A2_hb5_POR^{Y181D}. [Linhas 1-3 contêm 10 μ g de proteína membranar; pistas 1-3 contêm 7,5 ng, 15 ng e 22,5 ng, respectivamente, de CYPOR recombinante purificada; M: marcador de pesos moleculares em kD.]

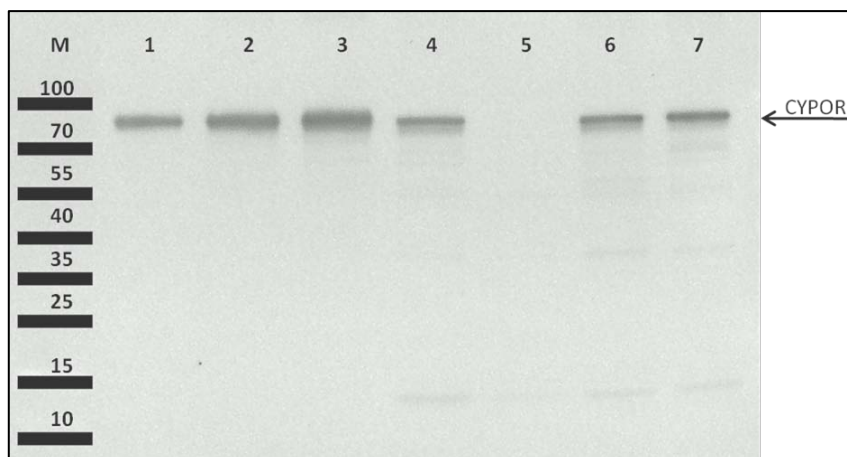


Figura 7.6: Fotografia da membrana de imunodeteccção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC2A6_POR^{wt}, 5) BTC2A6_POR^{null}, 6) BTC2A6_POR^{Y459H} e 7) BTC2A6_POR^{Y181D}. [Linhas 1-3 contêm 10 μ g de proteína membranar; pistas 1-3 contêm 7,5 ng, 15 ng e 22,5 ng, respectivamente, de CYPOR recombinante purificada; M: marcador de pesos moleculares em kD.]

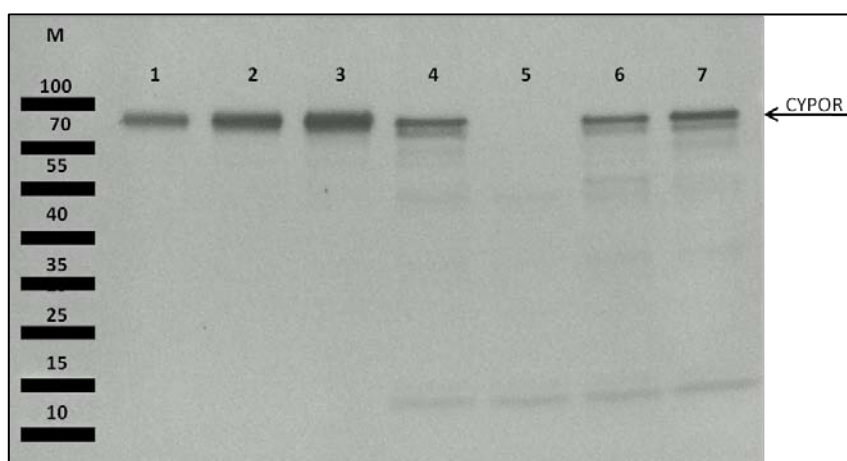


Figura 7.7: Fotografia da membrana de imunodeteccção da CYPOR (≈ 78 kD) nas membranas isoladas a partir de culturas induzidas das estirpes: 4) BTC2A6_hb5_POR^{wt}, 5) BTC2A6_hb5_POR^{null}, 6) BTC2A6_hb5_POR^{Y459H} e 7) BTC2A6_hb5_POR^{Y181D}. [Linhas 1-3 contêm 10 μ g de proteína membranar; pistas 1-3 contêm 7,5 ng, 15 ng e 22,5 ng, respectivamente, de CYPOR recombinante purificada; M: marcador de pesos moleculares em kD.]

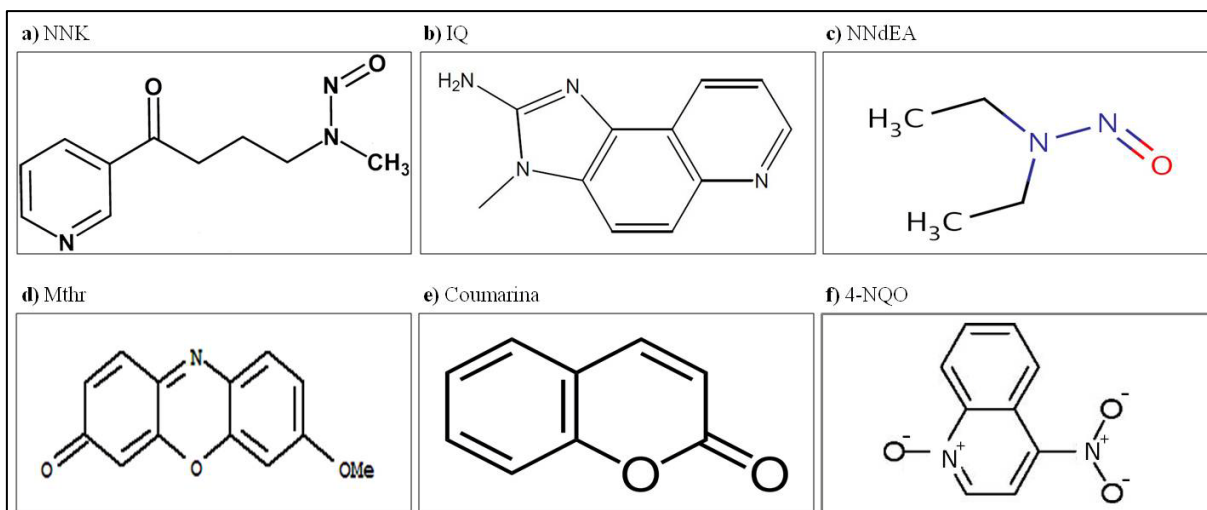


Figura 7.8: Estruturas moleculares dos substratos utilizados no decorrer do estudo. a) NNK (4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona); b) IQ (2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina); c) NNdEA (N-Nitrosodietilamina); d) Mthr (Metoxioresufina); e) Coumarina; f) 4NQO (4-nitroquinolina-1-óxido).

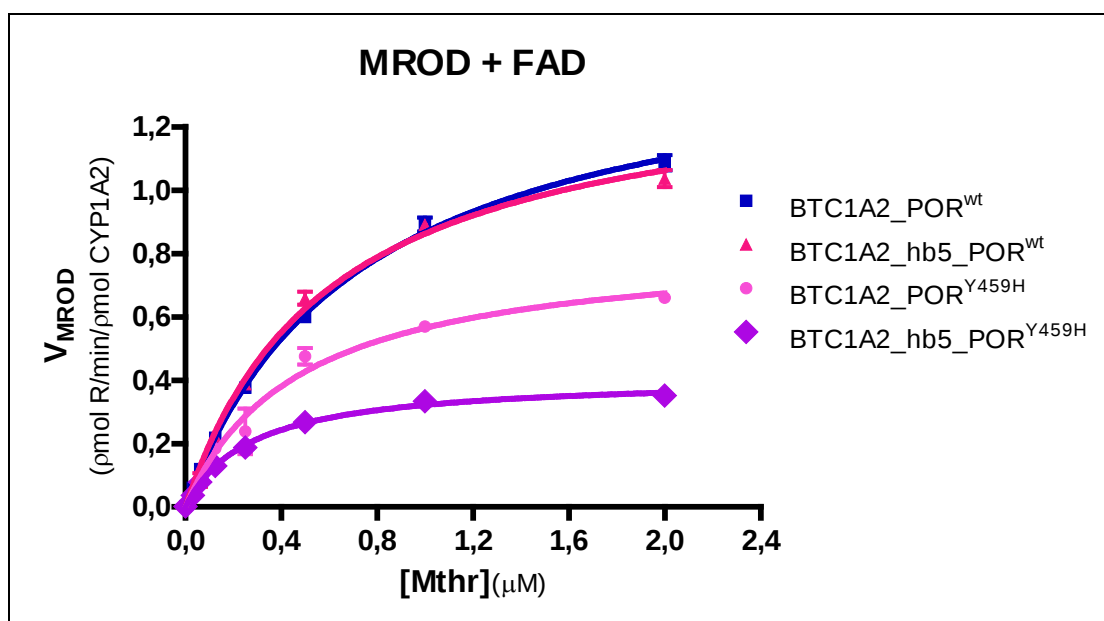


Figura 7.9: Gráfico da velocidade de *O*-desmetilação da metoxioresufina (MROD) em função da concentração de metoxioresufina, em presença de FAD (10 μM).

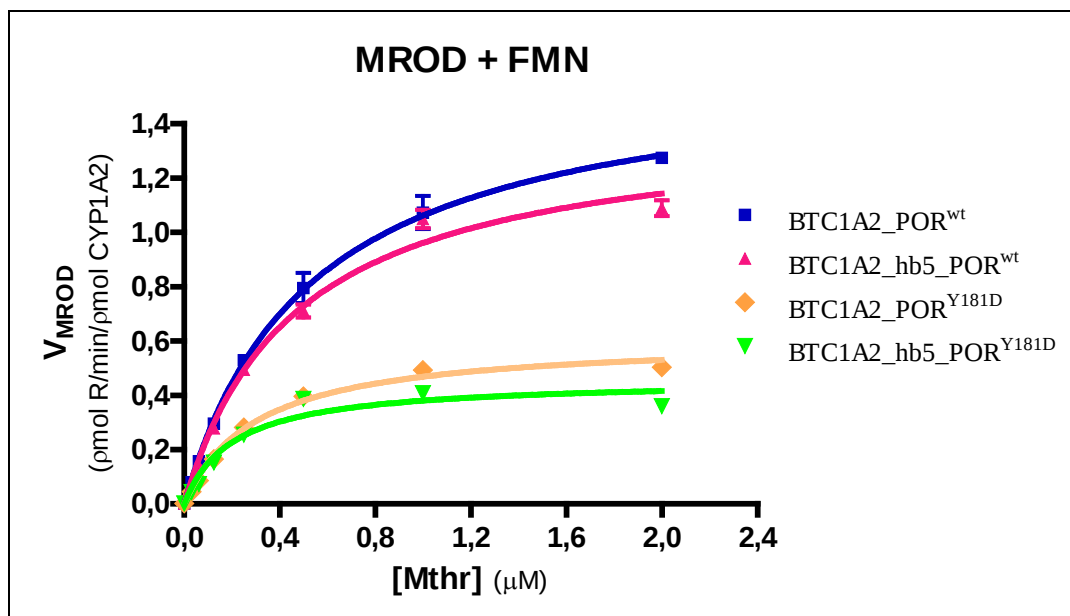


Figura 7.10: Gráfico da velocidade de O-desmetilação da metoxiresorufina (MROD) em função da concentração de metoxiresorufina, em presença de FMN (10 μM).

Tabela 7.2: Parâmetros cinéticos e eficiência da reacção de O-desmetilase da metoxiresorufina (MROD) do CYP1A2 das estirpes BTC1A2_hb5_POR e BTC1A2_hb5_POR

Estirpes bacterianas		Ensaio	MROD			
			V _{max} (pmol/min/pmol CYP1A2)	K _m (μM)	Eficiência (V _{max} /K _m)	Factor de influência do b ₅
BTC1A2	POR ^{wt}	-FAD/FMN	1,26±0,03	0,79±0,05	1,6	-
		+ FAD	1,50±0,03	0,73±0,04	2,1	-
		+FMN	1,62±0,05	0,53±0,04	3,1	-
	hb5_POR ^{wt}	-FAD/FMN	1,27±0,03	0,65±0,04	2,0	1,25 (25%)
		+ FAD	1,38±0,04	0,60±0,05	2,3	1,09 (10%)
		+FMN	1,41±0,05	0,47±0,04	3,0	0,97 (-3%)
	POR ^{Y459H}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	0,84±0,05	0,48±0,07	1,8	-
		+FMN	-	-	-	-
	hb5_POR ^{Y459H}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	0,41±0,01	0,28±0,01	1,5	0,83 (-17%)
		+FMN	-	-	-	-
	POR ^{Y181D}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	-	-	-	-
		+FMN	0,61±0,02	0,30±0,03	2,0	-
	hb5_POR ^{Y181D}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	-	-	-	-
		+FMN	0,46±0,02	0,21±0,04	2,2	1,1 (10%)
	POR ^{Null}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	n.d.	n.d.	-	-
		+FMN	n.d.	n.d.	-	-
	hb5_POR ^{Null}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	n.d.	n.d.	-	-
		+FMN	n.d.	n.d.	-	-

Todos os valores obtidos apresentaram um coeficiente de linearidade (r^2) $\geq 0,95$; n.d.: não detectável; - : não efectuado.

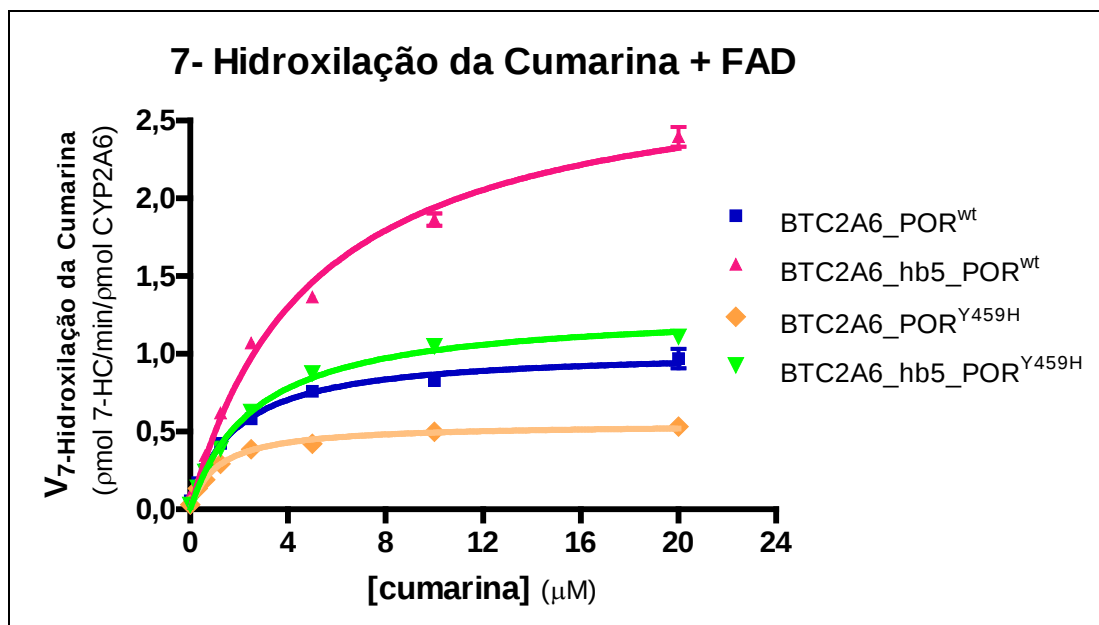


Figura 7.11: Gráfico de velocidade de 7-hidroxilação da cumarina em função da concentração de cumarina, em presença de FAD (10 μM). [7-HC: 7-hidroxicumarina]

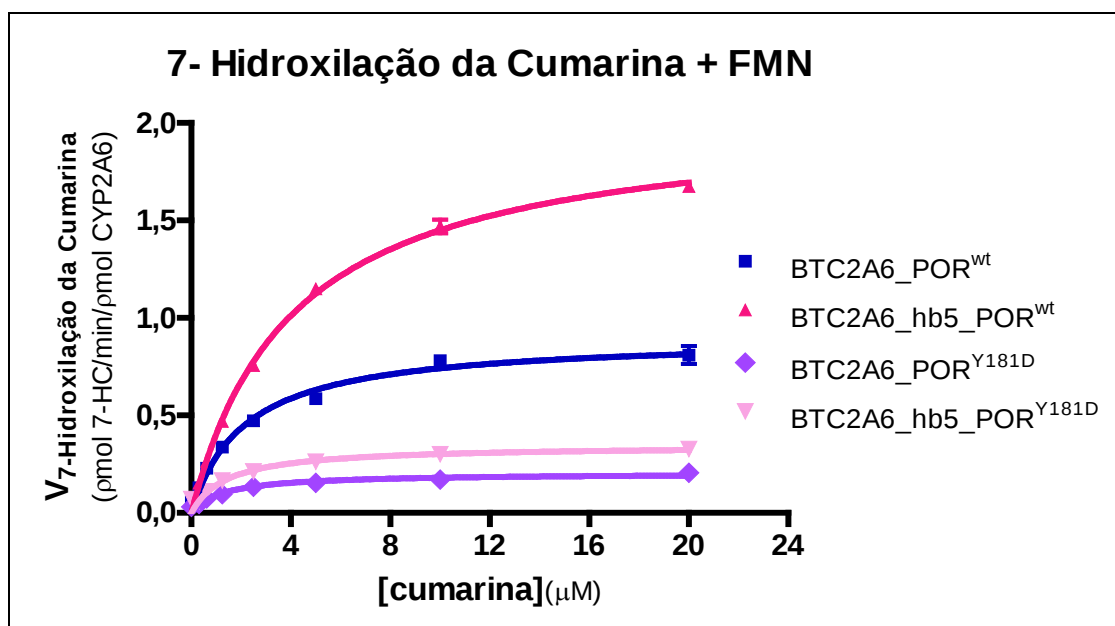


Figura 7.12: Gráfico de velocidade de 7-hidroxilação da cumarina em função da concentração de cumarina, em presença de FMN (10 μM). [7-HC: 7-hidroxicumarina]

Tabela 7.3: Parâmetros cinéticos e eficiência da reacção de 7-hidroxilação da cumarina (7-HC) do CYP2A6 das estirpes BTC2A6_hb5_POR e BTC2A6_hb5_POR.

Estirpes bacterianas		Ensaio	7-HC			
			$V_{\max}$ (pmol/min/pmol CYP1A2)	K_m (μ M)	Eficiência ($V_{\max}/K_m$)	Factor de influência do b_5
BTC2A6	POR ^{wt}	-FAD/FMN	0,79±0,03	1,9±0,2	0,41	-
		+ FAD	1,03±0,03	1,8±0,2	0,57	-
		+FMN	0,9±0,03	2,1±0,2	0,43	-
	hb5_POR ^{wt}	-FAD/FMN	2,34±0,07	5,0±0,4	0,49	1,2 (19%)
		+ FAD	2,9±0,09	4,9±0,4	0,59	1,0 (3,5%)
		+FMN	2,04±0,03	4,1±0,2	0,50	1,6 (16%)
	POR ^{Y459H}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	0,55±0,01	1,12±0,09	0,49	-
		+FMN	-	-	-	-
	hb5_POR ^{Y459H}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	1,29±0,02	2,6±0,1	0,50	1,0 (2,0%)
		+FMN	-	-	-	-
	POR ^{Y181D}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	-	-	-	-
		+FMN	0,204±0,007	1,3±0,2	0,16	-
	hb5_POR ^{Y181D}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	-	-	-	-
		+FMN	0,35±0,02	1,4±0,3	0,25	1,6 (56%)
	POR ^{Null}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	n.d.	n.d.	-	-
		+FMN	n.d.	n.d.	-	-
	hb5_POR ^{Null}	-FAD/FMN	n.d.	n.d.	-	-
		+ FAD	n.d.	n.d.	-	-
		+FMN	n.d.	n.d.	-	-

Todos os valores obtidos apresentaram um coeficiente de linearidade (r^2) $\geq 0,95$; n.d: não detectável; -: não efectuado.